



UNIVERSIDAD DE MURCIA

ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO

Adicción a Cocaína:
Estudio del Receptor Dopaminérgico
D3 (D3R) como Posible Diana
Farmacológica en la Prevención
de las Recaídas en su Consumo

D^a Rocío Guerrero Bautista

2020

“Las carreras STEM combinan ciencia, tecnología, ingeniería y matemáticas. Actualmente, la rama de tecnología en los colegios está repleta de chicos, pero en las de ciencia es al contrario. Es función de todos hacerles ver que una carrera con todas esas variantes sería perfecta para las chicas también. A lo largo de la historia ha habido muchas mujeres que lo han logrado, en una época en la que ni siquiera estaba bien visto que estudiaran una carrera. Pero todo se puede, como diría Pepita Castellví [***lo importante es tener una idea y lo demás es sólo trabajo***].

- Ana Alemany/Todos los caminos llevan al polo -

AGRADECIMIENTOS

A mi padre, hace tiempo que ya no estás pero me dejaste un gran tesoro en herencia: tus valores y tu forma de ser, que sin darme cuenta inculcaste en mí. Eso hace que hoy pueda afrontarlo todo de la manera en que lo hago y como tú querías, con humildad, sinceridad, constancia, esfuerzo y positivismo.

Un buen amigo se quedó en el camino de esta vida por culpa de la droga, objeto de este estudio. Siempre has sido un impulso de ayuda para empezar y terminar con esto, de algún modo sentía que te lo debía y de alguna manera es mi aportación como grano de arena a la ciencia. Espero que algún día haya solución y que personas jóvenes como tú, con tanta vida por delante, tengan una oportunidad de salvarse del laberinto de la adicción en el que a veces no se encuentra la salida y uno mismo, encuentra tristemente otra.

A todas las personas, familiares y amigos que en estos años de alguna manera me han ayudado, animado o se han interesado por la evolución de esta aventura de estudio e investigación. Especial mención a mi familia de Tarifa y Almería, Belín, Elena, Susana, Abel, sé que de corazón os alegráis de mis logros.

Gracias también a los compañeros del grupo de investigación de Farmacología Celular y Molecular del IMIB por enseñarme, aportarme y ayudarme con tantas cosas; sin vosotros no habría terminado nunca. Especial mención a Juana María, Fran, Victoria y Aurelio, me ha encantado conocerlos porque habéis sido un gran descubrimiento para mí como personas.

Quería agradecer también a Bruno el gran trabajo que ha realizado al desarrollar y dirigir toda la parte experimental de comportamiento, gracias por tu tiempo y dedicación.

Agradecer también a mis compañeros de trabajo en el hospital por el ánimo y apoyo que me han transmitido desde que llegué.

No menos importantes, a mis pequeños peludos, esos seres que confían en mí incondicionalmente y que tantas horas han pasado a mi lado haciéndome mucha compañía sin saber el por qué de pasar tantas horas sentada como una piedra.

A mis directoras de tesis, las mejores sin duda. A vosotras, María Victoria Milanés Maquilón y María Cristina Núñez Parra quiero dar especialmente las gracias porque sin vosotras nada de esto hubiera sido posible. Si tuviera que volver a repetir, con los ojos cerrados, sería de nuevo con vosotras. Gracias por tanto...por la oportunidad de pertenecer al grupo, por la paciencia, porque sé que he sido una alumna atípica, por el camino recorrido a vuestro lado, por entenderme, por apoyarme siempre, por animarme, por luchar por vuestras convicciones y ser un ejemplo a seguir, por enseñarme todo lo que hoy sé; en definitiva gracias por todo. Sé que además de dos directoras me llevo a dos amigas. Por esto y mucho más os estaré eternamente agradecida.

Por último, quería mencionar a Guille, mi compañero de viaje en el camino de la vida. Te tengo que agradecer que desde el minuto uno que te conozco me hayas apoyado en todas mis andanzas como si fuera la tuya propia, siempre quieres lo mejor para mí, que termine todo lo que comienzo e incluso que empiece cosas nuevas. Gracias también por haber entendido, soportado y apaciguado mis momentos de estrés y desquicio mental en los que a veces no me soportaba ni yo.

El presente trabajo ha dado lugar a la siguiente producción científica:

ARTÍCULOS

Rocío Guerrero-Bautista, Bruno Ribeiro Do Couto, Juana M. Hidalgo, Francisco José Cárceles-Moreno, Guillermo Molina, M. Luisa Laorden, Cristina Núñez, M. Victoria Milanés. 2019. **Modulation of stress-and cocaine prime-induced reinstatement of conditioned place preference after memory extinction through dopamine D3 receptor.** Progress in Neuropsychopharmacology & Biological Psychiatry vol: 92; 308-320.

Rocío Guerrero-Bautista, Aurelio Franco-García, Juana M. Hidalgo, Francisco Fernández-Gómez, M. Victoria Milanés, Cristina Núñez. **Blockade of D3 receptor prevents changes in DAT and D3R expression in the mesolimbic dopaminergic circuit produced by social stress- and cocaine prime-induced reinstatement of cocaine-CPP.** Journal of Psychopharmacology (aceptado).

Rocío Guerrero-Bautista, Aurelio Franco-García, Francisco José Cárceles Moreno, Juana M. Hidalgo, Cristina Núñez, M Victoria Milanés. **Distinct regulation of dopamine D3 receptor in the basolateral amygdala and dentate gyrus in the relapse in cocaine CPP induced by cocaine priming and social stress** (en revisión).

COMUNICACIONES A CONGRESOS

I Jornadas Doctorales Escuela Internacional de Doctorado. Murcia 2015:

R. Guerrero-Bautista, M. Victoria Milanés, B.R Ribeiro Do Couto. Estudio de la respuesta a cocaína y sus mecanismos moleculares implicados en ratones wild type (WT) y knock out (KO) para CRF1.

XVI Congreso Nacional de la Sociedad Española de Neurociencia. Granada 2015:

R. Guerrero-Bautista, J. Teruel Fernández, M. Luisa Laorden, M. Victoria Milanés, B.R Ribeiro Do Couto. Social stress is as effective as the drug itself in reinstating cocaine-induced place preference in mice.

X Fens Forum of Neuroscience. Copenhague 2016:

M. Victoria Milanés, **R. Guerrero-Bautista**, C. Núñez, J.M Hidalgo, F.J Cárceles-Moreno, B.R Ribeiro Do Couto. Dopamine (DA) D3 receptor blockade prevents social stress-induced cocaine reinstatement.

I Jornadas IMIB-Arrixaca. Murcia 2016:

R. Guerrero-Bautista, M. Victoria Milanés, B.R Ribeiro Do Couto. El bloqueo de receptores dopaminérgicos D3 impide la recaída a cocaína inducida por estrés.

II Jornadas IMIB-Arrixaca. Murcia 2017:

R. Guerrero-Bautista, M. Victoria Milanés, C. Núñez, B.R Ribeiro Do Couto. El bloqueo del receptor dopaminérgico (D3R) disminuye los niveles de corticosterona liberada tras la inducción de un estrés por inmovilización en ratones.

III Jornadas Doctorales Escuela Internacional de Doctorado. Murcia 2017:

R. Guerrero-Bautista, M. Victoria Milanés, B.R Ribeiro Do Couto. El bloqueo de receptores dopaminérgicos D3 evita la recaída a cocaína tras el estrés inducido por dolor.

International Conference On Opioids. Boston 2017:

M. Victoria Milanés, **R. Guerrero-Bautista**, B.R Ribeiro Do Couto. Possible role of glucocorticoids in the attenuating effects of selective D3R antagonist on social defeat-induced reinstatement to cocaine seeking behavior.

XVII Congreso Nacional de la Sociedad española de Neurociencia. Alicante 2017:

R. Guerrero- Bautista, M. Victoria Milanés, B.R Ribeiro Do Couto.

D3 dopaminergic receptor blockade prevents cocaine relapse after immobilization-induced stress in mice.

II Encuentro Quintescience Facultad de Ciencias Universidad de Zaragoza. 2018:

R. Guerrero-Bautista, F.J Cárceles-Moreno, C. Núñez, M. Victoria Milanés. El antagonismo selectivo de receptores dopaminérgicos D3 previene la recaída por estrés social.

XXXVIII Congreso de la Sociedad Española de Farmacología. Santiago de Compostela 2018:

M. Victoria Milanés, **R. Guerrero-Bautista**, J.M Hidalgo, M. Luisa Laorden, C. Núñez. Effects of DAD3R blockade on DA transporter (DAT) and DA D3 receptor (DAD3R) expression in the mouse nucleus accumbens (NAc) after cocaine *priming* induced reinstatement of cocaine seeking behaviour.

XI Fens Forum of Neuroscience. Berlín 2018:

M. Victoria Milanés, **R. Guerrero-Bautista**, J.M Hidalgo, F.J Cárceles-Moreno, M. Luisa Laorden, C. Núñez. Influence of dopamine (DA) D3 receptor (DAD3R) on DA transporter (DAT) expression in the mouse nucleus accumbens (NAc) during social stress-induced reinstatement of cocaine seeking behavior.

III Jornadas IMIB-Arrixaca. Murcia 2018:

R. Guerrero-Bautista, J.M Hidalgo, M. Victoria Milanés, M. Luisa Laorden, C. Núñez. Relación de la expresión del transportador de dopamina (DAT) y el receptor dopaminérgico D3 en el núcleo accumbens (NAc) en la recaída de ratones condicionados con cocaína y sometidos a estrés social.

V Jornadas Doctorales Escuela Internacional de Doctorado. Murcia 2019:

R. Guerrero-Bautista, M. Victoria Milanés, J.M Hidalgo, C. Núñez. Implicación del DAD3R y la vía PI3K/Akt en la activación del complejo mTORC1 en las recaídas a cocaína en ratones.

Society of neuroscience (SfN). Chicago 2019:

C. Núñez, **R. Guerrero-Bautista**, J.M Hidalgo, M. Victoria Milanés. Dopamine D3 receptor antagonism blocked the mTORC1 downregulation in the dentate gyrus after the reinstatement of cocaine-induced CPP evoked by social stress.

IV Jornadas IMIB-Arrixaca. Murcia 2019:

R. Guerrero-Bautista, M. Victoria Milanés, C. Núñez. El antagonismo del receptor de dopamina D3 bloqueó la regulación negativa de la vía m TORC1 en amígdala basolateral después del restablecimiento de la CPP inducida por cocaína provocada por el estrés social.

LA PRESENTE TESIS DOCTORAL HA SIDO FINANCIADA CON LAS SIGUIENTES AYUDAS:

- Proyecto SAF2013-49076-P, Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO):

“Estrés y memoria: implicación en los estados aversivos de la adicción y en las recaídas; mecanismos moleculares”.

- Proyecto 15405/PI/2010, Fundación Séneca, Comunidad Autónoma de la Región de Murcia:

“Relación entre estrés y adicción a opiáceos: Papel de orexinas y su interacción con sistemas de CRF y NA”.

- Proyecto SAF2017-85679-R, Ministerio de Industria, Economía y Competitividad (MINECO):

“Receptor dopaminérgico D3: posible diana terapéutica para la prevención de las recaídas en el consumo de opiáceos: mecanismos neurobiológicos”.

- Proyecto 20847/PI/18, Fundación Séneca, Comunidad Autónoma de la Región de Murcia:

“Cambios neuroadaptativos durante la dependencia de opiáceos. Diseño de nuevas formulaciones para administración a morfina”.

ABREVIATURAS

AC: adenilato ciclasa

ACTH: hormona adrenocorticotropa

AKT: proteína kinasa B

AMPc: adenosina -3',5' monosfosfato cíclico

BCA: ácido bicinconínico

BDNF: factor neurotrófico derivado del cerebro

BHE: barrera hemato-encefálica

BLA: amígdala basolateral

BNST: núcleo del lecho de la estria terminal

BSA: albúmina sérica bovina

CeA: núcleo central de la amígdala

CPP: condicionamiento preferencia de lugar

CRF: factor liberador de corticotropina

CRF1: receptor 1 del factor liberador de corticotropina

DR2: receptor dopaminérgico D2

D3R: receptor dopaminérgico D3

DA: dopamina

DAT: transportador activo de la dopamina

DG: giro dentado

DYN: dinorfinas

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

EPOC: enfermedad pulmonar obstructiva crónica

ERK_{1/2}: proteína quinasa regulada por señales extracelulares

GABA: ácido γ -amino butírico

GTP _{γ S}: guanosina 5'-O-(γ -tio)trifosfato

HHA: hipotálamo-hipófisis-adrenal

IC: insuficiencia cardíaca

I.C.V.: intracerebroventricular

I.P.: intraperitoneal

LC: locus coeruleus

mTOR: diana de rapamicina en células de mamífero

mTORC1: complejo proteico 1 de la diana de rapamicina en células de mamífero

LTD: depresión a largo plazo

LTM: memoria a largo plazo

LTP: potenciación a largo plazo

NA: noradrenalina

NAc: núcleo accumbens

NET: transportador de noradrenalina

NMDA: ácido N-metil-D-aspartico

MSN: neuronas espinosas medias

NTS: núcleo del tracto solitario

PBS: tampón fosfato sódico

PFC: corteza prefrontal

PI3K: fosfatidilinositol 3-kinasa

PKA: proteína kinasa A

POE: péptidos opioides endógenos

Post-C: post-condicionamiento

Post-ext: post-extinción

Post-reinst: post-restauración o recaída

Pre-C: pre-condicionamiento

pS6: proteína ribosómica S6 fosforilada -activada-

S6: proteína ribosómica S6

PVN: núcleo paraventricular

REGA: registro general de explotaciones ganaderas

RIA: radioinmunoanálisis

SD: derrota social

SDS: estrés por derrota social

SDS-PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico

SEM: error estándar de la media

SNC: sistema nervioso central

TBST: tampón tris-salino-tween 20

VTA: área tegmental ventral

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Adicción a sustancias de abuso	2
1.1.1 El problema de las recaídas	4
1.2. Circuitos neuronales implicados en la adicción a drogas	5
1.2.1 Sistema mesocorticolímbico o de recompensa	6
1.2.2 Sistema anti-recompensa	8
1.2.2.1 Sistema del estrés extrahipotalámico	9
1.2.2.2 Sistema del estrés hipotalámico	9
1.2.3 Vías noradrenérgicas	11
1.3. Memoria, aprendizaje y adicción	12
1.3.1 Circuitos que regulan los procesos de memoria y aprendizaje	14
1.3.2 Estrés, memoria y recaídas en el consumo	17
1.4. Adicción a cocaína	20
1.4.1 Mecanismo de acción de la cocaína	21
1.4.2 Manifestaciones clínicas y toxicidad de la cocaína	22
1.5. Ruta de señalización mTORC1: relación con los procesos adictivos	25
1.6. Receptor dopaminérgico D3	26
1.6.1 Cascadas acopladas a D3R	29
1.6.2 D3R y adicción	30
II. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	34
III. MATERIAL Y MÉTODOS	38
3.1. Animales de experimentación	38
3.2. Estudios conductuales	38
3.2.1 Preferencia condicionada de lugar (CPP)	38
3.2.1.1. Adquisición de CPP inducida por cocaína	40
3.2.1.2. Extinción de CPP	42
3.2.1.3. Restauración o recaída de la CPP	43
3.2.2 Inducción de estrés por derrota social (SDS), inmovilización o dolor	44
3.2.2.1. Estrés por derrota social (SD)	44
3.2.2.2. Estrés por inmovilización	45
3.2.2.3. Estrés por dolor	45
3.2.3 Reinstauración de CPP inducida por SDS, inmovilización o dolor	46

3.2.4 Reinstauración de CPP inducida por un <i>priming</i> de cocaína	47
3.2.5 Estudio de los efectos del bloqueo selectivo del D3R sobre la restauración del CPP inducido por un <i>priming</i> de cocaína, un episodio de SDS, inmovilización o dolor.....	47
3.3. Grupos experimentales	47
3.4. Radioinmunoanálisis (RIA).....	48
3.5. Aislamiento de núcleos cerebrales mediante micropuncheado	49
3.6. Cuantificación de proteínas totales y Western-blot.....	51
3.7. Perfusión trans-cardiaca y obtención de secciones de cerebro	52
3.8. Inmunofluorescencia (IF).....	54
3.9. Análisis mediante microscopía confocal.....	56
3.10. Análisis estadístico.....	56
IV. RESULTADOS	60
4.1. Implicación de D3R en la recaída en la CPP provocada por un <i>cocaine-prime</i> y por diferentes tipos de estrés.....	60
4.1.1. El bloqueo de D3R con SB-277011-A no antagonizó la recaída en la CPP provocada por <i>cocaine-prime</i>	60
4.1.2. El pretratamiento con SB-277011-A inhibió la restauración de la CPP provocada por estrés social.....	63
4.1.3. El pretratamiento con SB-277011-A inhibió la restauración de la CPP provocada por diferentes tipos de estrés fisiológico.....	67
4.2. El D3R está implicado en el incremento de los niveles plasmáticos de corticosterona durante la recaída en la CPP.....	74
4.3. El bloqueo de D3R previene las modificaciones en la expresión de DAT y D3R en NAc shell durante la recaída en la CPP provocada por estrés y por un <i>priming</i> de cocaína en ratones condicionados a cocaína.....	81
4.3.1. Cambios en la expresión de DAT y D3R en el NAc shell tras la recaída en la CPP provocada por un <i>priming</i> de cocaína y por estrés social.....	81
4.3.2. Regulación de la expresión de pAkt y pmTOR en el NAc tras la recaída en la CPP provocada por un <i>priming</i> de cocaína y por estrés social.....	85
4.4. Implicación del D3R en BLA y en el DG en la recaída en la CPP provocada por un <i>priming</i> de cocaína y por estrés social.....	91
4.4.1. La recaída en la CPP inducida por un <i>priming</i> de cocaína o por estrés social modificó la expresión D3R y DAT en BLA, pero no en DG hipocampal.....	91
4.4.2. La recaída en la CPP provocada por un <i>priming</i> de cocaína o por estrés social, disminuyó la activación de mTOR en BLA y DG.....	94
4.5. Implicación del D3R en BLA y en el DG en la recaída en la CPP provocada por un <i>priming</i> de cocaína y por estrés social.....	97
V. DISCUSIÓN	105
5.1 El D3R está involucrado en la recaída en la CPP inducida por cocaína y desencadenada por estrés social y fisiológico	105

5.2 SB-277011-A no impidió las recaídas en la CPP inducida por cocaína y provocada por un <i>priming</i> de cocaína	109
5.3 Diferente papel de los glucocorticoides en la atenuación del restablecimiento inducido por estrés y <i>priming</i> de cocaína previo bloqueo de D3R	111
5.4 Cambios en la expresión de la proteína DAT y D3R en el NAc tras el restablecimiento de la CPP inducida por cocaína y desencadenada por un <i>priming</i> de cocaína y por estrés social	114
5.5 Cambios en la fosforilación de la proteína Akt y mTOR en el NAc tras el restablecimiento de la CPP desencadenada por un <i>priming</i> de cocaína y por estrés social	118
5.6 Cambios en la expresión de la proteína D3R, DAT Y mTOR en BLA y DG tras el restablecimiento de la CPP inducida por cocaína y desencadenada por un <i>priming</i> de cocaína y por estrés social	119
VI. CONCLUSIONES	127
VII. BIBLIOGRAFÍA	132

RESUMEN

La adicción a sustancias de abuso constituye un grave problema de salud pública a nivel global. Entre ellas, la cocaína sigue siendo la droga estimulante ilegal más utilizada en Europa, con la mayor prevalencia en los países del sur y oeste, como es el caso de España. La adicción puede definirse como un trastorno mental crónico y recurrente caracterizado por la búsqueda compulsiva de la droga. Durante largos períodos de abstinencia existe un alto riesgo de recaída en el consumo, por lo tanto, su prevención se ha convertido en un objeto de estudio para el manejo de la adicción debido a la falta de terapias efectivas para evitarlas. La importancia de estudiar las recaídas es porque pueden ser desencadenadas tanto por estímulos estresantes como por la reexposición a la droga en sí. Estos mismos desencadenantes se utilizan para restablecer los comportamientos asociados a las drogas en modelos animales. El paradigma pavloviano de preferencia de lugar condicionada inducida por drogas (CPP) se utiliza para evaluar las propiedades gratificantes de las drogas de abuso.

Como consecuencia, **los objetivos** de este trabajo han sido:

- Evaluar la posible implicación del receptor dopaminérgico D3 (D3R) en la recaída en el consumo de cocaína, ya que la evidencia acumulada indica que los antagonistas de estos receptores parecen ser muy prometedores para atenuar la recompensa y la recaída de la cocaína en modelos preclínicos de adicción.
- Estudiar si D3R está involucrado en el aumento de los niveles plasmáticos de corticosterona durante la recaída en la CPP.
- Estudiar las modificaciones en la expresión de DAT y D3R en el núcleo NAc (shell) durante la recaída en el CPP causada por el estrés y por un *priming* de cocaína en ratones condicionados a la cocaína; Además, estudiamos si el bloqueo de D3R impide las modificaciones de esas expresiones.

- Investigar los cambios en la cascada de mTOR en BLA y DG en la recaída en la CPP inducida por un *priming* de cocaína y estrés social.

La metodología desarrollada se ha dividido en dos fases, primero se realizó un estudio de comportamiento utilizando la CPP, y luego un estudio molecular procesando las muestras obtenidas (cerebro y plasma) para interpretar los cambios que ocurrieron en la primera fase.

Los diferentes grupos experimentales de ratones machos de la cepa C57BL/6 se condicionaron con cocaína a una dosis de 25 mg/kg durante cuatro días. Al quinto día, se realizó una prueba de condicionamiento posterior (Post-C) y luego, durante 7-8 semanas, se extinguió la CPP (ext). Una vez que el comportamiento adictivo había cesado, se estudió la posible participación de D3R en la restauración de la CPP inducida por cocaína. Para eso, treinta minutos antes de la administración de una dosis de *priming* de cocaína o un solo episodio de estrés [*social defeat* (SD), inmovilización o dolor], administramos una dosis única del antagonista selectivo de D3R, SB-277011-A. Las dosis administradas en cada grupo fueron a) 24 o 48 mg/kg, i.p. para el grupo de *priming* de cocaína, estrés de inmovilización y estrés por dolor; b) 12 o 24 mg/kg, i.p. para el grupo de estrés SD. Los animales de control recibieron una inyección de vehículo (agua desionizada, 1 ml/kg, i.p.). Además, los niveles plasmáticos de corticosterona (como marcador de estrés) se cuantificaron por radioinmunoensayo (RIA) después de una recaída.

Los resultados mostraron que el bloqueo de D3R con SB-277011-A no antagonizó la recaída en CPP causada por un *priming* de cocaína; por el contrario, el pretratamiento con SB-277011-A inhibió la restauración de la CPP causada por el estrés social. También hemos observado que el pretratamiento con SB-277011-A inhibió la restauración de la CPP causada por diferentes tipos de estrés fisiológico. A nivel molecular, hubo cambios en la expresión de DAT y D3R en el NAc (shell) después de la recaída en la CPP causada por un *priming* de cocaína y el estrés social. Además, hemos encontrado que la cascada de señalización de Akt-mTOR podría acoplarse a D3R debido a un aumento en la expresión de pAkt y pmTOR en el NAc después de la recaída en la CPP causada por un *priming* de cocaína y el estrés social. En la recaída en

la CPP inducida por un *priming* de cocaína o por estrés social se modificó la expresión D3R y DAT en BLA, pero no en DG hipocampal. Hubo una disminución en la activación de mTOR en BLA y DG después del restablecimiento de CPP inducido por *priming* de cocaína o estrés social.

En conclusión, nuestros resultados sugieren que el antagonismo de D3R podría ser un objetivo farmacológico en la prevención de la recaída inducida por el estrés en el consumo de cocaína. Además, los resultados actuales son consistentes con la hipótesis de que D3R jugaría un papel importante en el restablecimiento de la búsqueda de cocaína.

Palabras clave: adicción, cocaína, recaídas, D3R, DAT, Akt, pmTOR.

ABSTRACT

Drug addiction constitutes a serious public health problem at the international level. Among them, cocaine continues to be the most widely used illegal stimulant drug in Europe, with the highest prevalence in southern and western countries, as is the case in Spain. Addiction can be defined as a chronic and recurrent mental disorder characterized by the compulsive search for the drug. During long periods of abstinence there is a high risk of relapse in consumption, therefore, its prevention has become an object of study for the management of addiction due to the lack of effective therapies to avoid them. The importance of studying relapses is that they can be triggered by both stressful stimuli and by re-exposure to the drug itself. These same triggers are used to re-establish drug-associated behaviors in animal models. The Pavlovian paradigm of drug-induced conditioned place preference (CPP) is used to evaluate the rewarding properties of drugs of abuse.

As a consequence, **the Objectives** of this work have been:

- To evaluate the possible involvement of the dopaminergic receptor D3 (D3R) in the relapse in cocaine use, since accumulated evidence indicates that antagonists of these receptors seem to be very promising in attenuating cocaine reward and relapse in preclinical models of addiction.
- To study if D3R is involved in the increase of plasma corticosterone levels during relapse in CPP.
- To test the changes in the expression of DAT and D3R in the NAc shell during the relapse in the CPP caused by stress and by a *priming* of cocaine in mice conditioned to cocaine; in addition, we studied if the D3R blockade prevents the modifications those expression.
- To investigate the changes in the mTOR cascade in BLA and DG in the relapse in CPP induced by cocaine *priming* and social stress.

The methodology developed has been divided into two phases, first a behavioral study using the CPP has been carried out, and then a molecular study by processing the samples obtained (brain and plasma) to interpret the changes that occurred in the first phase.

The different experimental groups of male mice of the C57BL/6 strain were conditioned with cocaine at a dose of 25 mg/kg for four days. On the fifth day, a post-conditioning test (Post-C) was performed and then, for 7-8 weeks, the CPP was extinguished (ext). Once the addictive behavior had ceased, the possible involvement of D3R in the restoration of cocaine-induced CPP was studied. For that, thirty minutes before the administration of a cocaine *priming* dose or a single stress episode (SD, immobilization or pain), we administered a single dose of the selective D3R antagonist, SB-277011-A. The doses administered in each group were a) 24 or 48 mg/kg, i.p. for the cocaine *priming* group, immobilization stress and pain stress; b) 12 or 24 mg/kg, i.p. for the SD stress group. Control animals received a vehicle injection (deionized water, 1 ml/kg, i.p.). In addition, plasma levels of corticosterone (as marker of stress) were quantified by radioimmunoassay (RIA) after relapse.

The results showed that blocking D3R with SB-277011-A did not antagonize the relapse in CPP caused by cocaine-*prime*; by contrast, pretreatment with SB-277011-A inhibited the restoration of CPP caused by social stress. We have also observed that pretreatment with SB-277011-A inhibited the restoration of CPP caused by different types of physiological stress. At the molecular level, there were changes in the expression of DAT and D3R in the NAc shell after the relapse in CPP caused by cocaine *priming* and social stress. In addition, we have found that the Akt-mTOR signaling cascade could be coupled to D3R due to an increase in the expression of pAkt and pmTOR in the NAc after the relapse in CPP caused by cocaine *priming* and social stress. Relapse in CPP induced by cocaine *priming* or social stress modified D3R and DAT expression in BLA, but not in hippocampal DG. There was a decrease in mTOR activation in BLA and DG after reinstatement of CPP induced by cocaine *priming* or social stress.

In conclusion, our results suggest that D3R antagonism could be a pharmacological target in the prevention of stress-induced relapse in the

consumption of cocaine. Furthermore, present results are consistent with the hypothesis that D3R would play an important role in the reinstatement of cocaine-seeking.

Key words: addiction, cocaine, relapse, D3R, DAT, Akt, pmTOR.

INTRODUCCIÓN

I. INTRODUCCIÓN

La adicción a sustancias de abuso (drogas) supone en la actualidad un importante problema de Salud Pública, que perjudica tanto a las personas individualmente como a todo el conjunto de la sociedad a nivel mundial (1). De manera individual, aumentan las comorbilidades en enfermedades infecciosas (hepatitis, VIH, etc.), entre otros motivos, por interferir con el buen juicio y la toma de decisiones, potencialmente llevando a los consumidores a tener prácticas sexuales de riesgo, así como contribuir al desarrollo de afecciones clínicas tales como hipertensión, Insuficiencia Cardíaca (IC), artritis, neumonía, Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC), alteraciones del Sistema Nervioso Central (SNC), entre otras (2). Además, es especialmente preocupante la aparición de nuevas sustancias psicoactivas en la última década con efectos o perfiles de seguridad aún desconocidos para el abordaje de sus efectos secundarios a largo plazo o de las sobredosis (3). Esta situación de adicción a distintas sustancias suele llevar aparejado problemas económicos, familiares, laborales como el desempleo, pérdida de productividad o conflictos personales (4). Por tanto, uno de los principales problemas existentes, subyacente y común a las adicciones actualmente, es el desconocimiento de las bases neurobiológicas implicadas en las mismas y por tanto, la ausencia de terapias efectivas para su tratamiento, aunque en los últimos años se ha avanzado en el abordaje de los mecanismos moleculares que subyacen en la adicción.

En la actualidad, existe un consumo preocupante de este tipo de sustancias; un claro ejemplo de ello es la epidemia de opiáceos (en particular los derivados del fentanilo) y cocaína existente en Estados Unidos, responsable de 47.600 y 13.942 muertes por sobredosis, respectivamente, según los últimos datos disponibles del año 2017 del *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) (5) y del *National Institute of Drug Abuse* (NIDA) (6). En la base social de este problema convergen numerosos determinantes, entre los que podemos destacar la prescripción indiscriminada de opioides para el tratamiento del dolor, la síntesis de moléculas psicoactivas en laboratorios ilegales y el entorno del sujeto adicto.

La cocaína, objeto de nuestro estudio, es una sustancia ampliamente consumida como psicoestimulante, y constituye la droga estimulante ilegal más consumida en Europa, con mayor prevalencia en los países del sur y el oeste, como es el caso de España (7). Su abuso se asocia a múltiples secuelas físicas y psiquiátricas bien conocidas clínicamente y se carece de terapias que resulten efectivas en la prevención de uno de los aspectos más difíciles de abordar en materia de adicciones y que asocia una elevada morbilidad: las **recaídas** en el consumo. Los estudios de muchos años han sugerido que estas recaídas suelen ser provocadas por el estrés emocional y los sentimientos negativos que aumentan el deseo del consumo de cocaína en sujetos adictos (8), lo que avala la relación existente entre estrés y recaídas (9, 10).

1.1. Adicción a sustancias de abuso

La adicción a las sustancias de abuso (drogas), es un trastorno mental crónico y recurrente caracterizado por la búsqueda compulsiva de estas sustancias y la pérdida del control sobre su consumo, y se caracteriza por un riesgo muy elevado y mantenido en el tiempo de recaídas durante los periodos de abstinencia (11). En la actualidad, la adicción se considera una patología crónica, ya que como resultado de la pérdida del control inhibitorio a nivel de la corteza prefrontal (PFC) (12), los sujetos adictos son especialmente vulnerables a perder el autocontrol y a recaer, incluso después de años o décadas en abstinencia asintomática, estableciéndose así un círculo muy difícil de romper (13) (**Fig.1**). El deseo incesante de búsqueda de drogas (*craving*) viene acompañado de un intenso malestar y estado de ánimo disminuido que solo se verá resuelto cuando se vuelva a consumir (14). Actualmente se estima que la adicción a sustancias de abuso afecta al 10-15% de la población mundial. Entre los factores que influyen en los procesos adictivos se incluyen la predisposición genética, factores ambientales de riesgo, factores psicológicos, el tipo de droga y la edad de inicio en el consumo, así como la frecuencia de su uso. Además, una característica común en la adicción a drogas, como se ha

comentado anteriormente, es la alta tasa de recaídas durante la abstinencia y muchos estudios sugieren que estas recaídas suelen ser desencadenadas por el estrés (15). Los estudios experimentales sobre la relación existente entre estrés y consumo, pueden ser clasificados teniendo en cuenta a: a) el tipo de estrés: físico, ambiental, etc.; b) etapa en el ciclo de la adicción en la que se encuentre el sujeto (inicio, progresión, mantenimiento, recaída); c) método de medida para estudios experimentales [autoadministración, Preferencia Condicionada de Plaza, nombrado de aquí en adelante por sus siglas en inglés *Conditional Place Preference (CPP)*] (16).

Es posible explicar la adicción como un ciclo recurrente de tres estados: consumo inicial, abstinencia/sentimientos negativos y preocupación/anticipación (*craving*) (17). El individuo comienza con el consumo puntual de la droga, la cual activa a los sistemas neuronales de recompensa, provocando un estado placentero que lleva, en determinados casos, a que el consumo se repita para evitar las sensaciones negativas que se producen durante la abstinencia. A causa del uso repetido, se llega al estado de dependencia, necesitando mayor cantidad de dosis y menor tiempo entre consumo y consumo. En este estado crónico de la adicción se produce el síndrome de abstinencia cuando no se tiene acceso a la droga y en él aparecen los efectos desagradables como consecuencia de la actuación de los reforzadores negativos. Para contrarrestar estos efectos negativos, se produce un nuevo consumo, cerrando así el ciclo. Los tres estados se suceden cíclicamente, conllevando a neuroplasticidad en los diferentes circuitos neuronales, determinando así la conducta del adicto (18).

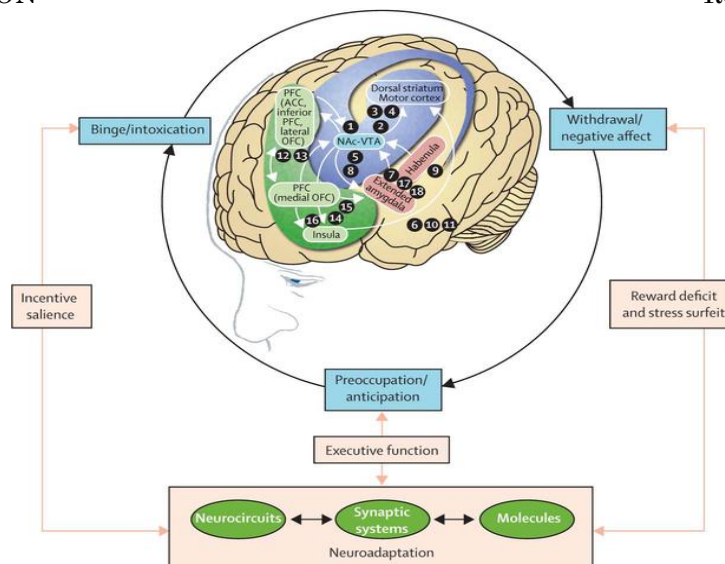


Figura 1. Ciclo de la adicción y áreas cerebrales implicadas. El ciclo tiene tres fases que se repiten cíclicamente: el consumo y sus efectos placenteros, la abstinencia y sus efectos negativos y finalmente la preocupación y búsqueda de droga (*craving*), lo que lleva a repetir el consumo (recaídas). Tomado de (5).

1.1.1 El problema de las recaídas

Este problema principalmente radica en que los sujetos, a pesar del intento de abandono del consumo a drogas, acaban recayendo (19). Esta tendencia a la recaída persiste después del cese de los síntomas físicos y afectivos de la abstinencia (20) pues, ocurre a menudo que los individuos adictos reciben señales asociadas que les recuerdan al consumo en el pasado. Por ello, las recaídas recientemente se han convertido en objeto prioritario de estudio en las adicciones ya que representa el principal obstáculo en el tratamiento y hasta el momento no existe farmacoterapia específica con eficacia para su prevención (21).

Las recaídas son, pues un punto común, y muy frecuentes, en todos los procesos adictivos. En modelos animales, uno de los procedimientos más extendidos para inducir un cese en el consumo de drogas (abstinencia) es la denominada *extinción*. Consiste en el aprendizaje por parte del consumidor de la desvinculación de las señales externas que habían estado asociadas al consumo de la droga (22). De este modo, los procesos que se programan de extinción de la conducta adictiva pueden ser beneficiosos para un sujeto adicto. Sin embargo, en diferentes estudios experimentales animales se ha comprobado que, ante ciertos estímulos asociados al consumo, aparece una

restauración en la búsqueda y consumo de la droga (reinstatement/recaída), lo que pone de manifiesto que las propiedades reforzantes de los estímulos condicionados son las que subyacen en las recaídas en el consumo, lo cual es extrapolable a lo que ocurre en humanos (23). Se ha comentado que la recaída durante la abstinencia, a menudo se desencadena por contextos o señales, incluso neutras, asociados a las drogas. De igual modo, tanto en la literatura clínica como en la preclínica, está bien establecido que la exposición a diversos tipos de estrés puede elevar el deseo de consumo y acelerar una recaída. Una forma particularmente potente de estrés, es el estrés en las relaciones interpersonales/sociales, pues, los individuos dependientes tienen una respuesta fisiológica elevada a las relaciones interpersonales estresantes en relación con los individuos no dependientes (16).

A pesar de ser un proceso ampliamente empleado, se ha podido constatar que la extinción no borra la memoria adictiva sino que parece generar una nueva memoria que inhibe y compite con la memoria condicionada original (24-26). Las “memorias” de extinción no sobrescriben los recuerdos iniciales, sino que están mediadas por circuitos anatómicamente diferentes (27, 28). Dado que los recuerdos no son eliminados, las recaídas continúan siendo posibles durante prolongados periodos de tiempo ya que en cualquier momento se podría producir una recuperación (*retrieval*) de la memoria asociada al consumo. Por ello, en la actualidad se buscan otros métodos (que pueden ir o no asociados a los procesos de extinción), para evitar las recaídas cuando el adicto se ve expuesto a señales que desencadenan la “memoria adictiva”, como se comentará más adelante.

1.2. Circuitos neuronales implicados en la adicción a drogas

Distintas estructuras cerebrales interaccionan entre sí determinando los aspectos que motivan al consumo de drogas, que comprenden en términos generales, a tres grupos de circuitos neuronales: A) sistema de recompensa o mesocorticolímbico, B) sistema de anti-recompensa y C) vías noradrenérgicas.

1.2.1 Sistema mesocorticolímbico o de recompensa

La vía de recompensa principal es la vía mesocorticolímbica, de naturaleza dopaminérgica. Es el sistema más estudiado, descubierto por Olds y Milner en el año 1954 y que relacionaron con la motivación y recompensa (29). Las conexiones dopaminérgicas de este circuito van desde el área tegmental ventral (VTA) del mesencéfalo, donde se encuentran los somas de las neuronas dopaminérgicas, a estructuras límbicas como el núcleo accumbens (NAc), núcleo central y basolateral de la amígdala (CeA, BLA, respectivamente), hipocampo y varias regiones de la PFC, donde se libera dopamina (DA) (30) (**Fig.2**). Todas estas "regiones de recompensa cerebral" están interconectadas de una forma compleja en el que el NAc recibe una inervación glutamatérgica densa de la PFC, la amígdala y el hipocampo; y la PFC, la amígdala y el hipocampo forman conexiones glutamatérgicas recíprocas entre sí. La producción funcional de cada una de estas regiones está modulada por varios tipos de interneuronas gabaérgicas y, en el NAc, también por interneuronas colinérgicas. Además, cada una de estas regiones recibe entradas serotoninérgicas del núcleo rafe del mesencéfalo y entradas noradrenérgicas del locus coeruleus pontino, y varias están inervadas por sistemas de péptidos hipotalámicos. Finalmente, existe evidencia de que las neuronas VTA "dopamina" también liberan glutamato o ácido α -aminobutírico (GABA), lo que puede contribuir a sus efectos funcionales (31).

Además de la DA, como se ha comentado, se ha propuesto la implicación de otros neurotransmisores como la noradrenalina (NA), glutamato, endocannabinoides, GABA, péptidos opioides endógenos (POE), factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) y orexinas, en la adicción (32). La eliminación de DA a nivel de NAc o lesiones en el VTA reducen la motivación en la búsqueda de recompensas. Por el contrario, el aumento de DA a estos niveles parece que se aumenta el esfuerzo que el adicto está dispuesto a realizar para obtener recompensas (33). Por tanto, la importancia clínica de esta vía, entre otras, se debe al papel fundamental que desempeña en la neurobiología de la adicción, puesto que todas las sustancias de abuso activan el sistema de recompensa, facilitando, mediante diferentes mecanismos de

acción, el aumento de DA en los núcleos inervados por este sistema (34). Este incremento es el responsable del origen de la formación de las conductas adictivas.

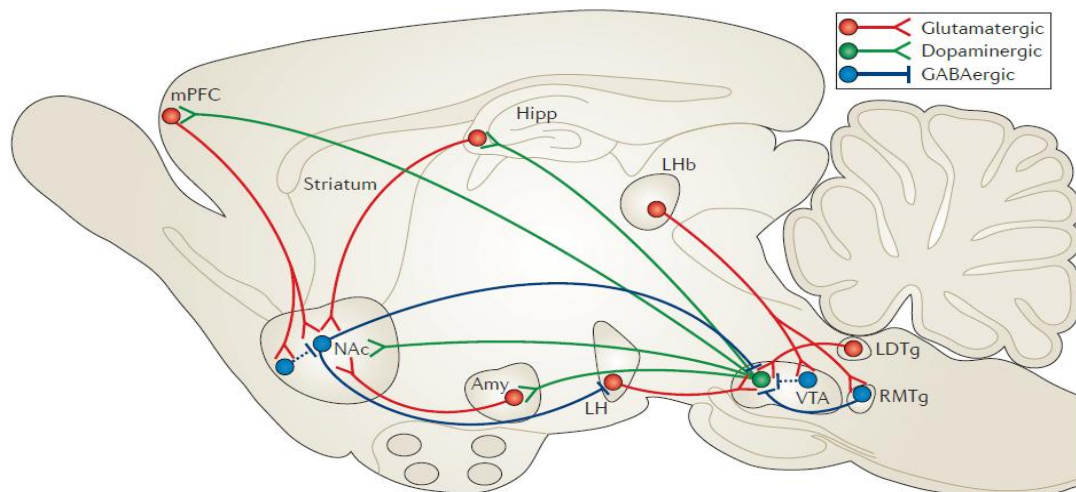


Figura 2. Sistema mesolímbico y vías de recompensa: Vía mesocorticolímbica (vía de recompensa). Tomado de (20).

Las neuronas del NAc también reciben proyecciones desde neuronas glutamatérgicas del hipocampo, la amígdala y el córtex medial prefrontal (35) (**Fig.2**). A lo largo de la escala filogenética, el cerebro ha ido desarrollando circuitos neuronales que aseguran la supervivencia de las especies, de modo que, la existencia de esta vía de recompensa justifica la satisfacción y placer por conductas que son críticas para dicha supervivencia, ya que nos motivan a repetirlas, como por ejemplo comer, beber o las relaciones sexuales (17) (reforzadores naturales que responden a una necesidad de mantener una homeostasis de los niveles de DA). Por tanto, el neurotransmisor principal implicado en los efectos reforzadores de sustancias de abuso es la DA, por lo que una activación de los sistemas de recompensa conlleva una liberación de la misma en las áreas inervadas por el VTA (18).

Por otra parte, durante el uso crónico de drogas se produce el fenómeno denominado tolerancia, consecuencia de una serie de fenómenos adaptativos neuronales (36) en el sistema mesocorticolímbico que compensaría el aumento en la intensidad de las señales de la neurotransmisión que la droga modifica.

Por ejemplo, el cerebro responde a los elevados niveles de DA en parte reduciendo el número de receptores dopaminérgicos, aliviando de este modo la sobreestimulación, pero también contribuyendo al desarrollo de la dependencia de las drogas (37). En este caso, la droga va siendo cada vez menos efectiva, reduciéndose progresivamente la función basal dopaminérgica. Actualmente la tolerancia no tiene tanta importancia en los procesos adictivos en relación con lo propuesto hace años, ya que no se considera un factor característico de la dependencia.

El síndrome de abstinencia aparece al suspender el consumo de una droga que previamente ha generado un cuadro de dependencia. Este síndrome puede producirse por la interrupción o disminución en el consumo, desenmascarando todos los procesos adaptativos inducidos por la droga a lo largo de su consumo. Esta etapa se caracteriza por una disminución de la actividad dopaminérgica mesocorticolímbica, junto con una activación del sistema cerebral del estrés, constituido por la amígdala extendida y el eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (HHA) produciéndose una elevación del factor liberador de corticotropina (CRF), dinorfinas (DYN) y NA, que en definitiva son los responsables de los efectos desagradables que origina la privación a las drogas (38).

1.2.2 Sistema anti-recompensa

Se ha evidenciado que el estrés afecta al aprendizaje y procesos de memoria (39), procesos críticos para los procesos adictivos y para las recaídas como se comentará en el siguiente epígrafe. Las principales estructuras cerebrales relacionadas con el estrés son la amígdala extendida y el eje HHA.

Se ha demostrado que la amígdala extendida participa tanto en los síntomas físicos de la abstinencia, como en los estados emocionales negativos que impulsan a la búsqueda, uso compulsivo y recaídas a las drogas. Del mismo modo, el eje HHA desempeña un papel fundamental en el estrés y comportamiento de búsqueda de drogas, fundamentalmente a través del neurotransmisor CRF (35). Por lo tanto, la exposición al estrés provoca la

síntesis de CRF a dos niveles; la amígdala extendida (sistema de estrés extrahipotalámico) y el núcleo paraventricular del hipotálamo (PVN).

1.2.2.1 Sistema del estrés extrahipotalámico:

La amígdala extendida está compuesta por el núcleo del lecho de la estria terminal (BNST), CeA y NAc (35). Recibe numerosas aferencias de estructuras límbicas y envía proyecciones a la parte medial del pálido ventral y al hipotálamo lateral (40) (**Fig.3**), y uno de sus neurotransmisores es el CRF extrahipotalámico [que no participa en la liberación de la hormona adrenocorticotropa (ACTH) hipofisaria ni, por tanto, de corticoides por la corteza suprarrenal].

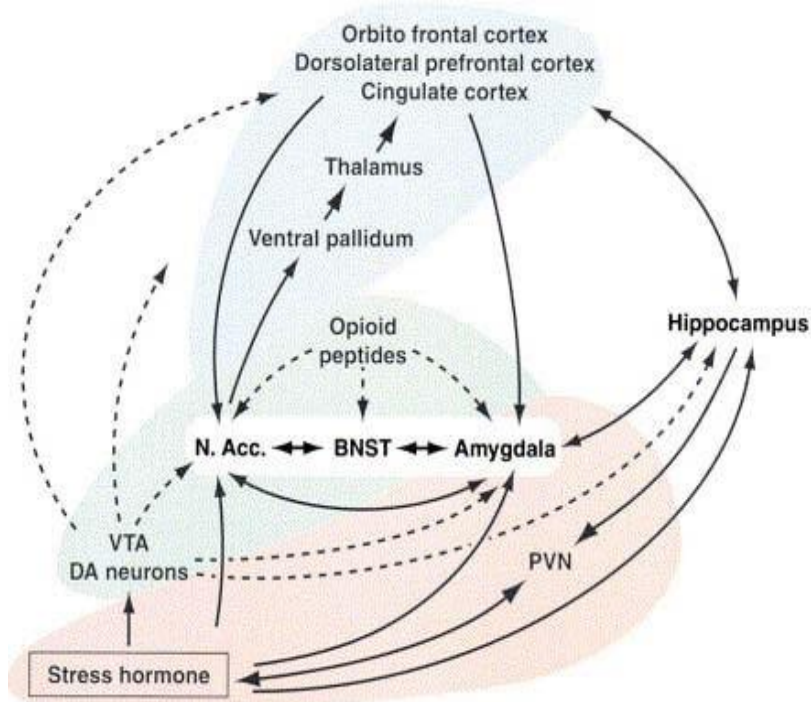


Figura 3. Diagrama que ilustra el **circuito de la amígdala extendida** como mediador de la alostasis en la adicción a drogas. El eje HHA y el sistema cerebral de estrés promueven la disregulación del circuito de recompensa; y expresando y perpetuando la búsqueda compulsiva de la droga se haya el circuito cortico-talámico-estriado. Tomado de (40).

1.2.2.2 Sistema de estrés hipotalámico:

El eje HHA (**Fig.4**) es un sistema neuroendocrino complejo con funciones relacionadas con la adaptación a situaciones estresantes. Está

compuesto por el PVN del hipotálamo, el lóbulo anterior de la hipófisis y la corteza de las glándulas suprarrenales. El CRF es sintetizado en el PVN ante situaciones de estrés, estimulando la síntesis y secreción de la ACTH al unirse a sus receptores en la hipófisis anterior. La ACTH a su vez induce la síntesis y liberación de glucocorticoides de la corteza suprarrenal al torrente sanguíneo (cortisol en humanos, y corticosterona en roedores) (41). Anatómicamente, los receptores para glucocorticoides se encuentran localizados en múltiples áreas del SNC, incluyendo a los circuitos de recompensa. Diferentes estudios han demostrado que durante los periodos de la abstinencia a drogas, como cocaína, anfetaminas, nicotina y opiáceos, entre otras, se induce la activación de este eje, cuya consecuencia final es la liberación de glucocorticoides que son potentes reguladores de todos los sistemas fisiológicos de los mamíferos, incluido el SNC (42).

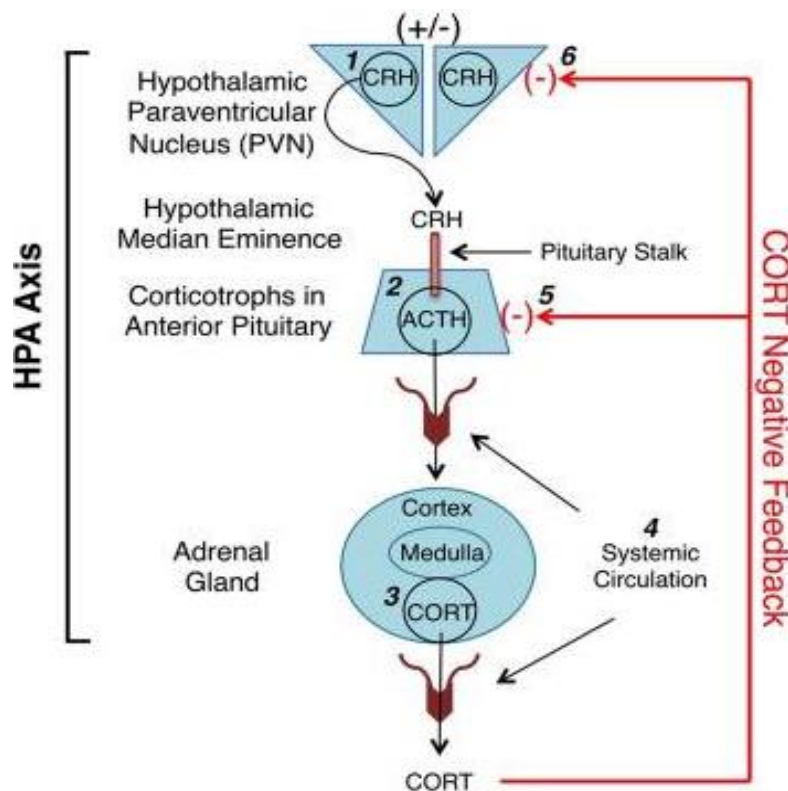


Figura 4. Eje HHA. Modificado de (41).

1.2.3 Vías noradrenérgicas

El sistema noradrenérgico consiste en dos proyecciones principales ascendentes: una parte dorsal y otra ventral. La parte dorsal se origina en el locus coeruleus (LC) y proyecta hacia el hipocampo, mientras que la parte ventral la conforman un número de núcleos de la protuberancia y médula y proyecta al hipotálamo, mesencéfalo, y amígdala extendida (**Fig.5**). El neurotransmisor principal es la NA, que es producida principalmente por el LC en el tronco cerebral, y también por la médula adrenal. Se sintetiza a partir de DA por la enzima dopamina β -hidroxilasa. La NA, así como la adrenalina, es un ligando para los receptores adrenérgicos acoplados a proteínas G. La NA es básicamente un neurotransmisor del estrés y, como consecuencia, existe cierta relación entre el sistema noradrenérgico y la adicción. Los receptores adrenérgicos α -1 controlan una vía neural responsable de la liberación de DA en el NAc (43). Además, las neuronas noradrenérgicas modulan el patrón de activación de la liberación de DA a través de los adrenoreceptores α -1 postsinápticos excitadores (44). La liberación de DA en la PFC está regulada por terminales nerviosas noradrenérgicas locales, y la estimulación eléctrica de las neuronas del LC aumenta tanto la DA extracelular como la NA en la PFC (45, 46). Por otro lado, la NA también aumenta la liberación de CRF en diferentes núcleos como PVN, BNST y CeA (17), y este CRF induciría la liberación de NA por las áreas noradrenérgicas del tronco encefálico (sistema de retroalimentación). Se ha observado la expresión del receptor 1 del factor liberador de corticotropina (CRF1R) en las neuronas catecolaminérgicas VTA, LC y núcleo del tracto solitario (NTS) (47). Los aferentes noradrenérgicos del NTS a la amígdala extendida y PVN median no solo el desarrollo de los efectos motivadores de la abstinencia, sino también el restablecimiento inducido por el estrés del comportamiento de búsqueda de drogas (48, 49).

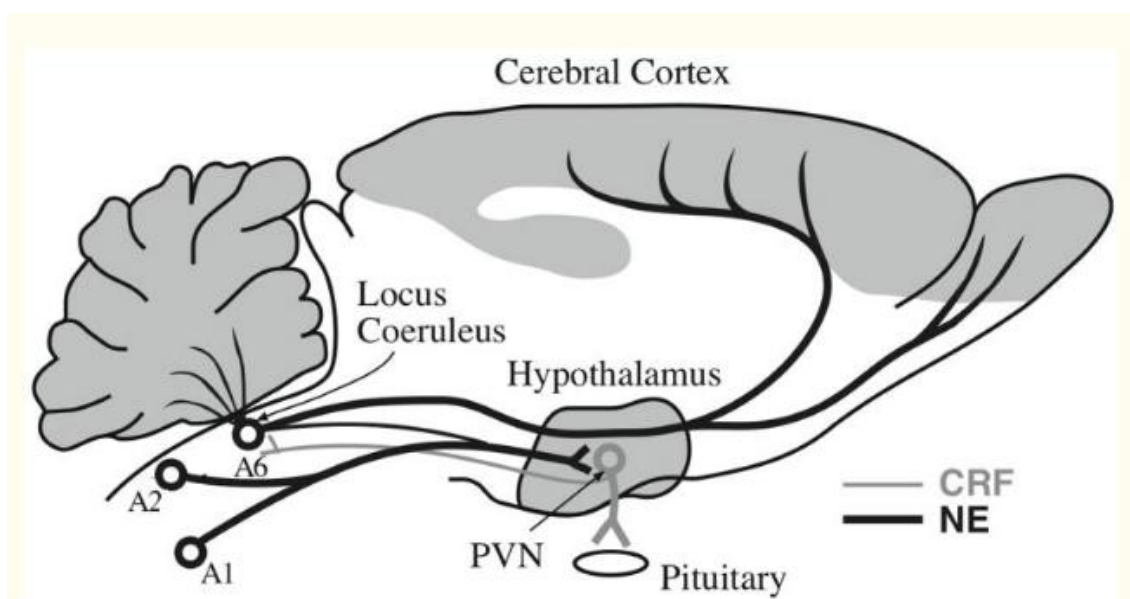


Figura 5. Diagrama que ilustra las dos proyecciones principales del sistema noradrenérgico, el sistema de locus coeruleus dorsal (LC, A6) y el sistema ventral A1/A2 y sus interacciones con el núcleo PVN de la hipófisis, neuronas que contienen factor liberador de corticotropina (CRF). El circuito entre el PVN y el LC, A6 es una excitación positiva recíproca que modula la respuesta del cuerpo al estrés. Tomado de (50).

1.3. Memoria, aprendizaje y adicción

La adicción, es un hecho que no ocurre de forma repentina, ya que el consumo crónico de sustancias de abuso comienza por el aprendizaje del efecto placentero que la sustancia produce, aumentando de este modo, el deseo de consumirla de nuevo. Con el tiempo, determinadas señales ambientales o contexto se asocian con el consumo de la droga (como lugares, olores, personas, etc.), hasta que por sí mismas, son suficientes para estimular el deseo del consumo (*craving*). Así pues, actualmente se acepta que la adicción es un aprendizaje de tipo pavloviano (51). En este sentido, se ha podido constatar que las drogas alteran y potencian los procesos normales de aprendizaje y memoria, usurpando estos sistemas a través de sus acciones farmacológicas en los diversos sistemas de neurotransmisores y produciendo señales artificialmente placenteras de mayor magnitud y duración que las que producen los estímulos naturales.

El aprendizaje, potenciado sobre la experiencia positiva de la droga, resulta en una mayor probabilidad de consumirla de nuevo, por tanto, el efecto se potencia cada vez que se produce un nuevo consumo (52, 53). Las sustancias de abuso no sólo aumentan el aprendizaje de los efectos positivos de la droga, sino que también eclipsan y disminuyen el impacto de otros elementos del entorno, lo cual resulta en una mayor atención hacia el consumo a costa de las actividades normales (52). Estas asociaciones formadas entre el contexto y las drogas, son un obstáculo importante en el tratamiento de la adicción, ya que los estímulos condicionados pueden actuar como desencadenantes e iniciar el ansia del consumo incluso después de períodos prolongados de abstinencia. En conclusión, actualmente se acepta que la adicción es un comportamiento condicionado de tipo pavloviano (54), en el que diferentes estímulos asociados (55) previamente con la droga son capaces de desencadenar la conducta de búsqueda y consumo en sujetos abstinentes (56, 57), esto implica a determinados contextos ambientales presentes o relacionados con el consumo, tales como olores, el lugar donde se consumía o la gente con la que se hacía. La posterior exposición a dichos estímulos desencadenaría un intenso *craving* incluso después de largos periodos de abstinencia (58), que terminaría en la recaída. Por otra parte, durante la adicción se produce un claro solapamiento entre los mecanismos moleculares implicados en el aprendizaje y la memoria normal (**Fig.6**) y las acciones farmacológicas de las drogas, por lo que se ha propuesto que la adicción se produce, al menos en parte, por un proceso aberrante de los procesos de aprendizaje y memoria (59-61). La adicción es pues, un trastorno complejo, caracterizado por la alteración de los circuitos de aprendizaje/memoria, que constituyen la base neurofisiológica de los procesos de búsqueda y consumo de droga.

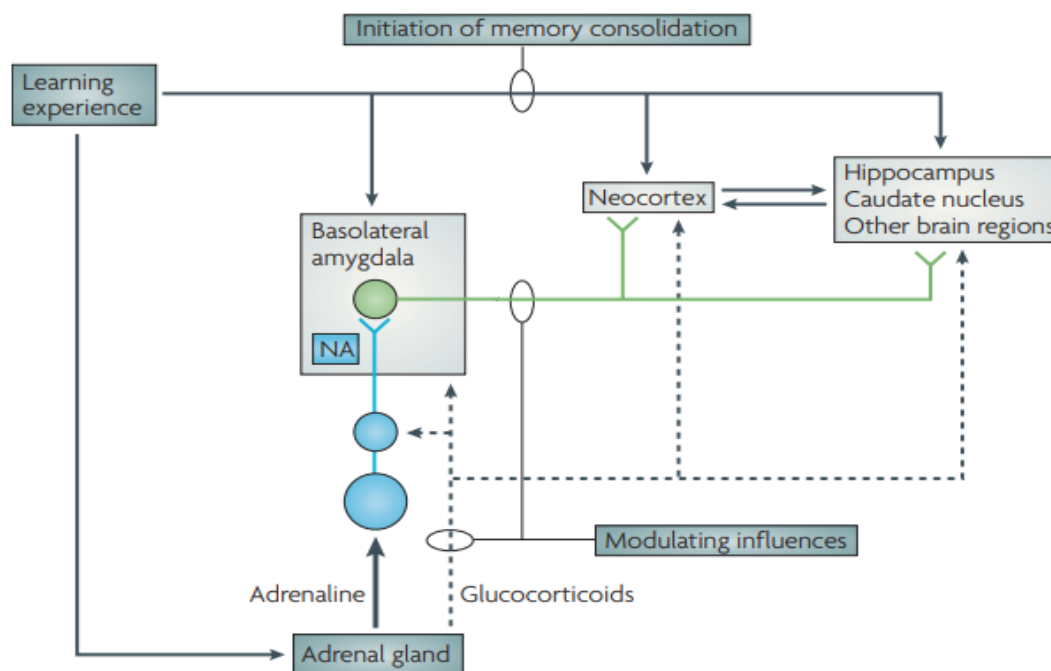


Figura 6. Modulación de la consolidación de la memoria inducida por un estímulo emotivo. Tomado de (62).

1.3.1 Circuitos que regulan los procesos de aprendizaje y memoria

Nuestros cerebros están diseñados para aprender sobre nuestros entornos y recuperar información precisa del almacenamiento de memoria, ya que es fundamental para la supervivencia. Muchos factores pueden influir en la eficacia con la que un individuo adquiere y almacena nueva información, incluida la disponibilidad de recursos de atención, motivación y excitación. Las drogas de abuso pueden afectar positivamente a todos estos factores, aumentando la atención, la motivación y la excitación, de modo que los comportamientos que conducen al uso de drogas y los estímulos encontrados durante la exposición a las drogas están fuertemente codificados. La capacidad de las sustancias de abuso para aumentar la señalización de DA y la señalización de otros sistemas de neurotransmisores involucrados en el aprendizaje y la memoria explican esta capacidad frecuentemente mencionada de las drogas para "secuestrar" los sistemas cerebrales normales (63-65).

Durante el período inicial de consumo de drogas se forman recuerdos débiles relacionados con el consumo que pueden volverse más fuertes cuando el uso es repetido y sobre todo cuando el consumo se vuelve compulsivo. Sin embargo, la mayoría de las personas que padecen una adicción eventualmente reconocen que tienen un problema y dejarán de consumir durante un tiempo. Desafortunadamente, la mayoría de las personas en algún momento recaen y finalmente sufren múltiples ciclos de abstinencia y recaída a lo largo de sus vidas. En este punto, los fuertes recuerdos sobre las personas, los lugares y las cosas (es decir, las señales) asociadas con el uso de drogas pueden inducir antojo o "falta" de drogas que promueven la recaída (66) (52). Además, estas señales también pueden iniciar los comportamientos habituales subconscientes asociados con la obtención y el consumo de drogas, que aumenta aún más la probabilidad de recaída (67). Por tanto, el tratamiento exitoso de los trastornos adictivos puede requerir un enfoque que aborde los cambios neurobiológicos en los sistemas de aprendizaje y memoria que se producen como parte del proceso adictivo.

Una característica de los trastornos adictivos es que el uso de sustancias se vuelve más importante que las relaciones interpersonales, el trabajo u otras actividades. Se ha planteado la hipótesis de que este cambio en la elección de las drogas sobre las recompensas naturales puede estar parcialmente mediado por la fuerza competitiva de los recuerdos asociados con las drogas, que eclipsaría los recuerdos asociados con otras recompensas. Por lo tanto, se podría predecir que las memorias asociadas a drogas se codifican más fuertemente o se recuperan más fácilmente que otras formas de memoria, hecho que se ha comprobado en la actualidad. Sin embargo, existen varias pruebas indirectas que apoyan dicha hipótesis. Por ejemplo, en un estudio que compara la respuesta cerebral de individuos que usan cocaína con los controles, cuando se enfrentan a un estímulo sexualmente excitante versus un estímulo de cocaína, los individuos que usan cocaína mostraron una respuesta muy disminuida al estímulo sexual en relación con los controles, pero mostraron una activación cerebral robusta cuando se presenta con un estímulo asociado a la cocaína (68). Por lo tanto, los recuerdos asociados con la cocaína pueden ser tan fuertes que eclipsan los de las recompensas naturales.

Tradicionalmente, la adquisición, la consolidación y la recuperación se han considerado las tres piedras angulares del proceso de aprendizaje y memoria. Sin embargo, más recientemente, la investigación ha examinado qué sucede con los recuerdos durante y después de la recuperación. Varios estudios han establecido que durante el proceso de recuperación de información del almacenamiento a largo plazo, la memoria se “desestabiliza”. Es decir, los mecanismos moleculares que soportan la memoria se reactivan y la memoria se vuelve inestable y lábil. Una vez que la memoria se desestabiliza, se restaura o se "reestabiliza" en la memoria a largo plazo en un proceso denominado reconsolidación, que requiere muchos de los mismos mecanismos moleculares esenciales para la consolidación inicial.

Como se ha comentado anteriormente, la formación de recuerdos adictivos de drogas refleja la usurpación de los procesos de aprendizaje y plasticidad que normalmente subyacen al aprendizaje de las asociaciones entre los estímulos ambientales y reforzadores naturales. La consolidación de los recuerdos asociados a las drogas y la plasticidad asociada a la adicción ha sido revisada previamente por distintos autores (69, 70).

Entre las estructuras neuronales claves en la memoria y aprendizaje relacionadas con la adicción se encuentran la amígdala, el hipocampo, el NAc y la PFC. La PFC lleva acabo funciones ejecutivas, de habilidad y aptitudes para la evaluación y la toma de decisiones y también está relacionada con la memoria de trabajo y adaptación al medio. Actualmente se sabe que en los procesos adictivos esta área se inhibe y puede llevar a una pérdida del control sobre la conducta. La BLA está implicada en la memoria emocional y el hipocampo juega un papel de mediación entre la generación y recuperación de recuerdos, muy importante para la consolidación de la memoria a corto y sobre todo a largo plazo, contextual, espacial y en menor medida emocional. La amígdala y el hipocampo funcionan sinérgicamente para formar memoria a largo plazo (71). El conocimiento del circuito neuronal específico entre la amígdala y el hipocampo nos ayuda a comprender los mecanismos cerebrales

de los recuerdos regulados por las emociones y conocer los trastornos de la memoria asociados a las emociones en los adictos (**Fig. 6**).

1.3.2 Estrés, memoria y recaídas en el consumo

Existe una relación entre los procesos de memoria, estrés y adicción. Diferentes modelos animales sugieren la existencia de una interacción entre el estrés y los comportamientos de búsqueda y consumo de drogas (72). Así, se ha comprobado que tanto el estrés agudo como el crónico aumentan el consumo de psicoestimulantes, opioides y alcohol. Además, el estrés restaura la búsqueda de droga en animales que habían extinguido previamente la conducta de abuso (73). Con respecto a los circuitos neuronales implicados en este proceso, cabe destacar que un tipo de estrés, como es el social, aumenta la actividad de las neuronas dopaminérgicas del VTA, que se ve reflejado en aumento de liberación de DA en el NAc. Se ha podido comprobar que el VTA es requerida para la recaída de la conducta de la búsqueda de drogas inducida por estrés (73). En el VTA convergen una serie de áreas esenciales para el restablecimiento de la conducta adictiva, como el BNST, amígdala, hipocampo y PFC, dato que sugiere que el VTA puede ser un área crucial en los procesos de estrés y consumo de drogas (73).

Por otro lado, en el contexto del estrés, es importante destacar el papel del eje HHA, y la consecuente liberación de glucocorticoides, así como de CRF. El estrés, que activa el eje HHA, potencia los circuitos mesocorticolímbicos de recompensa, mediante la liberación de glucocorticoides que estimulan VTA y por tanto la liberación de DA. Existen receptores específicos para glucocorticoides en diferentes áreas cerebrales; como amígdala, hipocampo, etc., en estructuras altamente relacionadas con los procesos de memoria y adicción (8). Así mismo, las experiencias estresantes y emocionales activan los sistemas hormonales y cerebrales que crean fuertes recuerdos (74, 75). Una amplia evidencia indica que la activación noradrenérgica de la BLA inducida por una excitación emocional, está crucialmente involucrada en el fortalecimiento de la consolidación de la memoria a largo plazo (74), pero también juega un

papel crítico para permitir los efectos potenciadores de las hormonas del estrés suprarrenal (adrenalina y glucocorticoides) y también NA en la consolidación de la memoria (76-78). Muchos estudios previos han investigado cómo dicha activación de la BLA mejora la consolidación de la memoria al influir en la plasticidad neuronal y los procesos de almacenamiento de información dentro de regiones específicas, como el hipocampo (74, 79-81). La evidencia acumulada de los estudios de activación cerebral indica que las condiciones excitantes aumentan la activación de redes neuronales a gran escala (82, 83) y también afectan numerosas interacciones funcionales entre regiones cerebrales más allá de la amígdala (84).

Las recaídas constituyen el principal problema clínico de la adicción a sustancias de abuso, tanto por su frecuencia -la gran mayoría de los adictos recaerán en algún momento de su vida- como por la morbimortalidad que asocian. Cuando un sujeto consume una sustancia de abuso por primera vez, se produce una hiperactivación de la vía mesocorticolímbica, que desemboca en una sensación extremadamente placentera debida a la liberación y acciones de la DA en el NAc. La repetición progresiva de dicha acción provoca que las experiencias positivas asociadas al consumo queden almacenadas en la memoria a largo plazo, como consecuencia de cambios estructurales que tienen lugar a nivel de las dendritas de diversas áreas del sistema límbico -como en hipocampo-, así como de la modificación de sinapsis -mediante la potenciación a largo plazo (LTP) y depresión a largo plazo (LTD)- (procesos de neuroplasticidad) (85). Todo ello resulta en el aprendizaje y memorización de los efectos positivos derivados del consumo de la droga, que pasa a ser la principal motivación del adicto, mientras que el resto de estímulos cotidianos pasan a un segundo plano y dejan de producirle placer alguno (16). Así pues, existe un alto grado de solapamiento entre los procesos neurobiológicos subyacentes al aprendizaje y aquellos relacionados con la adicción (86).

Experimentalmente, el modelo de extinción-restauración ha sido utilizado en el estudio de las recaídas en animales. Este modelo trata de eliminar la asociación entre estímulo condicionado ambiental y estímulo no condicionado-sustancia de abuso-, disminuyendo los comportamientos de búsqueda de

droga (27). Sin embargo, este nuevo aprendizaje no suprime ni sobrescribe la memoria previamente adquirida, sino que simplemente se olvida, por lo que a través de determinados estímulos externos ambientales o internos -estrés- se puede producir una restauración -recaída- de la conducta de abuso (54).

En todo este proceso de aprendizaje y memoria juega un papel central la BLA, principal regulador e integrador de los efectos del estrés y otras emociones en la memoria. Los distintos neurotransmisores asociados al estrés permiten la consolidación de la memoria a través de acciones que implican a esta estructura (39) y a otras muchas áreas límbicas (**Fig.7**).

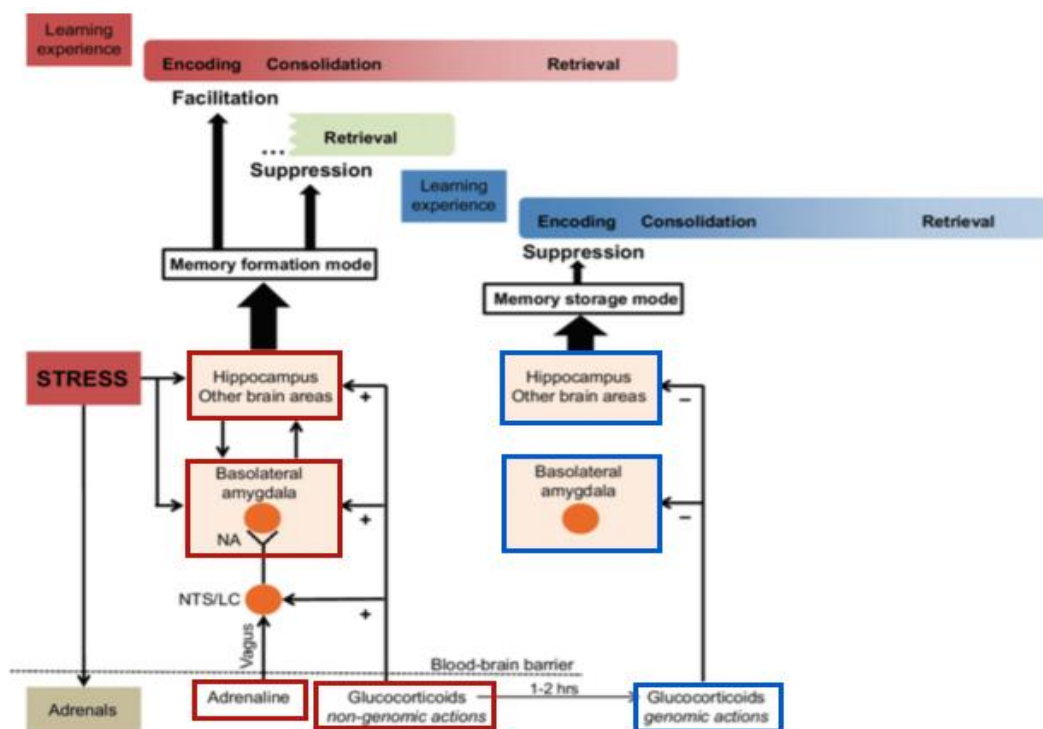


Figura 7. Relación entre estrés y memoria. La acción de los glucocorticoides, adrenalina y NA, a través de la BLA, permiten la formación y almacenamiento de memoria en el hipocampo. Modificado de (29).

Otra estructura involucrada en los procesos de aprendizaje y memoria es el hipocampo. El giro dentado hipocampal (DG), que recibe múltiples aferencias a través de la corteza entorrinal, desempeña un papel primordial en dichos procesos. Una de estas aferencias es la transmisión dopaminérgica procedente de VTA, que en esta región es fundamental para la inducción de LTP (87). Además, una peculiaridad del DG es que es una de las pocas regiones

cerebrales donde se sigue produciendo neurogénesis en la edad adulta (88, 89). Estudios recientes han propuesto que dicha capacidad favorecería la acción de la cocaína sobre los procesos de aprendizaje condicionado, pues se trata de neuronas todavía inmaduras altamente sensibles a neurotóxicos (90). También ha sido propuesto que las alteraciones estructurales a este nivel (del hipocampo) mediadas por metanfetamina juegan un papel fundamental en las recaídas a dicha sustancia (91).

Actualmente es conocida la existencia de un intercambio de información o *cross-talking* entre la BLA y el DG (**Fig.6**), de forma que se regulan recíprocamente (39). Ambas regiones contienen diversos tipos de neuronas, si bien cuantitativamente destacan las glutamatérgicas. La exposición a sustancias de abuso altera la transmisión glutamatérgica (92), la cual, a través de los receptores N-metil-D-aspartato (NMDA), regula a una quinasa denominada mTORC-1 que más adelante será comentada (93). También se ha identificado que la señalización glutamatérgica postsináptica es el mecanismo responsable de regulación de la recuperación de recuerdos asociados a señales externas o *drug-cue memory* (94), por lo que dicho neurotransmisor podría estar implicada en las recaídas. No obstante, los mecanismos neurobiológicos que subyacen en los procesos de memoria y aprendizaje no están totalmente establecidos.

1.4. Adicción a cocaína

La cocaína es una de las drogas ilegales adictivas más potentes, por ser un fuerte estimulante del SNC (95); es altamente consumida, produciendo graves consecuencias orgánicas, psiquiátricas y sociales, lo que supone un importante problema de Salud Pública (96).

La recaída en su consumo es uno de los problemas más difíciles en el tratamiento de su adicción, por lo que el estudio para identificar los mecanismos neurobiológicos que subyacen en la misma, es un paso crítico

para el desarrollo de tratamientos efectivos para prevenirla (12). Por tanto, hay una clara necesidad de investigación innovadora dirigida a identificar nuevos mecanismos neurobiológicos subyacentes.

La cocaína es una droga nativa de las tierras altas andinas de América del Sur, siendo Colombia su principal país productor (97). Los nativos de esta región mastican o preparan hojas de coca en té para refrescarse y aliviar la fatiga, similar a las costumbres de masticar tabaco y beber té o café en otras culturas (98). La cocaína pura se aisló por primera vez en la década de 1880 y se usó por primera vez como anestésico local en cirugía ocular. Fue particularmente útil en la cirugía de nariz y garganta debido a su capacidad para proporcionar anestesia y contraer los vasos sanguíneos, lo que limita el sangrado. La cocaína era legal y ampliamente utilizada en los Estados Unidos a finales del siglo XIX y era un ingrediente principal de la Coca-Cola original (99). Después de ser ilegalizada, de nuevo su popularidad comenzó en Estados Unidos en la década de los 70 y 80 cuando su consumo empezó a ser tan extendido que su adicción fue considerada como una epidemia. La lucha contra esta droga en este país hizo que gran parte de su distribución se desviara hacia Europa en torno al año 2000 (100). En concreto, España se convirtió en uno de los países distribuidores para su contrabando al mismo tiempo que de los más consumidores de Europa, pues según el último informe del Observatorio Europeo sobre drogas de 2019 (7), es la segunda droga más consumida tras el cannabis, sobre todo en adultos jóvenes.

1.4.1 Mecanismo de acción de la cocaína

La cocaína es un alcaloide que se obtiene de las hojas de un arbusto de la especie *Erythroxylum coca*. Su gran capacidad de absorción a través de las mucosas hace que las principales vías de administración sean oral, nasal, intravenosa y pulmonar (101). De este modo esta sustancia pasa directamente al torrente circulatorio, atravesando con facilidad la barrera hemato-encefálica (BHE) llegando así al SNC, donde ejerce su acción principal actuando como simpáticomimético de acción indirecta impidiendo la recaptación presináptica de DA y NA, mediante el bloqueo de los transportadores de la DA (DAT) y NA

(NET), produciendo así un aumento de ambos neurotransmisores en la hendidura sináptica (102, 103) de distintas estructuras del sistema límbico, como el núcleo NAc (**Fig.8**). El aumento masivo de la biodisponibilidad de DA en la hendidura sináptica hace que se alcancen niveles suprafisiológicos, que conllevan a una activación de los receptores postsinápticos en NAc, mediando la euforia que se produce tras el consumo.

Por otra parte, otros efectos farmacológicos de esta droga se deben al aumento de NA, a nivel periférico como es el incremento de la tensión arterial, midriasis, sudoración (mediados por receptores α -1 adrenérgicos) así como el aumento del rendimiento en las tareas de vigilancia y estado de alerta, una sensación de autoconfianza, euforia y estado de bien estar (103).

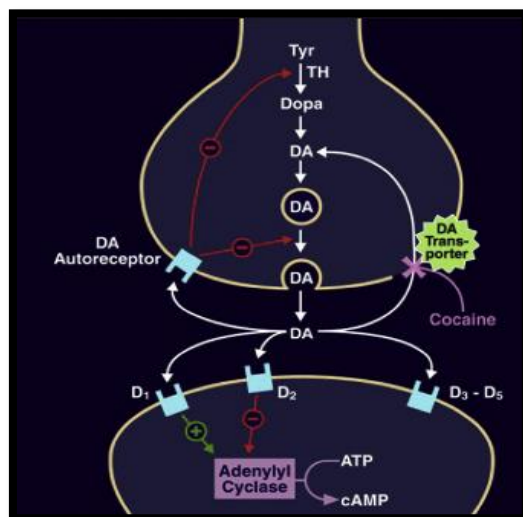


Figura 8. Mecanismo de acción de la cocaína. Modificado de (104)

1.4.2 Manifestaciones clínicas y toxicidad de la cocaína

Las manifestaciones clínicas se deben a la acción de esta droga sobre distintos órganos, SNC y aparato cardiovascular fundamentalmente (**Tabla 1**);(105). Más de 20 mg inyectada o esnifada es potencialmente mortal, sin embargo por vía oral se necesitaría en torno a 1 gramo o más. Se estima que la DL50 está en torno a los 2 gramos, pero las personas con una adicción crónica pueden tolerar hasta 10 gramos al día sin presentar toxicidad.

Se debe sospechar la existencia de sobredosis en todo paciente joven que consulte por ansiedad, agitación, palpitaciones, etc. y que presente midriasis, sudoración, taquicardia e hipertensión arterial. Además, hay otros aspectos importantes a tener en cuenta en la orientación diagnóstica, como la presencia de atrofia o ausencia de tabique nasal, lo que indicaría que podría tratarse de un consumidor crónico por vía nasal; presencia de marcas de quemaduras o áreas hiperqueratósicas en la yema del pulgar, lo que indicaría un posible consumo de pipa de crack. Ante manifestaciones clínicas muy graves, hay que descartar mediante radiografía de abdomen que el paciente sea un transportador (*body-packer* o *body-stuffer*) (106).

Uno de los problemas más difíciles de detectar y que es muy frecuente, son los problemas relacionados con la adulteración de la cocaína. La sustancia más empleada es el levamisol (antihelmíntico) que puede producir agranulocitosis, leucoencefalopatía o vasculitis cutánea. Otras sustancias empleadas en menor medida son el clenbuterol (agonista β -adrenérgico) y fentanilo (107-110).

En el caso de mujeres embarazadas, una sobredosis se asocia con desprendimiento de placenta.




ÓRGANO DIANA	MANIFESTACIONES	CLÍNICA (más característica)
SNC 	LEVE	Agitación, ansiedad y/o crisis de pánico, midriasis, mioclonías y movimientos coreoatetósicos, psicosis con rasgos paranoides, conducta violenta
	GRAVE	Paresia motora, afasia, focalidad neurológica, crisis convulsiva, status convulsivo, coma
CARDIOVASCULAR 	LEVE	Palpitaciones, hipertensión, taquicardia sinusal, arritmia supraventricular
	GRAVE	Síndrome coronario agudo, arritmia ventricular maligna (riesgo de parada cardíaca), hipotensión, shock cardiogénico
RESPIRATORIO 	LEVE	Hemoptisis, neumotórax, neumomediastino / neumopericardio
	GRAVE	Edema agudo de pulmón no cardiogénico, tromboembolismo pulmonar
OTROS	GRAVE	Rabdomiolisis (frecuente), hipertermia, isquemia intestinal y hepática, oligoanuria, fracaso multiorgánico

Tabla 1. Principales órganos afectados por el consumo de cocaína. Modificado de (32).

La cocaína se metaboliza, en parte, en el plasma a través de la enzima pseudocolinesterasa. La mayor parte de la droga es metabolizada en el hígado dando lugar a norcaína y benzoilecgonina, metabolitos activos que se excretan por la orina (111). En caso de consumo simultáneo de cocaína y alcohol etílico, se forma cocaetileno, un metabolito que es más tóxico para el cerebro y corazón que la cocaína por sí sola. Es posible verificar el consumo de esta droga mediante orina (método más utilizado), saliva, sangre, cabello o sudoración (112).

1.5. Ruta de señalización mTORC1: relación con los procesos adictivos

La diana de rapamicina en células de mamífero o mTOR -por sus siglas en inglés, *mammalian target of Rapamycin*- es una proteína de la familia fosfoinositol-3-quinasa (113) que forma parte fundamental de dos complejos proteicos: mTORC-1 y mTORC-2. Si bien ambos han sido implicados en el proceso de la adicción (114), mTORC-1 parece tener una mayor relevancia.

El conjunto de proteínas que constituye el complejo mTORC-1 se encuentra ampliamente regulado aguas arriba por múltiples mediadores celulares acoplados a diversos receptores -como el receptor D3 dopaminérgico (D3R) y los receptores NMDA de glutamato (93)- entre los que destacan ERK_{1/2} y PI3K/Akt, ambos activadores del complejo mTORC1 (115). Un estudio reciente mostró que los D3R activan Akt, que en paralelo activa la señalización mTOR/p70S6/4E-BP1 (93). Aguas abajo, mTORC1 activa múltiples mensajeros, tales como la proteína de unión 4E-BP y la p70-S6 protein-quinasa (**Fig.9**) (116). Esta última ha sido particularmente estudiada, pues fosforila a un sustrato -proteína ribosómica S6- que a su vez promueve la activación de la maquinaria ribosómica y síntesis de proteínas a nivel de las dendritas (85), lo que induce cambios a nivel de la plasticidad neuronal. Por ello, este complejo se encuentra muy ligado a procesos de comportamiento, aprendizaje y memoria, en los que la plasticidad neuronal se encuentra en la base de los mismos (115).

Se ha comprobado que sustancias como la cocaína y el alcohol producen una activación de las vías ERK_{1/2} y PI3K/Akt a nivel de diversas áreas del sistema límbico (NAc, VTA, hipocampo...) que serían responsables, a través de mTORC1, de parte de las modificaciones neuronales que ocurren en animales de experimentación adictos a dichas sustancias (115). Entre dichas modificaciones tiene especial relevancia la inducción de LTP -donde es fundamental la síntesis de *nov*o de proteínas- y, consecuentemente, la memoria a largo plazo (LTM), que juegan un papel clave en la adicción y recaídas (85).

Se ha comprobado que en ratas que recuperaron recuerdos asociados al consumo de alcohol después de un período largo de abstinencia, existía un aumento en la expresión de mTORC1 a nivel del sistema límbico. Ante estos resultados, se probó a inhibir mTORC1 mediante rapamicina (inactivador de mTOR) inmediatamente después de exponerlos a la recuperación de los recuerdos (*memory retrieval*) y se observó que se interrumpía el proceso de recaída (117). La relevancia de este hecho radica en que gran parte de las recaídas son debidas fundamentalmente a la reexposición a recuerdos ligados al consumo de la sustancia de abuso, por lo que estos resultados sugieren que la vía mTORC1 se encuentra relacionada con los procesos subyacentes a las recaídas tras un período de abstinencia (118).

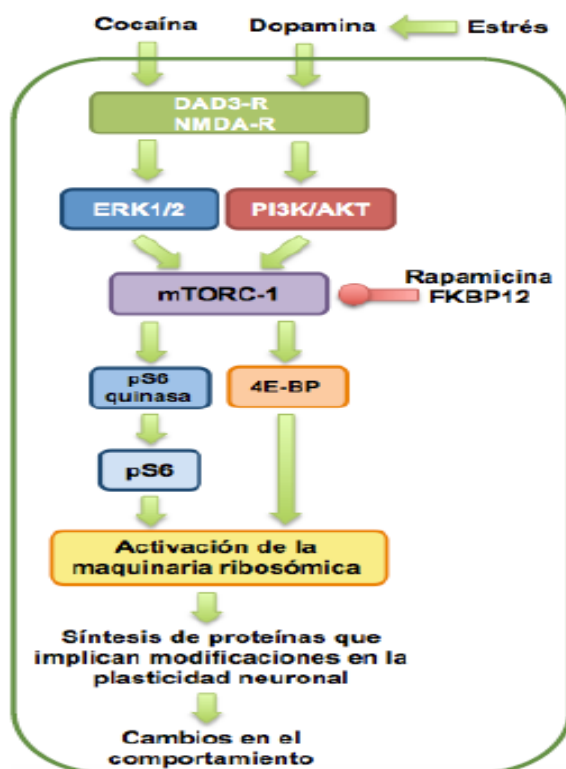


Figura 9. Ruta D3R---mTORC1--- pS6. Modificada de (115).

1.6. Receptor dopaminérgico D3 (D3R)

Los efectos fisiológicos de la DA en el SNC están mediados por 5 tipos de receptores que se diferencian fundamentalmente por su distribución por el

Por lo general los receptores D1 y D2 son diez veces más abundantes que el D3R. Los receptores D2 y D3 se encuentran tanto post como presinápticamente, y en esta última localización actúan como autorreceptores, regulando de forma inhibitoria la síntesis y liberación de DA. Ambos subtipos comparten un 79% de homología en su secuencia de aminoácidos en las regiones transmembrana, y práctica identidad de los residuos de su sitio de unión. En cuanto a afinidad, los D3R poseen una alta afinidad por DA (420 veces mayor que la de los receptores D2) (121) y, a diferencia de los receptores D2, pequeños cambios en su número o función pueden provocar efectos dramáticos en la transmisión sináptica, lo que sugiere que los D3R podrían ser críticos en la modulación de la función dopaminérgica normal y, a pesar de su localización, también de la cognición. Además, en presencia de sustancias de abuso (que elevan los niveles de DA) la ocupación de este receptor es superior a la de los receptores D1 y D2.

Desde mediados del siglo pasado es bien conocido que las neuronas dopaminérgicas están involucradas diversos procesos como las emociones, procesos cognitivos, la atención y la memoria, el aprendizaje, la regulación del sueño o el sistema de recompensa y placer así como el control del movimiento. Por todo ello, la DA es un neurotransmisor muy distribuido por todo el SNC (119) e implicado, a través de los receptores dopaminérgicos, en múltiples patologías tanto a nivel del sistema motor -Parkinson, síndromes extrapiramidales secundarios a la utilización de neurolépticos, síndrome de piernas inquietas- como a nivel cognitivo-conductual -trastornos psicóticos, esquizofrenia y trastornos del control de impulsos-, entre otros (122).

El receptor D3R se encuentra de forma más abundante en las áreas del sistema mesocorticolímbico del cerebro que se asocian con funciones emocionales y cognitivas, por lo que actualmente ha destacado como una posible diana en el estudio de los trastornos de la adicción (123) representando un enfoque principal en el diseño actual de fármacos y del desarrollo de terapias para estados patológicos relacionados con la DA (124).

1.6.1 Cascadas acopladas a D3R

Desde hace décadas existen antagonistas de los receptores D2/D3, tales como el haloperidol o la clorpromacina, empleados fundamentalmente en trastornos psicóticos, cuyo efecto principal se encuentra asociado fundamentalmente al bloqueo de D2 (125), por lo que el interés en el D3R siempre había quedado relegado a un segundo plano. No obstante, diversos estudios han puesto de manifiesto tres características interesantes del D3R. En primer lugar, se trata del receptor con mayor afinidad por la dopamina endógena, con una ocupación del 95% tras el consumo de sustancias que producen un aumento suprafisiológico de los niveles de dopamina -respecto al 25% de ocupación de los receptores D1 o D2- (126); en segundo lugar, su distribución aparentemente restringida a nivel del sistema límbico (119); y, por último, su efecto activador de las vías PI3K/Akt y ERK_{1/2} asociadas a mTORC1, ya mencionadas anteriormente (127). Los D3R mejoran la actividad de Akt, que se ha asociado a un aumento de la arborización dendrítica en las neuronas dopaminérgicas de embriones de ratón (128). La activación de Akt regula la actividad del mTOR y por tanto la plasticidad sináptica y el procesamiento cognitivo (93). Dicho efecto es consecuencia de que el D3R activaría a las subunidades G_{qβγ}. Estos hallazgos permitieron plantear la posible relación del receptor D3 con la adicción y las recaídas. A partir de esta hipótesis, se ha comprobado, en modelos animales, que los antagonistas del D3R disminuyen el *craving* y los comportamientos relacionados con la búsqueda de droga tras un período de abstinencia (122), la preferencia de lugar inducida por cocaína (129), la motivación para consumir drogas y el abuso de cocaína inducido por el estrés (130). De esta forma, la dopamina jugaría un papel fundamental en los procesos cognitivos de motivación y en el procesamiento de la información (131).

Además, estos D3R también parecen prometedores en el tratamiento de patologías como la esquizofrenia, el temblor esencial, la enfermedad de Parkinson y diversos trastornos del comportamiento (126), por lo que se trata de un campo de investigación actualmente en auge en el que aún es necesario profundizar mucho más.

1.6.2 D3R y adicción

Se ha demostrado que la exposición a psicoestimulantes como la cocaína produce un aumento de la longitud y número de dendritas, así como del área del soma de neuronas mesencefálicas dopaminérgicas (132). Estos efectos en la plasticidad neuronal están mediados por el D3R (133). Su amplia distribución en áreas límbicas, -que sugiere que pueden desempeñar un papel en las funciones cognitivas y emocionales-, junto con su implicación en propiedades de refuerzo de los psicoestimulantes, los convierten en una posible diana farmacológica para el tratamiento de los trastornos neurológicos y psiquiátricos ya que potencialmente podrían estar desprovistos de los efectos secundarios del subtipo de receptor D2 clásico, como son los efectos sobre las funciones motoras, efectos extrapiramidales y aumento de la liberación de prolactina (134). Esta hipótesis ha llevado a desarrollar ligandos selectivos del receptor D3. En este contexto, existe una evidencia cada vez más constatada de que los antagonistas del D3R podrían ser agentes antipsicóticos efectivos y también podrían estar involucrados en la sensibilización conductual, con potencial eficacia en el tratamiento del abuso de drogas (124, 135).

Aunque su función fisiológica aún no se comprende completamente, los dímeros u oligómeros del receptor tienen consecuencias importantes sobre la unión del ligando, la activación de las vías de señalización y el tráfico celular. Estos complejos, que muestran propiedades diferentes de las encontradas para cada monómero individual, pueden modificar la acción de la propia DA y de diferentes agonistas y antagonistas (136). En particular, los D3R pueden formar homodímeros o heterodímeros con receptores D1 o D2 (137). Se ha descrito que los heterodímeros D1-D3 poseen diferentes niveles de activación mediados por el receptor D3 en los receptores D1, y esto haría interesante investigar las diferencias en el perfil farmacológico de varios agonistas D1. Los heterodímeros D1-D3 representan una unidad funcional importante en el cerebro y se consideran objetivos prometedores para los trastornos neuropsiquiátricos, incluida la enfermedad de Parkinson y la drogadicción (137). Por tanto, la participación selectiva de los D3R en circuitos neuronales cruciales que controlan eventos motivacionales, desencadenó la identificación

del antagonismo selectivo del receptor D3 como una estrategia terapéutica factible contra la adicción (138). Esta percepción se confirmó aún más por diferentes evidencias que destacan los cambios de plasticidad en los sujetos drogadictos, como el aumento de la densidad del receptor D3 en adictos a cocaína y los consumidores de otras drogas, como la metanfetamina (139). La adicción a cocaína representa un factor de riesgo para la esquizofrenia (140).

En analogía con esta observación, los pacientes esquizofrénicos muestran una alta incidencia de abuso de drogas, incluida la cocaína. Basado en el interés que los D3R generaron como un objetivo terapéutico para el tratamiento de diferentes trastornos neurológicos y abuso de drogas, en las últimas dos décadas han dedicado muchos esfuerzos al desarrollo de antagonistas de estos receptores. Con respecto a ellos, se propuso un modelo de fármaco, definido por Paul Ehrlich en 1909 como «una unidad central molecular que transporta los rasgos esenciales responsables para la actividad biológica» de una droga. Por tanto, el conocimiento de esta región posibilita el diseño y desarrollo de fármacos sintéticos (141) (**Fig.11**) basado en la estructura de una serie de antagonistas caracterizados por un grado diferente de selectividad para D3 frente al subtipo de receptor D2, homólogo cercano (142). El modelo consiste en un resto arilo (Ar1) unido a un grupo amida, un espaciador de longitud apropiado (generalmente cuatro unidades de metileno) unido a un resto básico muy frecuentemente representado por un sistema de arilpiperazina (143).

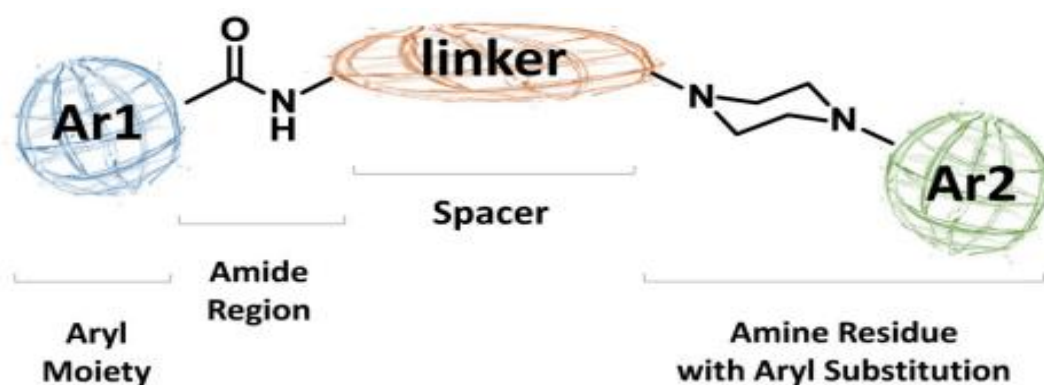


Figura 11. Modelo de ligandos de receptores D3. Tomado de (124).

En las últimas dos décadas se han desarrollado numerosos antagonistas de D3R selectivos (o agonistas parciales), entre los que podemos destacar dos. En primer lugar, BP897, la primera molécula sintetizada. Se trata de un potente ligando del receptor D3 ($K_i = 0,92 \text{ nM}$), con una selectividad de 70 veces frente a los receptores D2. Aunque se comportó como agonista parcial para los receptores D3, no estaba dotado de actividad intrínseca e inhibía potentemente los efectos agonistas de DA en la velocidad de acidificación inducida por el agonista o el aumento de la unión de $\text{GTP}_{\gamma}\text{S}$. Este compuesto despertó un gran interés, ya que se demostró reducir el comportamiento de búsqueda de cocaína en ratas sin producir refuerzo por sí mismo, destacando y respaldando el papel del D3R para el tratamiento del abuso de cocaína. En segundo lugar, destacamos la aparición en 2005 del compuesto SB-277011-A, utilizado en el presente estudio, (**Fig.12**). Se trata de un antagonista del D3R que atraviesa la BHE, de alta afinidad y selectividad 100 veces mayor que sobre el receptor D2 y sobre otros 60 receptores, enzimas y canales iónicos (144).

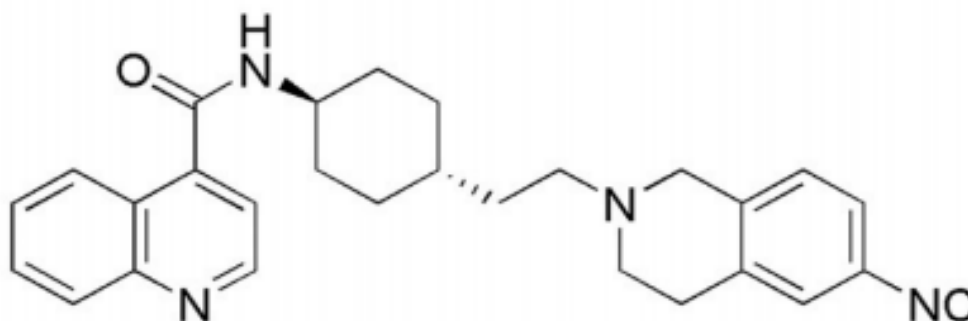


Figura 12. Antagonista selectivo de receptores D3, SB-277011-A. Tomado de (124)

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

II. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

En la actualidad, uno de los problemas principales que existe en el tratamiento de la adicción a cocaína es conseguir que el adicto se mantenga prolongadamente en estado de abstinencia, ya que tanto los contextos ambientales relacionados con el consumo, como aquellas situaciones cotidianas que resultan emocionalmente negativas para el sujeto, a menudo desencadenan la recaída en el consumo, sin que existan en la actualidad terapias efectivas para evitarlas. Un factor que aumenta de forma significativa el riesgo de recaídas es el estrés. Por ello, el conocimiento de la relación existente entre estrés y consumo de drogas en general, y en nuestro estudio en particular, de cocaína, así como de las bases neurobiológicas de dichas recaídas, suponen los mayores retos a los que nos enfrentamos para conseguir un tratamiento efectivo de las adicciones.

Puesto que en los últimos años se ha puesto de manifiesto la relación entre D3R y los procesos adictivos, los objetivos de este trabajo han sido los siguientes:

1. **Determinar la posible implicación del D3R en las recaídas (*reinstatement*) en la CPP (búsqueda de la droga - *drug-seeking*) inducidas por la administración de dosis pequeñas de cocaína (*priming*) y por distintos tipos de estrés (estrés social, inmovilización y dolor) en animales que habían extinguido la CPP (mediante el uso del modelo extinción-recaída).** Para ello hemos investigado el efecto del pretratamiento agudo con diferentes dosis del antagonista selectivo del D3R SB-277011-A, sobre dichas recaídas. Adicionalmente, y puesto que las situaciones estresantes producen importantes efectos sobre el aprendizaje y la memoria, pueden promover el inicio del consumo de drogas y desencadenar una recaída en sujetos en abstinencia, se cuantificaron los niveles de corticosterona plasmática (como marcador de la respuesta al estrés) tras las recaídas inducidas por los estímulos anteriormente referenciados, así como el efecto del

pretratamiento con el antagonista D3R sobre la liberación de corticosterona.

2. Dilucidar algunos de los mecanismos neurobiológicos involucrados en las recaídas en el comportamiento adictivo y que subyacen en la restauración de las memorias de recompensa asociadas al consumo de cocaína en el circuito dopaminérgico VTA-NA shell, y caracterizar el mecanismo por el que el bloqueo del D3R modula dicho comportamiento. Para ello, y mediante el uso del paradigma CPP y el de extinción-recaída, se han determinado las modificaciones que ocurren en NAc shell, en la expresión DAT y D3R, factores que regulan la neurotransmisión dopaminérgica, tras las recaídas en la CPP tras un periodo de abstinencia, inducidas por i) una sesión aguda de SD y ii) un *priming* de cocaína. Posteriormente se estudió el efecto del pretratamiento agudo con diferentes dosis del antagonista selectivo del D3R SB-277011-A, sobre la expresión de DAT y D3R. Además, y puesto que recientemente se ha propuesto que el D3R no solo regula el cAMP intracelular mediante la activación de $G_{i/o}$, sino que también regula otras vías de señalización, que incluyen MEK-ERK, PIK3-Akt y mTOR, las cuales se encuentran íntimamente relacionadas con la modulación del comportamiento relacionado con el estado de ánimo, así como con las LTM, en este estudio hemos cuantificado las modificaciones en expresión de las proteínas Akt y mTORC activadas (fosforiladas) en NAc shell tras las recaídas inducidas por SD y por un *priming* de cocaína. Paralelamente se realizó un estudio cualitativo mediante inmunofluorescencia para determinar si Akt se expresaba en las neuronas GABAérgicas del NAc shell (*medium-spiny neurons-MSN*).

Puesto que las drogas usurpan los circuitos neuronales de aprendizaje y memoria mediante sus acciones, directas o indirectas, sobre múltiples sistemas de neurotransmisión y vías de señalización, el presente estudio también se ha enfocado en dos áreas límbicas claves en dichos procesos de memoria y aprendizaje condicionado, así como en los procesos adictivos, como son la amígdala basolateral (BLA-memoria emocional) y el giro dentado hipocampal

(DG-memoria contextual y espacial). Además, la BLA interactúa con el hipocampo, contribuyendo ambos a la consolidación y recuperación de la memoria espacial y contextual, las cuales son procesadas finalmente por el DG hipocampal. Por otra parte, la adicción se asocia con cambios a largo plazo de la plasticidad neuronal, causados frecuentemente por alteraciones en los procesos de síntesis proteica. En base a estos datos, nuestro siguiente objetivo fue:

3. Estudiar las posibles modificaciones de algunos marcadores dopaminérgicos, así como la activación de la vía de señalización PI3K-Akt-mTOR en BLA and DG, durante las recaídas en la CPP inducidas por un episodio de estrés social y por un *priming* de cocaína. Para ello, y tras el uso del paradigma CPP y el de extinción-recaída, se han determinado las modificaciones que ocurren en la expresión DAT y D3R en BLA y DG. Paralelamente se ha estudiado i) la posible activación -fosforilación- de la proteína ribosomal S6 (pS6), diana de mTORC1, en las neuronas glutamatérgicas de BLA y DG, tras las recaídas inducidas por cocaína o estrés social; y ii) Los efectos de la administración del antagonista selectivo del D3R, SB-277011-A, en la expresión de pS6 en animales sometidos a un episodio de estrés social o a un *priming* de cocaína. Además, y mediante inmunomarcaje se estudió la expresión de las siguientes proteínas: i) pS6 (S6 fosforilada o activada), producto de la activación de la vía de mTORC1 que interviene en las primeras etapas de los procesos de traducción -síntesis proteica- y en la expresión génica, procesos implicados en modificaciones estructurales y funcionales a nivel dendrítico; ii) D3R, subtipo del receptor dopaminérgico que regula la cascada de señalización de mTORC1; iii) GLS2, isoforma de la enzima glutaminasa, que cataliza la desaminación de glutamina y por tanto genera la síntesis de glutamato, siendo pues considerada como marcador de neuronas glutamatérgicas en el cerebro; y iv) GAD (glutamato decarboxilasa), marcador de neuronas GABAérgicas. Para evidenciar la posible implicación del D3R en dichas modificaciones, se estudiaron los mismos parámetros en animales pretratados (previamente a la inducción de las recaídas) con el antagonista del D3R, SB-277011-A.

En conjunto, nuestra finalidad última ha sido, a través del estudio y comprensión de los mecanismos neurobiológicos relacionados con la adicción, contribuir a la búsqueda de terapias farmacológicas que eviten las recaídas en la adicción a cocaína.

MATERIAL Y MÉTODOS

III. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. *Animales de experimentación*

Todos los procedimientos quirúrgicos y experimentales se realizaron de conformidad con la Directiva del Consejo de la Comunidad Europea de 22 de septiembre de 2010 (2010/63/UE), y fueron aprobados según el RD 53/2013 por el Comité local de investigación animal (Comité de Ética y Experimentación Animal; REGA ES300305440012). Los protocolos fueron diseñados para minimizar el número de animales de experimentación y minimizar su sufrimiento. A su llegada, los ratones macho de la cepa C57BL/6 (Charles River, Laboratories France), con una edad de 6 semanas, se mantuvieron en una habitación con temperatura ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) y humedad ($50 \pm 10\%$) controladas, con acceso a agua y comida *ad libitum*. Los animales se adaptaron a un ciclo inverso de luz-oscuridad de 12 horas (luces apagadas: 08:00 h - 20:00 h) durante 7 días antes del comienzo de los experimentos. Los ratones fueron alojados en grupos de cuatro en jaulas de plástico (largo: 25 cm; ancho: 25 cm; alto: 14,5 cm) durante 10 días o durante 1 mes ($n = 8$; utilizados como oponentes no agresivos en la prueba de interacción social). Los animales utilizados para el experimento de la CPP se manipularon 5 minutos diarios durante 5 días antes del comienzo de los experimentos. Los ratones utilizados como oponentes agresivos ($n = 22$) fueron alojados individualmente en jaulas de plástico (largo: 23 cm; ancho: 13,5 cm; alto: 13 cm) durante el mes previo a los experimentos para inducir una mayor agresividad (145).

3.2. *Estudios conductuales*

3.2.1 *Preferencia condicionada de lugar (CPP)*

La CPP constituye un paradigma de condicionamiento pavloviano similar a la conducta de búsqueda de drogas en humanos (146) y se emplea en el estudio de los efectos motivacionales y de recompensa de las sustancias de abuso, entre ellas la cocaína. Con este procedimiento, los animales se

entrenan para asociar un ambiente determinado cuando reciben las inyecciones de droga. La capacidad de los estímulos asociados con la droga para inducir el deseo intenso y la recaída en el comportamiento de búsqueda de la droga es uno de los mecanismos por los cuales la adicción perdura y se mantiene a lo largo del tiempo (147). Por tanto, el procedimiento de la CPP nos permite estudiar las características de recompensa o incentivas de las drogas en animales libres de éstas, al evaluar el tiempo que pasan en un ambiente previamente asociado con los efectos de la sustancia de abuso. Esta prueba representa una herramienta útil para evaluar la sensibilidad individual a las características motivacionales de las sustancias adictivas.

Para llevar a cabo este experimento comportamental de la CPP se utilizó un aparato (**Fig.13**) que consistía en dos compartimentos de policarbonato (largo: 20 cm; ancho: 18 cm; alto: 25 cm) separados 4 cm entre ellos y accesibles desde un pasillo rectangular de cloruro de polivinilo (largo: 20 cm; ancho: 7 cm; altura: 25 cm). Los tres compartimentos se distinguían al poseer texturas diferentes al tacto y diferentes señales visuales. Un compartimento tenía paredes blancas con líneas diagonales grises y suelo liso de color negro. El otro compartimento tenía paredes blancas con puntos negros y suelo rugoso de color gris, de forma que los animales pudieran distinguirlos. El pasillo neutro que proporcionaba acceso a los compartimentos era de paredes y suelo transparentes para minimizar el tiempo que los ratones pudieran pasar en él. El tiempo que los ratones permanecían en cada uno de los compartimentos fue registrado para cada ratón de forma automática mediante un sensor transductor de peso y el software PPCWIN (CPP Win 2.0 Panlab, Barcelona, España), que permite la detección y el análisis de la posición del animal a lo largo de la prueba y el registro del número de entradas en cada compartimento (**Fig.13**).

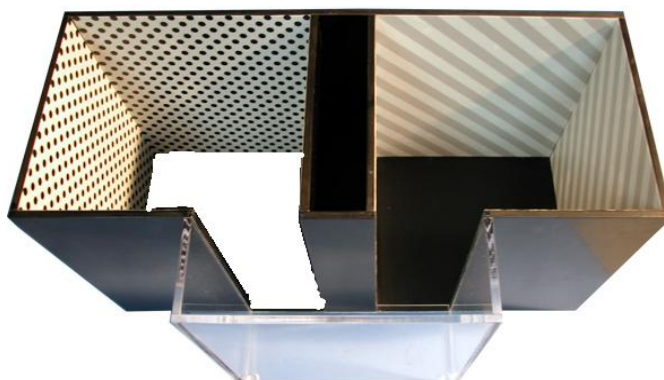


Figura 13. Aparato de preferencia condicionada de lugar. Modificado de (148).

El procedimiento conductual que se ha seguido en este estudio de la CPP consta de tres fases: adquisición de la CPP, extinción y restauración o recaída en la misma (149). Dicho proceso se encuentra esquematizado en la siguiente **figura 14** y descrito en el siguiente epígrafe.

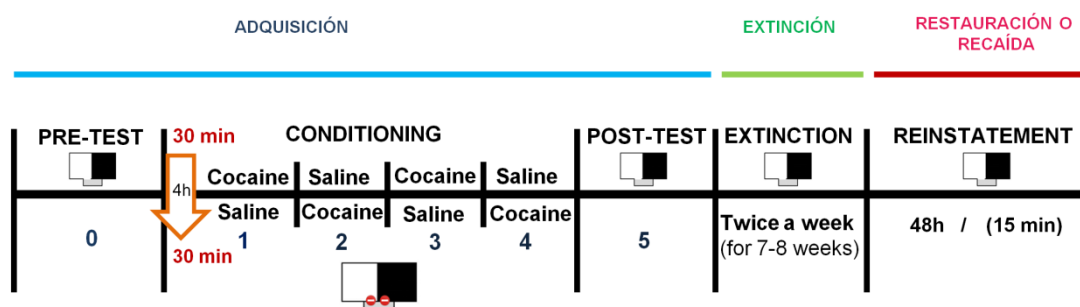


Figura 14. Fases de la CPP: adquisición, extinción, restauración o recaída.

3.2.1.1 Adquisición de la CPP inducida por cocaína

Test de Precondicionamiento (Pre-C): esta fase se realizó durante un día, durante la cual cada ratón fue colocado inicialmente en el pasillo central (área neutral) con acceso abierto a los dos compartimentos, lo que les permitía explorarlos libremente durante 15 minutos, y registrándose el tiempo que

pasaban en cada uno de ellos. Esta fase permite reducir los efectos de “búsqueda de novedad” debido a la familiarización del lugar, buscando reducir el estrés en la fase posterior de Post-C.

Los animales que mostraron una fuerte aversión no condicionada (< 33% del tiempo de sesión) o preferencia (> 67%) por cualquier compartimento fueron descartados.

Después de la sesión, un compartimento fue elegido para ser asociado con cocaína y el otro con solución salina, de tal manera que dentro de cada grupo la mitad de los animales recibieron el tratamiento en el lugar menos preferido y la otra mitad en el más preferido (contrabalanceo por preferencia).

Condicionamiento: la duración de esta fase puede diferir en función de la droga y el protocolo utilizado. Para el presente trabajo, se realizó diariamente durante cuatro días.

El área neutral no se utiliza en esta fase y es bloqueada por puertas de guillotina que impidieron el acceso desde ambos compartimentos. En cada grupo, la mitad de los animales recibieron la cocaína o solución salina en un compartimento y la otra mitad lo recibieron en el contrario. Los animales fueron condicionados con 25 mg/kg de cocaína disuelta en solución salina estéril (NaCl 0.9%: 2,5 mg/ml). En los días 1 y 3, los animales recibieron una inyección de cocaína (25 mg/kg i.p.) inmediatamente antes de ser confinados en el compartimento pareado con la droga durante 30 minutos y, después de un intervalo de 4 horas, recibieron 1 ml/kg de solución salina inmediatamente antes del confinamiento en el otro compartimento asociado con el vehículo, durante 30 minutos (150). La dosis de 25 mg/kg de cocaína se seleccionó en base a estudios previos que demostraron que induce una CPP robusta (151, 152) . En los días 2 y 4, los animales recibieron una inyección de solución salina antes de ser confinados al compartimento asociado con el vehículo durante 30 minutos y, después de un intervalo de 4 horas, recibieron cocaína inmediatamente antes del confinamiento en el compartimento asociado con la droga durante 30 minutos. Con ambos procedimientos el animal asocia 4 veces

un determinado compartimento con la experiencia subjetiva (reforzante) de la droga.

Test de Post-condicionamiento (Post-C): se realizó el día 5, veinticuatro horas tras la finalización del condicionamiento y exactamente como en la fase de Pre-C, por lo que se registró el tiempo que cada animal, sin ningún tratamiento, pasó en cada compartimiento durante 15 minutos.

El *score*, es decir, la diferencia en segundos entre el tiempo de permanencia de los animales en el compartimento asociado con la cocaína en el test Post-C, menos el tiempo de permanencia en el test Pre-C, se utilizó como medida del grado de condicionamiento inducido por la cocaína. Si esta diferencia es positiva indica que la droga ha inducido preferencia por el compartimento asociado con ella, mientras que lo opuesto indica la inducción de aversión.

3.2.1.2 Extinción de la CPP

Los procedimientos de extinción proporcionan una medida de las propiedades motivacionales de las drogas, hecho que viene reflejado por la persistencia en la conducta de búsqueda aún en ausencia de la misma. Además, nos ayudan a determinar la importancia del incentivo motivacional de los estímulos asociados con la droga, o de la administración no contingente de ésta, en la recuperación de la respuesta.

Las sesiones de extinción (ext) tienen como finalidad reducir la asociación que el animal ha aprendido entre el compartimento donde recibió la droga y los efectos placenteros de la misma. Estas sesiones se realizaron dos veces por semana (en días no consecutivos) durante 7-8 semanas (dependiendo del grupo) y consistieron en dejar a cada animal en el pasillo central del aparato de CPP con acceso libre a cada compartimento durante 15 minutos, exactamente como en los test Pre-C y Post-C, hasta que el tiempo pasado en el compartimento asociado con la droga para cada grupo de animales fue similar al de la fase de Pre-C. Por tanto, el criterio de extinción fue la ausencia de diferencias significativas (prueba t de Student) en el tiempo que

pasó cada grupo experimental en el compartimento asociado con la droga durante la prueba de extinción con respecto a la prueba Pre-C. En consecuencia, todos los animales de cada grupo se sometieron a la misma cantidad de sesiones de extinción, independientemente de su valor de *score* individual. Una vez alcanzado este criterio (Pre-C = ext), se realizó una nueva sesión 48 horas más tarde para confirmar la extinción. A continuación, se inició la fase de restauración o recaída.

3.2.1.3 Restauración o recaída en la CPP:

Como ya se ha mencionado anteriormente, la recaída en la conducta de búsqueda de la droga tras un período de abstinencia representa uno de los principales factores que conducen a la perpetuación del ciclo adictivo.

El procedimiento utilizado en este trabajo simula las recaídas en las conductas características del consumo de droga en el humano. Puede ser provocado, entre otros factores, por la administración aguda de la droga (*priming*) o por distintos tipos de estímulos estresantes, lo que demuestra que el proceso de extinción no elimina totalmente la asociación entre estímulos externos y los efectos placenteros de la droga. Dos días después de la ratificación de la extinción, los animales recibieron una inyección *priming* de cocaína, valorándose así si dosis pequeñas administradas no contingentemente con los estímulos ambientales son capaces de inducir de nuevo CPP, es decir, si provocan la restauración del comportamiento de búsqueda. En otros experimentos, que se detallan a continuación, los animales fueron sometidos a distintos tipos de situaciones estresantes con el fin de inducir la restauración de la preferencia.

La prueba de restauración de la preferencia o recaída (Post-reinst) consistió en dejar a cada animal en el pasillo central del aparato de CPP con acceso libre a cada compartimento durante 15 minutos, exactamente como en los test Pre-C, Post-C y ext, para contabilizar el tiempo que pasan en cada compartimento.

3.2.2 Inducción de estrés por derrota social (SDS), inmovilización o dolor

3.2.2.1 Estrés por derrota social (SD)

El estrés inducido por SD en animales previamente condicionados con cocaína mediante CPP fue utilizado en este trabajo para evaluar el restablecimiento de la CPP, ya que puede considerarse un tipo de estrés social (146, 153). Para esto, los ratones experimentaron un encuentro agonístico con derrota con un oponente agresivo (actitud que describe el comportamiento de generar competencia directa minimizando las actividades del otro) de igual edad y peso corporal que había sido alojado individualmente en jaulas y que tenía experiencia de lucha ya que previamente se le había examinado su alto nivel de agresividad.

Los ratones experimentales exhibieron comportamientos de evitación/huida y defensa/sumisión después de sufrir el comportamiento agresivo (amenaza y ataque) del oponente. Los ratones derrotados siempre exhiben esta forma extrema de comportamiento sumiso en posición vertical (145). Estos encuentros duraron 15 minutos y tuvieron lugar en una jaula de plástico transparente neutral (largo: 23 cm; ancho: 13,5 cm; alto: 13 cm). El criterio utilizado para definir a un animal como derrotado fue la asunción de una postura específica de derrota, caracterizada por una posición sumisa erguida, patas delanteras flácidas, cabeza inclinada hacia arriba y orejas retraídas (153). Todos los ratones derrotados experimentaron niveles similares de agresión debido a los comportamientos de ataque del oponente, que se iniciaron inmediatamente después de ver al ratón experimental (latencia < 30 segundos). No se observaron secuelas de comportamiento en controles o ratones agresivos. Inmediatamente después de la derrota social, se realizó la prueba de restauración. Con el objetivo de demostrar la falta de efectos del procedimiento en sí, un grupo adicional se sometió a un encuentro agonístico sin derrota (actitud que describe el comportamiento de no generar competencia directa ignorando las actividades del otro) con un ratón específico que había sido previamente agrupado con otros (146). Dado que este tipo de oponente nunca inicia el ataque, los ratones experimentales no sufren la experiencia de la derrota, por lo que este tipo de encuentro agonístico sin derrota puede verse

como una interacción social normal entre dos animales con un nivel bajo y similar de agresividad en el comportamiento. No se observó agresión durante estos encuentros. Estos encuentros duraron 15 minutos y tuvieron lugar en una jaula de plástico transparente neutral (largo: 23 cm; ancho: 13,5 cm; alto: 13 cm).

3.2.2.2 Estrés por inmovilización

En este trabajo se utilizó el estrés inducido por un episodio agudo de restricción física de movimiento en animales previamente condicionados a cocaína para evaluar el restablecimiento de la CPP. Para ello, los ratones se colocaron durante 15 minutos en dispositivos cilíndricos de plástico (2,5 cm de diámetro × 11,5 cm de longitud) con un orificio en uno de los extremos para permitir la respiración normal (**Fig.15**).



Figura 15. Dispositivo cilíndrico utilizado en la inducción de estrés por inmovilización.

3.2.2.3 Estrés por dolor

En este trabajo se utilizó también el estrés inducido por un episodio agudo de estrés por dolor mediante pinzamiento de cola en animales previamente condicionados a cocaína para evaluar el restablecimiento de la CPP. Para ello, los ratones se colocaron en una jaula de plástico (largo: 25 cm; ancho: 25 cm; alto: 14,5 cm) y se colocó una pinza (**Fig.16**) (de 7 mm de ancho, y de sección interna ovalada de 8 mm de ancho y 13 mm de altura) en

el último tercio de la punta de la cola durante 15 minutos (fuerza de sujeción, 10 Newton).

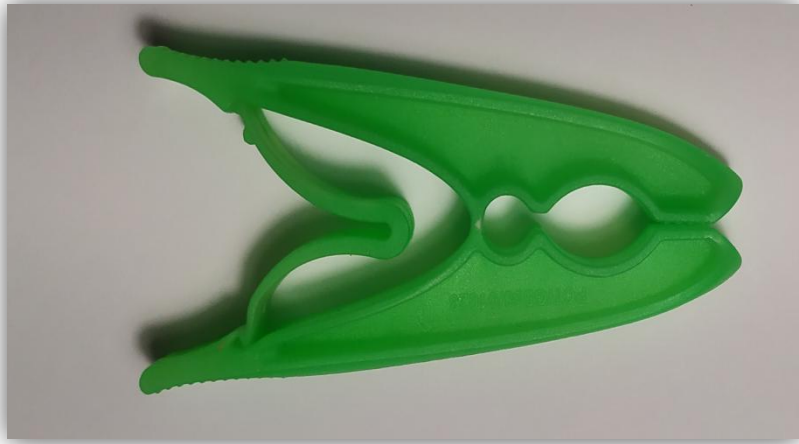


Figura 16. Pinza utilizada en la inducción de estrés por dolor.

3.2.3 Restauración de CPP inducida por SDS, inmovilización y dolor

Episodio de estrés por derrota social

Para provocar el restablecimiento de la CPP inducido por SDS, un grupo de animales experimentaron un encuentro agonístico con derrota con un oponente agresivo durante 15 minutos. Inmediatamente después se sometieron a la prueba de Post-reinst.

Al grupo de animales control se les sometió a un encuentro social agonístico sin derrota para confirmar que la restauración de la CPP inducido por el SDS se debió a la DS.

Episodio de estrés por inmovilización

Para provocar el restablecimiento de la CPP inducido por inmovilización un grupo de animales experimentaron un episodio de restricción física de movimiento durante 15 minutos. Inmediatamente después se sometieron a la prueba de Post-reinst.

Episodio de estrés por dolor

Para provocar el restablecimiento de la CPP inducido por pinzamiento de cola un grupo de animales experimentaron un episodio de dolor durante 15 minutos. Inmediatamente después se sometieron a la prueba de Post-reinst.

3.2.4 Restauración de CPP inducida por un *priming* de cocaína

Para provocar el restablecimiento de la CPP inducido por cocaína, se inyectó a un grupo de animales un *priming* de cocaína (12,5 mg/kg, i.p.). Transcurridos 15 minutos, se sometieron a la prueba de Post- reinst.

Al grupo de animales control se le administró una inyección de solución salina (1 ml/kg, i.p.) en lugar de cocaína para confirmar que la restauración de la CPP inducido por la droga se debió a la droga.

3.2.5 Estudio de los efectos del bloqueo selectivo del D3R sobre la restauración de la CPP inducido por un *priming* de cocaína, un episodio de SDS, inmovilización o dolor

Para evaluar la posible implicación del D3R en la restauración de la CPP inducida por cocaína, treinta minutos antes de la administración de la dosis *priming* cocaína y de los episodios de estrés (SD, inmovilización o dolor), se administró una dosis única del antagonista selectivo de D3R, SB-277011-A disuelto en agua destilada desionizada (vehículo: 2 mg/ml). Las dosis administradas en cada grupo fueron a) 24 o 48 mg/kg, i.p. para el grupo *priming* cocaína, estrés por inmovilización y estrés por dolor; b) 12 o 24 mg/kg, i.p. para el grupo estrés por SD. Los animales control recibieron una inyección de vehículo (agua para inyección, 1ml/kg, i.p.) en lugar del antagonista.

Las dosis de cocaína empleadas para el condicionamiento y *priming* se basaron en estudios publicados previamente en ratones (154, 155).

3.3. Grupos experimentales

A continuación, se muestran los grupos experimentales realizados para este trabajo:

- Vehículo (1 ml/kg, i.p.) + Salino (1 ml/kg, i.p.); n = 14
- Vehículo (1 ml/kg, i.p.) + *priming* cocaína (12,5 mg/kg, i.p.); n = 20
- SB-277011-A (24 mg/kg, i.p.) + *priming* cocaína (12,5 mg/kg, i.p.) n = 11
- SB-277011-A (48 mg/kg, i.p.) + *priming* cocaína (12,5 mg/kg, i.p.) n = 7

- Vehículo (1 ml/kg, i.p.) + Encuentro agonístico sin derrota; n = 16
- Vehículo (1 ml/kg, i.p.) + Encuentro agonístico con derrota; n = 23
- SB-277011-A (12 mg/kg, i.p.) + Encuentro agonístico con derrota; n = 14
- SB-277011-A (24 mg/kg, i.p.) + Encuentro agonístico con derrota; n = 30

- Vehículo (1 ml/kg, i.p.) + inmovilización; n = 10
- SB-277011-A (24 mg/kg, i.p.) + inmovilización; n = 13
- SB-277011-A (48 mg/kg, i.p.) + inmovilización; n = 18

- Vehículo (1 ml/kg, i.p.) + dolor; n = 14
- SB-277011-A (24 mg/kg, i.p.) + dolor; n = 14
- SB-277011-A (48 mg/kg, i.p.) + dolor; n = 9

3.4. Radioinmunoanálisis (RIA)

Inmediatamente después de la prueba Post-reinst, una parte de los animales fueron sacrificados por dislocación cervical y se recogió la sangre del tronco en tubos que contenían EDTA al 5% a 4°C. Seguidamente fue centrifugada (1000 x g, 15 minutos, 4°C) para separar el plasma, y éste se mantuvo a - 80°C hasta la determinación de los niveles de corticosterona (156). Para determinar los niveles basales de corticosterona se sacrificó un grupo de animales que no recibieron ningún tratamiento comportamental ni farmacológico. Las concentraciones plasmáticas de corticosterona se midieron

utilizando un kit comercial disponible para roedores (radioinmunoanálisis con ^{125}I -corticosterona; MP Biomedicals, EE. UU.). Se utilizó un contador gamma para cuantificar la emisión de radiactividad. La sensibilidad del ensayo fue de 7,7 ng/ml para la corticosterona.

3.5. Aislamiento de núcleos cerebrales mediante micropuncheado

Inmediatamente después de la prueba Post-reinst, una parte de los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical. Los cerebros fueron extraídos y almacenados a -80°C hasta su procesado para Western Blot (WB).

Los cerebros se cortaron en un criostato a -20°C . Para el aislamiento del NAc (medial Shell) se realizaron tres secciones coronales consecutivas de $500\ \mu\text{m}$ de espesor correspondientes, a aproximadamente, $+1,70\ \text{mm}$ a $+0,98\ \text{mm}$ desde bregma (**Fig.17**). Para el estudio de DG y BLA, se realizaron dos secciones coronales consecutivas de $500\ \mu\text{m}$ de espesor correspondientes, a aproximadamente, $-1,46\ \text{mm}$ a $-2,18\ \text{mm}$ desde bregma para DG, y $-0,94\ \text{mm}$ a $-1,58\ \text{mm}$ desde bregma para BLA, de acuerdo con el atlas de Franklin y Paxinos, 2008 (157) (**Fig.18**). Se hicieron cuatro microperforaciones bilaterales de $1\ \text{mm}^2$ de NAc, DG y BLA en tubos de $1,5\ \text{ml}$, según el método de Leng et al. (158), que contenían $50\ \mu\text{l}$ de solución de homogeneización. Esta solución contenía PBS (tampón fosfato salino $0,1\ \text{M}$, pH 7,4), dodecil sulfato de sodio al 10% (SDS), inhibidores de proteasas y un cóctel de inhibidores de fosfatasas. Los tubos se congelaron inmediatamente en hielo seco y se almacenaron a -80°C hasta su procesado. Para su homogeneización, las muestras se sonicaron durante un minuto, se agitaron en vórtex durante cinco minutos y se sonicaron nuevamente antes de la centrifugación a $11000\ \times\ g$ durante 10 minutos a 4°C .

3.6. Cuantificación de proteínas totales y Western-blot

Las concentraciones de proteína total se determinaron utilizando el método del ácido bicinonínico (BCA) desarrollado por Paul K. Smith en 1985 (159). Este método se basa en la conversión del ion Cu^{2+} a Cu^{1+} en condiciones alcalinas. Esta conversión es definida como la reacción de Biuret y es influenciada tanto por cuatro aminoácidos (cisteína, cistina, tirosina y triptófano) como por una cadena peptídica. El BCA es un reactivo cromogénico específico para el ion cuproso (Cu^{1+}), y en el segundo paso de la reacción, dos de sus moléculas reaccionan con una de ion Cu^{1+} . La cantidad de ion Cu^{2+} reducido es función de la concentración de proteínas y es determinada espectrofotométricamente por un cambio en el color de la solución de púrpura a rosada, que absorbe a 562 nm. La absorbancia obtenida es directamente proporcional a la cantidad de proteína presente en la solución y es estimada por comparación con un estándar de proteína conocido, como la albúmina sérica bovina (BSA).

Las muestras, que contenían cantidades iguales de proteína total (10-20 μg , dependiendo de la proteína de interés) se separaron mediante electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE) al 7,5% o 10% y se transfirieron a membranas de fluoruro de polivinilideno (PVDF, EMD Millipore Corporation, EE. UU.). A continuación, cada membrana se incubó en una solución de BSA al 1% en TBS-T (tampón tris-salino 0,02M con Tween 20 al 0,15%), durante 1 hora a temperatura ambiente, y con agitación constante para el bloqueo de uniones inespecíficas. La inmunodetección se realizó con los siguientes anticuerpos primarios tras incubación durante 18-24 horas a temperatura ambiente: anti-D3R monoclonal de ratón (1:100; sc-136170, Santa Cruz Biotechnology Inc., Dallas, Texas, EE. UU.); anti-DAT monoclonal de rata (1:2000; MAB369, EMD Millipore Corporation, Temecula, CA); anti-pAkt monoclonal de conejo (1:750; #4060, Cell Signaling Technology); anti-pmTOR monoclonal de conejo (1:1000; #5536, Cell Signaling Technology, Danvers, MA); anti-mTOR monoclonal de conejo (1:1000; #2983, Cell Signaling Technology). Después de tres lavados con TBST, las membranas se incubaron

durante 1 hora a temperatura ambiente con los anticuerpos secundarios anti-ratón y anti-conejo conjugados con peroxidasa de rábano picante (#31460 y #31430, respectivamente; 1:10000, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA EE. UU.). Después de otros tres lavados con TBST, la inmunoreactividad se detectó mediante quimioluminiscencia con un sistema mejorado (ECL Plus, Thermo Fisher Scientific) y se visualizó mediante el sistema ImageQuant LAS 500 (GE Healthcare, Reino Unido). Se usó gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) como control de carga. La densidad óptica integrada de las bandas se normalizó a los valores de fondo. Las variaciones relativas entre las bandas de las muestras experimentales y las muestras control se calcularon en la misma imagen. Los anticuerpos se eliminaron de las membranas por incubación con tampón de stripping (glicina 25 mM y SDS 1%, pH 2) durante 30 minutos a 37°C. Posteriormente, las membranas se volvieron a bloquear y se incubaron con anti-GAPDH monoclonal de conejo (#2118; 1:5000, Cell Signaling Technology Inc.). Para normalizar los niveles individuales de proteínas se calcularon las relaciones D3R/GAPDH, DAT/GAPDH, pAkt/GAPDH, pmTOR/mTOR.

3.7. Perfusión trans-cardíaca y obtención de secciones de cerebro

Inmediatamente después de la prueba Post-reinst inducida por derrota social o *priming* de cocaína, los ratones fueron anestesiados con una dosis subletal de pentobarbital (100 mg/kg, i.p.), disuelta en solución salina estéril (NaCl 0.9%: 50 mg/ml), y rápidamente perfundidos vía aorta ascendente con 30 ml de PBS mediante una bomba de perfusión continua de 8 canales (World precision instruments Ltd, Stevenage, Hertfordshire, UK) seguidos de una solución de 50 ml de paraformaldehído al 4% (PFD) en tampón borato 0,1 M (pH 9,5) a 4°C (**Fig.19**). Una vez perfundidos, los ratones se decapitaron a nivel del inicio de la médula espinal y se extrajo el encéfalo, que se mantuvo en PFD con sacarosa al 60% a 4°C durante 3 horas para post- fijar el tejido.

Posteriormente, se dejaron en PBS que contenía sacarosa al 30%, hasta su procesado.

Para obtener las muestras utilizadas en este estudio, con ayuda del atlas Franklin y Paxinos, 2008 (160), se obtuvieron secciones coronales de 25 μm en dirección rostro-caudal de NAc, BLA y DG utilizando un micrótopo criogénico de deslizamiento (Leica, Nussloch, Alemania) (**Fig.20,21**). Las secciones se almacenaron en un tampón crioprotector a -20°C hasta el procesamiento de las mismas.



Figura 19. Perfusión transcárdica.

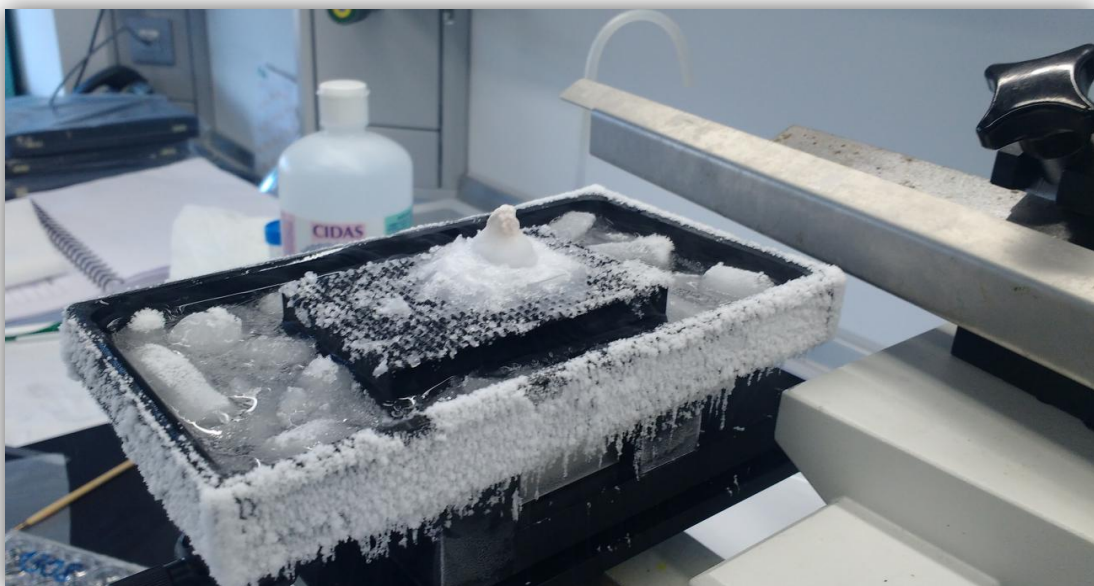


Figura 20. Microtomo criogénico utilizado.**Figura 21.** Cortes de secciones coronales con microtomo criogénico.

3.8. Inmunofluorescencia (IF)

De acuerdo con el atlas de Franklin y Paxinos (2008) (160), el día del experimento se seleccionaron los cortes correspondientes a las áreas de interés NAc, BLA y DG y se depositaron en cajas de metacrilato de 12 pocillos con PBS (de 4 a 6 secciones por pocillo). Los cortes se lavaron con PBS durante 5 minutos, tres veces en un agitador de balanceo (Stuart Scientific, Reino Unido) y se sometieron a un proceso de desenmascaramiento de antígenos, tratando las secciones con tampón citrato (ácido cítrico 10 mM con Tween-20 al 0,05%, pH 6,0) a 90°C durante 20 minutos. Tras lavar tres veces con PBS, los sitios de unión a Fc no específicos se bloquearon con BSA al 7% en PBS con Tritón-X-100 al 0,3% durante 2 horas a temperatura ambiente.

Después las secciones se incubaron en la misma solución anterior durante 60 horas (4°C, agitación constante) con los siguientes anticuerpos primarios: anti-pAkt de conejo (1:200, #4060, Cell Signaling, Danvers, Massachusetts, USA); anti-pS6 policlonal de oveja (1:250, ab65748, Abcam, Cambridge, Massachusetts, EE. UU.); anti-D3R monoclonal de ratón (1:150,

sc-136170; Santa Cruz Biotechnology Inc.); anti-glutaminasa 2 (GLS2) policlonal de conejo (GLS2; 1:1000, ab113509, Abcam) y anti-glutamato descarboxilasa (GAD) policlonal de pollo (GAD; 1:750, NBP1-02161 Novus Biologicals, Centennials, Colorado, EE. UU.).

Tras tres lavados con PBS las secciones se incubaron durante 4 horas a temperatura ambiente y en oscuridad con los siguientes anticuerpos secundarios marcados con un fluoróforo: Alexa Fluor 488 anti-IgG de conejo originado en burro (1:1000; A-21206, Invitrogen, Eugene, OR, USA), Alexa Fluor 555 anti-IgG de ratón originado en burro (1:1000; A-31570, Invitrogen), Alexa Fluor 647 anti-IgG de pollo originado en cabra (1:1000; A-21449, Invitrogen), Alexa Fluor 488 anti-IgG de oveja originado en burro (1:1000; A-11015, Invitrogen, Eugene, OR, USA), Alexa Fluor 555 anti-IgG de ratón originado en burro (1:1000; A-31570, Invitrogen), Alexa Fluor 647 anti-IgG de conejo originado en burro (1:1000; A-31573, Invitrogen) y Alexa Fluor 647 anti-IgG de pollo originada en cabra (1:1000; A-21449, Invitrogen).

ANTICUERPOS PRIMARIOS	HUÉSPED	SELECTIVIDAD	PROVEEDOR	NÚMERO CATÁLOGO	WB (dilución)	IF (dilución)
D3R	Ratón	Monoclonal	Santa Cruz Biotechnology	sc-136170	1:100	1:150
DAT	Rata	Monoclonal	Millipore	MAB269	1:2000	
pAkt	Conejo	Monoclonal	Cell Signaling Technology Inc.	#4060	1:750	1:200
pmTOR	Conejo	Monoclonal	Cell Signaling Technology Inc.	#5536	1:1000	
mTOR	Conejo	Monoclonal	Cell Signaling Technology Inc.	#2983	1:1000	
GAPDH	Conejo	Monoclonal	Cell Signaling Technology Inc.	#2118	1:5000	
pS6	Oveja	Policlonal	Abcam	ab65748		1:250
GLS2	Conejo	Policlonal	Abcam	ab113509		1:1000
GAD	Pollo	Policlonal	Novus Biologicals	NBP1-02161		1:750

Tabla 2. Anticuerpos primarios utilizados en este estudio.

Tras lavar tres veces con PBS, las secciones se incubaron en oscuridad con 4,6-diamino-2-fenilindol (DAPI, 1: 25,000; marcador nuclear) en PBS durante 1 minuto y tras otros tres lavados con PBS se procedió a su montaje en portaobjetos gelatinados con el medio de montaje ProLong[®] Gold (Invitrogen) y fueron cubiertas con cubreobjetos.

3.9. Análisis mediante microscopía confocal

Las secciones se examinaron utilizando un microscopio confocal Leica TCS SP8 (Leica, Illinois, EE. UU.) y el software LAS X (Leica Microsystems). Las imágenes de NAc, DG y BLA fueron capturadas desde un aumento bajo (10X) a alto (objetivo de aceite 63X). Las imágenes se obtuvieron utilizando excitación de 405 nm para DAPI, de 488 nm para Alexa Fluor 488, de 555 nm para Alexa Fluor 555 y de 647 nm para Alexa Fluor 647. Se detectó la luz emitida en el rango de 405-490 nm para DAPI, 510-550 nm para Alexa Fluor 488, 555-640 nm para Alexa Fluor 555 y 647-775 nm para Alexa Fluor 647. Cada canal se capturó por separado para evitar solapamiento espectral.

La configuración del microscopio confocal fue establecida y mantenida por Leica y técnicos locales para una resolución óptima.

3.10. Análisis estadístico

Los datos de comportamiento fueron registrados automáticamente por el software PPCWIN (CPP Win 2.0 Panlab, Barcelona, España), por lo que no se requirió que el experimentador desconociera el tratamiento de los animales. Los datos se expresan como la media \pm el error estándar de la media (SEM). Para los experimentos de CPP, el análisis estadístico se realizó utilizando un análisis de varianza (ANOVA) de una vía con medidas repetidas, seguido de

una prueba *post-hoc* de Tukey para determinar las diferencias entre los grupos experimentales.

Los datos obtenidos mediante WB y RIA se analizaron usando un ANOVA de una vía, seguido de la prueba *post-hoc* de Tukey. Se utilizó el programa estadístico GraphPad Prism[®] 6.0 (GraphPad[®] Software Inc., San Diego, CA, EE. UU). Los valores de $p < 0.05$ se consideraron significativos.

RESULTADOS

IV. RESULTADOS

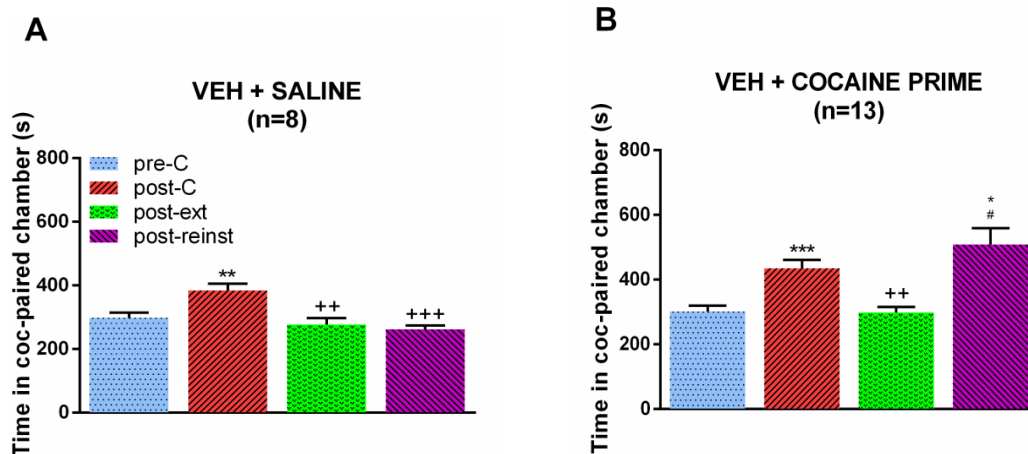
Para evaluar la posible implicación de los D3R en la regulación de la restauración de la preferencia de lugar inducida tras la administración aguda de una dosis de recuerdo de cocaína (*cocaine-prime*) o por distintos tipos de estímulos estresantes, se utilizó el paradigma conductual Pavloviano “*Preferencia Condicionada de Lugar*” (CPP), que es ampliamente usado para estudiar las propiedades gratificantes de las drogas (161) ya que la capacidad de asociar distintas señales con su administración pueden inducir una recaída en el comportamiento de búsqueda de la droga y un deseo intenso de su consumo, desencadenándose un perpetuo mantenimiento de la adicción.

4.1 Implicación de D3R en la recaída en la CPP provocada por un cocaine-prime y por diferentes tipos de estrés

4.1.1 El bloqueo de D3R con SB-277011-A no antagonizó la recaída en la CPP provocada por cocaine-prime

El ANOVA de una vía reveló diferencias significativas entre los tratamientos de los distintos grupos experimentales [$F(1.9,13) = 13.00$, $p = 0.0010$ para el grupo vehículo + solución salina; $F(1.4,17) = 10.00$, $p = 0.0027$ para el grupo vehículo + *priming* cocaína; $F(1.7,17) = 17.00$, $p = 0.0001$ para el grupo SB 24 + *priming* cocaína; $F(1.7,10) = 57.00$, $p < 0.0001$ para SB 48 + *priming* cocaína]. Como se puede observar en la **Fig. 22A-D**, la prueba post hoc de Tukey mostró que, después del período de condicionamiento, los ratones pasaron más tiempo en el compartimento asociado a la cocaína durante el test Post-C que durante el test de Pre-C. Además, tras las sesiones de extinción, disminuyó significativamente el tiempo que los ratones pasaron en el compartimento asociado con la droga durante el test de Post-ext con respecto al de Post-C (**Fig. 22A-D**).

Para provocar la restauración (*recaída*) de la CPP inducida por cocaína, se administró un *priming* de esta droga (12.5 mg/kg i.p.) 15 minutos antes del test de recaída (Post-reinst). Como se puede observar en la **Fig. 22B**, el tiempo que pasaron los animales en el compartimento que había sido apareado con cocaína aumentó significativamente cuando se comparó con el transcurrido durante el Pre-C y Post-ext. Por el contrario, el tiempo que pasaron en el compartimento asociado a la droga durante el Post-reinst los ratones que recibieron una solución salina en lugar de cocaína (controles), no aumentó, y fue significativamente menor que el tiempo que transcurrieron en el Post-C (**Fig. 22A**). Para estudiar si D3R estaba implicado en la recaída en la CPP producido tras la administración aguda de un *priming* de cocaína, administramos dos dosis diferentes (24 y 48 mg/kg, i.p.) de SB-277011-A 30 minutos antes de la inyección del *priming* de cocaína. Nuestros datos muestran que el bloqueo de D3R con cualquiera de las dos dosis del antagonista no inhibió las recaídas en la CPP producida por un *priming* cocaína, ya que los animales pasaron significativamente más tiempo en el compartimento donde fueron condicionados con cocaína durante el Post-reinst que durante las pruebas Pre-C y Post-ext (**Fig. 22C, D**).



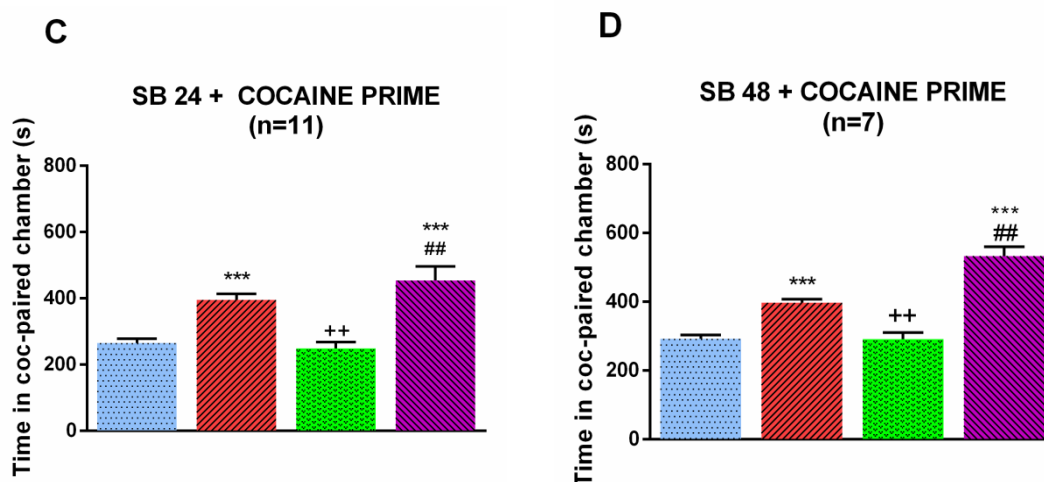


Figura 22. El bloqueo de D3R (24 o 48 mg/kg) no atenuó las recaídas en paradigma de preferencia condicionada de lugar (CPP) inducido por una dosis *priming* de cocaína. (A, B, C, D) Tiempo que transcurrido por los animales en la cámara apareada con cocaína durante: el Pre-condicionamiento (Pre-C), el Post-condicionamiento (Post-C), la Post-extinción (Post-ext) y el restablecimiento (Post-reinst). Los animales fueron pretratados con vehículo más salino (A), vehículo más *priming* cocaína (B) y SB-277011-A (24 o 48 mg/kg i.p.) más *priming* cocaína (C, D, respectivamente). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ frente a pre-C; ++ $p < 0.01$ vs post-C; # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ vs post-ext.

También se evaluó si el bloqueo del D3R afectó al número de entradas a ambos compartimentos durante el Post-reinst. El ANOVA de una vía mostró diferencias significativas entre los grupos para el número de entradas totales a los compartimentos emparejados con solución de salino vs a los emparejados con cocaína [$F(3,35) = 5.07$, $p = 0.0051$]. Como se puede observar en la **Fig. 22A**, los ratones que recibieron un *priming* de cocaína aumentaron el número de entradas totales a ambos compartimentos durante el test Pre-C, respecto a los animales que fueron inyectados con un *priming* salino, aunque dicho aumento no fue estadísticamente significativo. Los animales que recibieron la dosis más baja de SB-277011-A previamente al *priming* de cocaína, mostraron un número similar de entradas totales con respecto al grupo pretratado con vehículo. Sin embargo, el número de entradas totales de los animales inyectados con 48 mg/kg de SB-277011-A fue significativamente menor a las de los animales que recibieron vehículo en lugar del antagonista antes de la inyección del *priming* de cocaína así como a las del grupo inyectado con la dosis más baja de SB-277011-A antes del *priming* cocaína. Nuestros datos revelaron el mismo patrón de entradas en las cámaras emparejadas con solución de salino o de cocaína (**Fig. 22B, C**). El restablecimiento de la CPP inducida por cocaína en los animales a los que se inyectó el vehículo antes de

recibir una inyección de cocaína se demostró además por el hecho de que su score de CPP en el Post-reinst se correlacionó significativamente con la disminución de entradas en el compartimento emparejado con solución de salino ($r = -0.5668$, $p = 0.0434$; correlación de Pearson; **Fig. 24**).

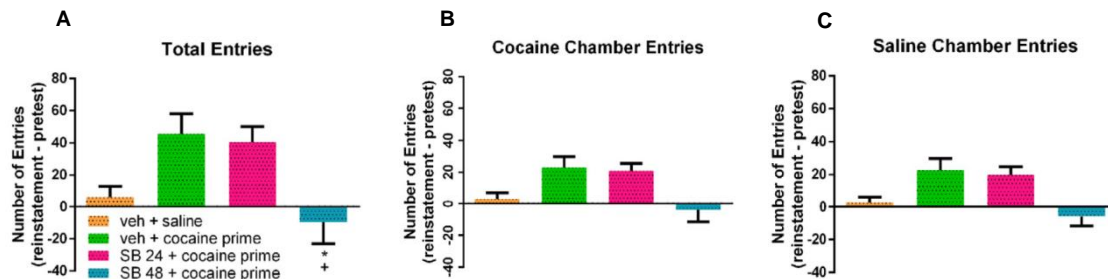


Figura 23. Diferencia entre el número de entradas totales a las cámaras de puntos y rayas (A), a la cámara apareada con cocaína (B) y a la cámara apareada con salino (C) durante el test de recaída en la CPP y el número de entradas durante el test de Pre-C. Cada barra representa la media \pm SEM. * $p < 0.05$ vs veh + *priming* salino; + $p < 0.05$ vs SB 24 + *priming* cocaína.

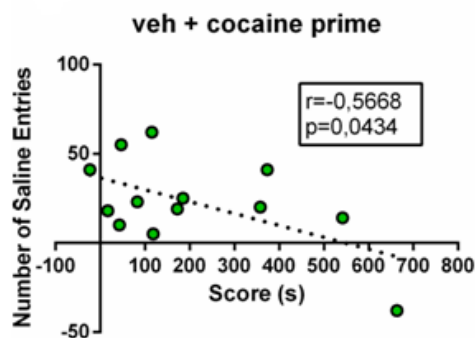


Figura 24. Correlación entre el score correspondiente al CPP tras las recaídas y la diferencia entre el número de entradas a la cámara apareada con salino durante la recaída y el número de entradas durante el pre-C. La diferencia en el número de entradas a la cámara emparejada con salino se correlacionó negativamente con el score de CPP de las recaídas ($p < 0.05$).

4.1.2 El pretratamiento con SB-277011-A inhibió la restauración de la CPP provocada por estrés social

El ANOVA de una vía reveló diferencias significativas entre los tratamientos para todos los grupos de animales [$F(1.678, 15.10) = 16.17$, $p = 0.0003$ para veh + no derrota; $F(2.159, 32.39) = 30.46$, $p < 0.0001$ para veh + derrota social; $F(1.300, 16.90) = 12.22$, $p = 0.0016$ para SB 12 + derrota social;

F (2.287,32.02) = 15.99, $p < 0.0001$ para SB 24 + derrota social]. El test post hoc de Tukey reveló que los ratones pasaron significativamente más tiempo en el compartimento asociado con cocaína durante el Post-C que durante el Pre-C y que, durante el test Post-ext, el tiempo que pasaron los animales en el compartimento asociado a la droga fue estadísticamente menor que durante la prueba Post-C (**Fig. 25A-D**). Cuando los animales fueron sometidos a un episodio agudo de estrés social y posteriormente se evaluó la restauración de la CPP inducida por la cocaína, se observó que pasaron significativamente más tiempo en el compartimento asociado con la droga en comparación con el test Post-ext y Pre-C (**Fig. 25B**). Por el contrario, los ratones no derrotados no mostraron diferencias significativas en el tiempo que pasaron en la sala asociada a la droga durante el Post-reinst con respecto a Pre-C y Post-ext (**Fig. 25A**).

La administración de 12 mg/kg de SB-277011-A 30 minutos antes del episodio agudo de derrota social no modificó el restablecimiento de la CPP (**Fig. 25C**). Por el contrario, el pretratamiento con una dosis más alta del antagonista de D3R (24 mg/kg) bloqueó totalmente la recaída en la CPP provocada por el episodio agudo de derrota social. La prueba post hoc de Tukey mostró que los ratones inyectados con 24 mg/kg de SB-277011-A antes del encuentro agonístico con derrota no aumentaron el tiempo transcurrido en el compartimento asociado con la cocaína durante el Post-reinst, con respecto a la Post-ext y Pre-C. Además, este tiempo fue significativamente menor que el del Post-C (**Fig. 25D**).

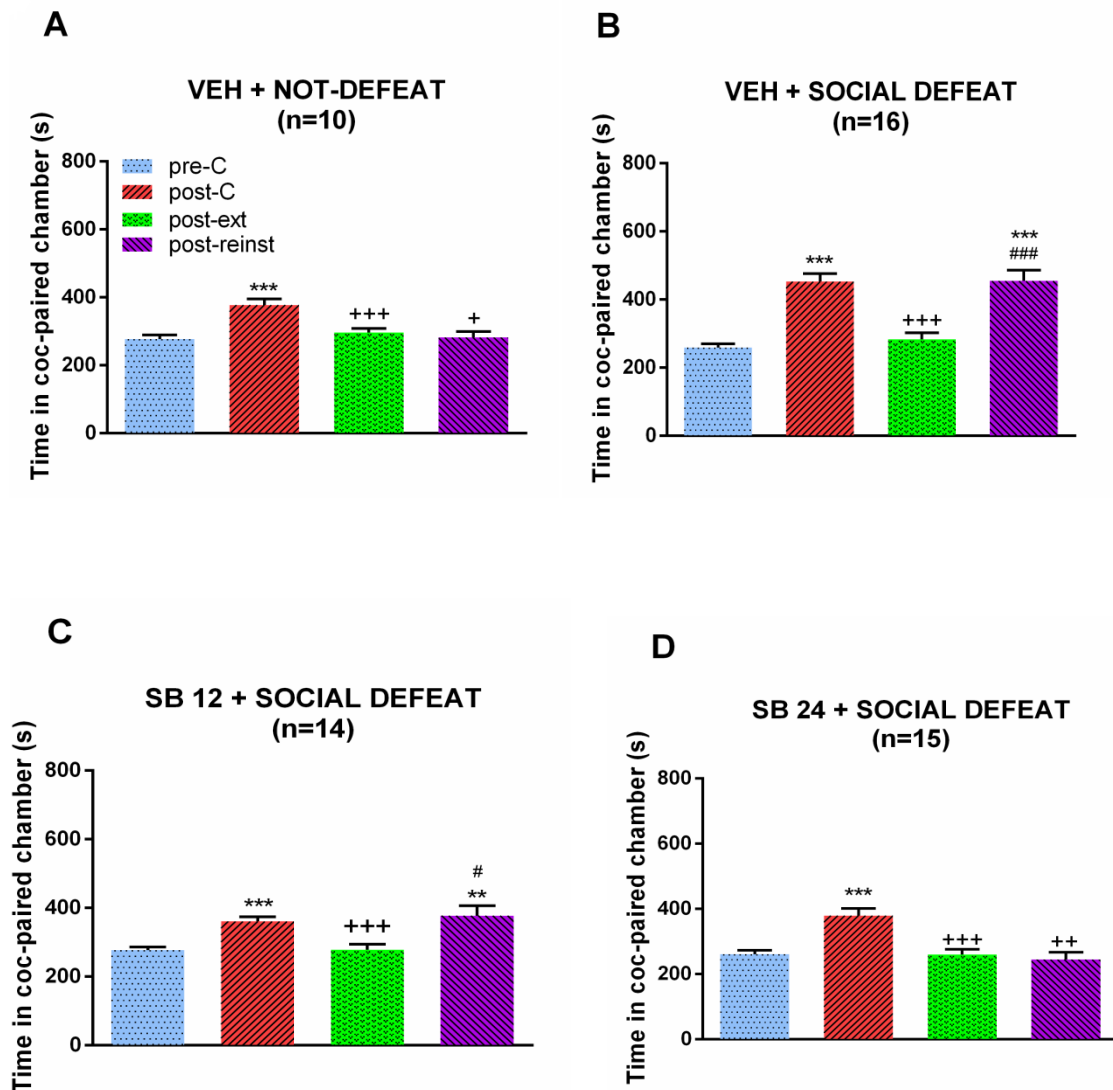


Figura 25. El bloqueo de D3R (24 mg/Kg) antagonizó el restablecimiento de la CPP inducida por el estrés social. Tiempo que los ratones no derrotados (controles; A) y derrotados (B, C, D) pretratados con vehículo (A, B) o SB-277011-A (12 o 24 mg/kg i.p.; C, D) pasaron en la cámara apareada con cocaína. ; C, D, respectivamente). ** p< 0,01; *** p< 0.001 vs pre C; +p< 0.05, ++ p< 0.01; +++ p< 0.001 vs post-C; #p< 0.05, ###p< 0.001 vs post-ext.

Cuando estudiamos el número de entradas totales de los animales a las dos salas durante el Post-reinst, el ANOVA de una vía reveló diferencias significativas entre los grupos experimentales [F (3,49) = 19.36, p< 0,0001]. La prueba post hoc mostró que los ratones con estrés social realizaron un mayor número de entradas totales a ambos compartimentos que los animales no derrotados. Además, tanto la dosis de 12 como la de 24 mg/kg de SB-277011-A disminuyeron significativamente el aumento en el número de entradas totales durante la prueba Post-reinst (**Fig. 26A**). El número de entradas a los compartimentos emparejados con cocaína o solución salina siguió el mismo

patrón que el número de entradas totales, pero no hubo diferencias significativas entre los grupos (**Fig. 26B, C**).

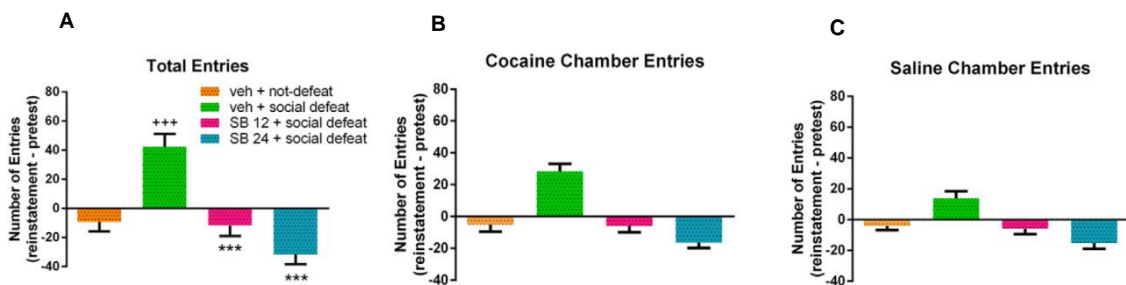
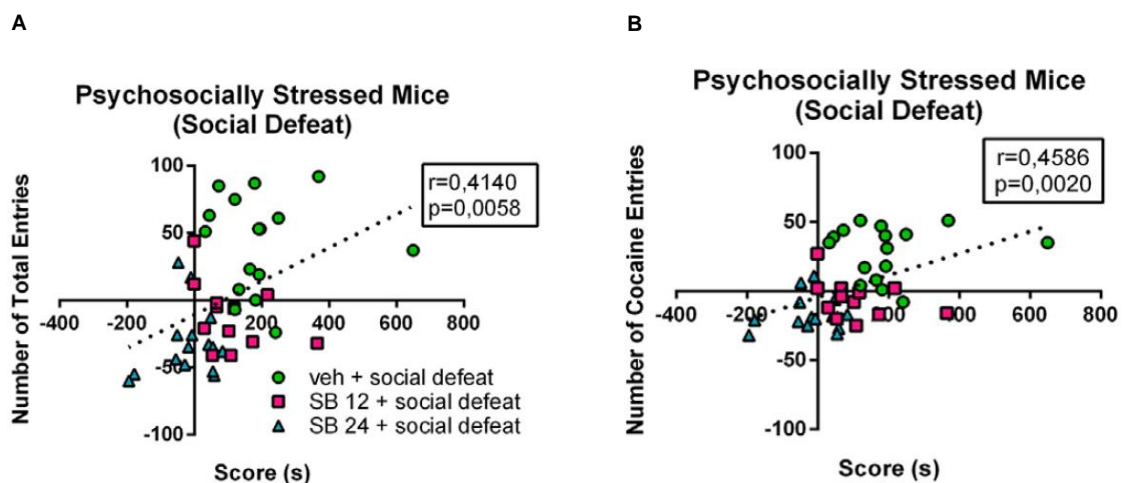


Figura 26. Diferencia entre el número de entradas totales a los compartimentos de puntos y rayas (A), al compartimento apareado con cocaína (B) y al compartimento apareado con salino (C) durante el Post-reinst y el número de entradas durante el pre-C. Cada barra corresponde a la media \pm SEM. *** $p < 0.001$ vs veh + no derrota; *** $p < 0.001$ vs veh + derrota social.

Por otra parte, hubo correlaciones significativas entre el score de CPP de los ratones estresados que habían sido pretratados con el antagonista D3R o su vehículo, y el número de entradas totales ($r = 0.4140$, $p = 0.0058$; correlación de Pearson; **Fig. 27A**), el número de entradas al compartimento asociado a cocaína ($r = 0.4586$, $p = 0.0020$; correlación de Pearson; **Fig. 27B**) y el número de entradas al compartimento asociado a salino ($r = 0.3338$, $p = 0.0287$; correlación de Pearson, **Fig. 27C**).



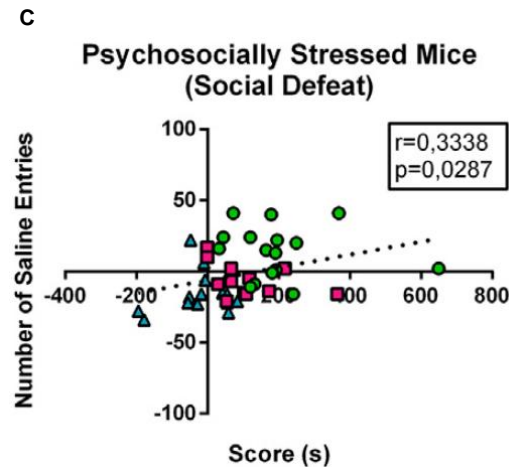


Figura 27. Correlaciones entre el score de la CPP tras la recaída y la diferencia entre en el número total de entradas (A), entradas a la cámara de cocaína (B) o a la cámara de salino (C) durante el test de reinst y las del test pre-C, en ratones socialmente derrotados. La diferencia en el número de entradas totales y de entradas a la cámara apareada con cocaína o solución salina se correlacionó positivamente y de forma significativa ($p < 0.05$) con el score de CPP durante la recaída.

Finalmente, se observó que la administración de SB-277011-A no alteró las respuestas de los animales derrotados (conductas de evitación/huida y defensa/sumisión después de sufrir la conducta agresiva, posición sumisa erguida, patas delanteras flácidas, cabeza inclinada hacia arriba y retraída).

4.1.3 El pretratamiento con SB-277011-A inhibió la restauración de la CPP provocada por diferentes tipos de estrés fisiológico

El ANOVA de una vía reveló diferencias significativas entre los tratamientos para todos los grupos de animales [$F(1.5,13) = 24.00$, $p = 0.0001$ para veh + inmovilización; $F(1.6,19) = 8.30$, $p = 0.0042$ para SB 24 + inmovilización; $F(1.8,31) = 27.00$, $p < 0.0001$ para SB 48 + inmovilización; $F(1.7,22) = 24.00$, $p < 0.0001$ para vehículo + pinzamiento de cola; $F(1.8,23) = 15.00$, $p < 0.0001$ para SB 24 + pinzamiento de cola; $F(1.8,14) = 8.50$, $p = 0.0045$ para SB 48 + pinzamiento de cola]. Como se observó en los experimentos anteriores, la prueba post hoc de Tukey reveló que los ratones pasaron significativamente más tiempo en el compartimento asociado a la cocaína durante el Post-C respecto al Pre-C, y que el tiempo pasado en el compartimento asociado a la droga disminuyó significativamente durante el test de Post-ext (**Fig. 28A-C y 29A-C**).

Con el fin de producir el restablecimiento de la CPP inducida por la cocaína, los animales fueron expuestos a dos factores estresantes físicos diferentes, inmovilización y pinzamiento de la cola. La prueba post hoc mostró que, después de 30 minutos de inmovilización, los animales aumentaron significativamente el tiempo que pasaron en el compartimento asociado a la droga durante el Post-reinst, en comparación con el Post-ext y Pre-C (**Fig. 28A**). De manera similar, los animales expuestos al pinzamiento de la cola pasaron significativamente más tiempo en el compartimento asociado con la cocaína en el Post-reinst con respecto a las pruebas posteriores de Post-ext y Pre-C (**Fig. 29A**).

Se administraron dos dosis diferentes del antagonista de D3R antes de la exposición a los dos tipos de estrés fisiológicos para estudiar la capacidad del SB-277011-A para prevenir el restablecimiento de la CPP inducida por cocaína. La administración de la dosis más baja de SB-277011-A (24 mg/kg) no impidió el aumento significativo en el tiempo que los ratones físicamente estresados pasaron en el compartimento asociado a la cocaína durante el Post-reinst, en comparación con el Pre-C y Post-ext. (**Figs. 28B y 29B**). Sin embargo, cuando se administraron 48 mg/kg de SB-277011-A antes de la exposición a los dos tipos de estrés físicos, observamos una disminución significativa del tiempo que pasaron los ratones en la cámara asociada con cocaína durante el Post-reinst, con respecto al Post-C y al Pre-C (**Figs. 28C y 29C**).

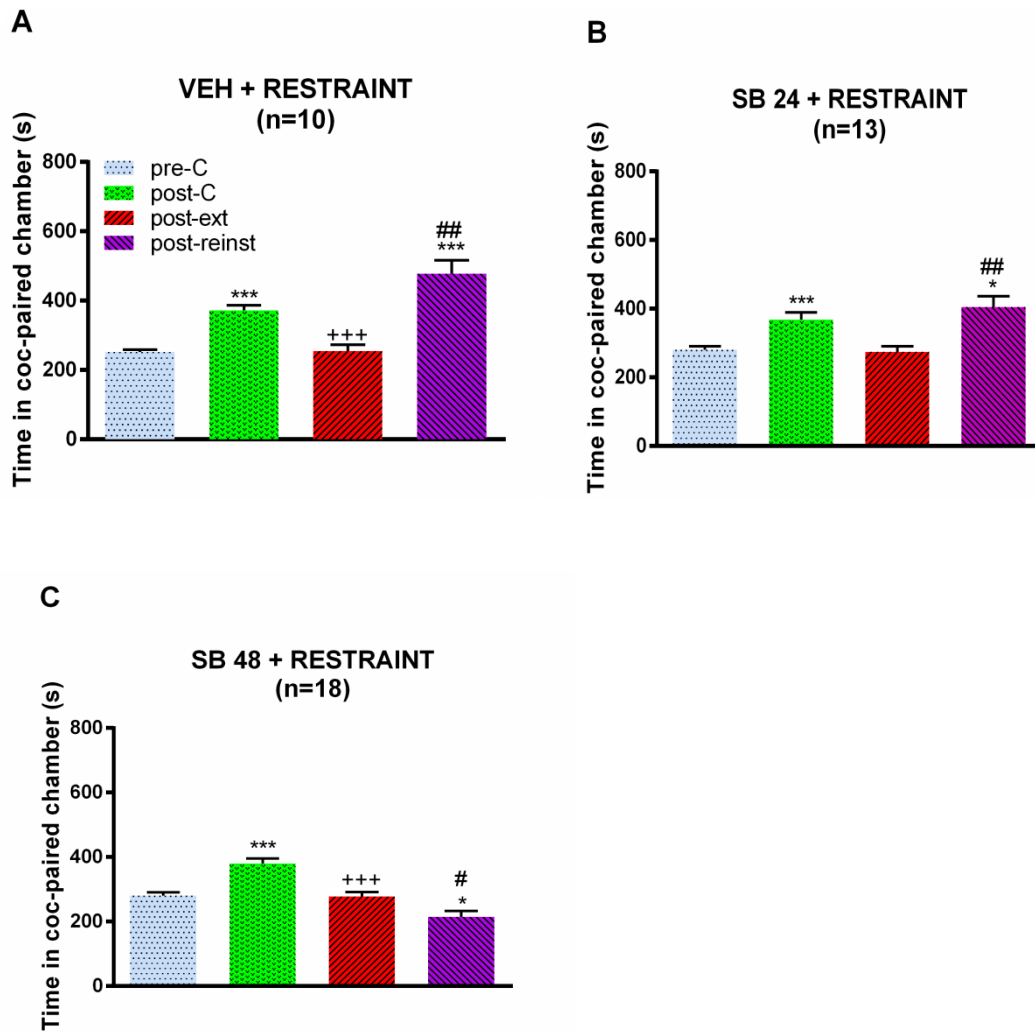


Figura 28. El bloqueo del D3R (48 mg/kg de SB-277011-A) antagonizó el restablecimiento de la CPP provocada por inmovilización. (A, B, C) Tiempo (en segundos) que pasaron los ratones en la cámara apareada con cocaína durante el Pre-condicionamiento (Pre-C), Post-acondicionamiento (Post-C), Post-extinción (Post-ext) y restablecimiento (Post-reinst) tras 15 minutos de inmovilización. Los animales fueron pretratados con vehículo (A) o SB-277011-A (24 o 48 mg/kg i.p.; B, C, respectivamente). * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ vs pre-C; +++ $p < 0.001$ vs post-C; # $p < 0.05$; ## $p < 0.01$ vs post-ext.

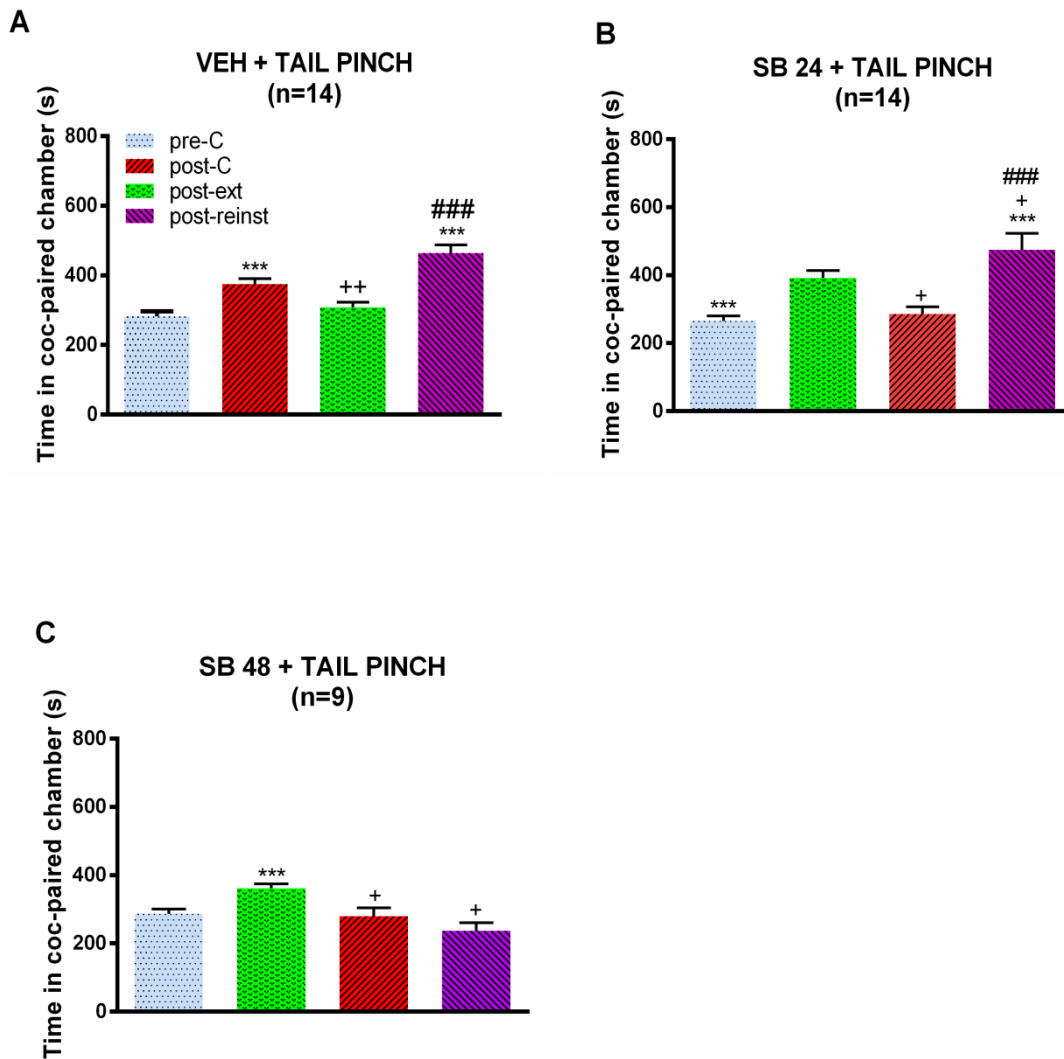


Figura 29. El bloqueo del D3R (48 mg/kg de SB-277011-A) antagonizó el restablecimiento de la CPP provocada por un estímulo doloroso (pinzamiento de la cola). (A-C) Tiempo (en segundos) que pasaron los ratones en la cámara apareada con cocaína durante el Pre-condicionamiento (Pre-C), Post-acondicionamiento (Post-C), Post-extinción (Post-ext) y restablecimiento (Post-reinst) tras 15 minutos del estímulo doloroso. Los animales fueron pretratados con vehículo (A) o SB-277011-A (24 o 48 mg/kg i.p.; B, C, respectivamente). *** $p < 0.001$ vs a pre-C; + $p < 0.05$, ++ $p < 0.01$ vs post-C; ### $p < 0.001$ vs post-ext.

Cuando evaluamos el efecto de SB-277011-A en el número de entradas de los animales con estrés físico en ambos compartimientos y en las cámaras emparejadas con cocaína y solución salina por separado, el ANOVA de una vía reveló diferencias significativas entre los grupos experimentales para el número total entradas [$F(2,38) = 23.28$, $p < 0.0001$ para la inmovilización; $F(2,34) = 5.03$, $p = 0.0122$ para pinzamiento de la cola], el número de entradas a la cámara apareada con cocaína [$F(2,38) = 22.69$, $p < 0.0001$ para la inmovilización; $F(2,34) = 3.61$, $p = 0.0380$ para pinzamiento de la cola] y para el número de entradas a la cámara asociada con salino [$F(2,38) = 15.10$, $p <$

0.0001 para la inmovilización; $F(2,34) = 5,53$, $p = 0.0083$]. Además, la disminución en el número de entradas provocada por el pretratamiento con el antagonista del D3R, fue dosis-dependiente. Como muestra la **figura 30A-C**, la administración de 24 mg/kg de SB-277011-A a ratones con inmovilización disminuyó significativamente el número de entradas totales, el número de entradas al compartimento asociado a la cocaína y al compartimento asociado a salino, con respecto a los animales que recibieron el vehículo en lugar del antagonista. La inyección de la dosis más alta de SB-277011-A a los animales inmovilizados también disminuyó significativamente el número de entradas totales con respecto al grupo de control y al grupo que recibió 24 mg/kg de SB-277011-A, el número de entradas al compartimento asociado a cocaína en comparación con el grupo que recibió la administración del vehículo y el grupo inyectado con 24 mg/kg de SB-277011-A, y el número de entradas a la cámara emparejada con salino con respecto al grupo de control.

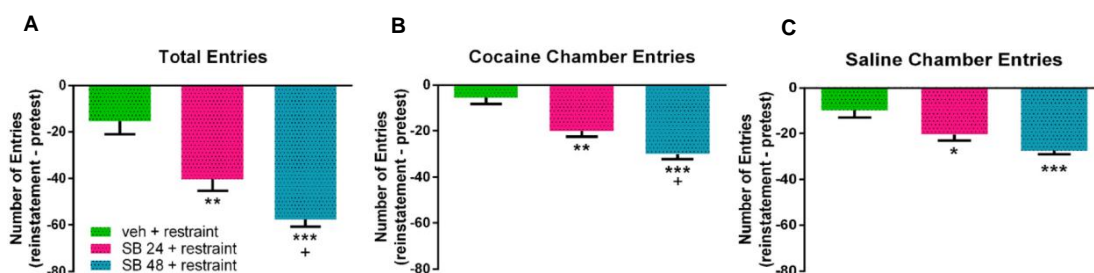


Figura 30. Diferencia entre el número de entradas totales a las cámaras de puntos y rayas (A), a la cámara apareada con cocaína (B) y a la cámara apareada con salino (C) durante el test de recaída de animales inmovilizados y durante el test Pre -C. Las barras representan la media \pm SEM. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0.001$ vs veh + inmovilización; + $p < 0,05$ vs SB 24 + inmovilización.

Por otra parte, en animales con inmovilización existían correlaciones significativas entre el score de CPP del Post-reinst y el número total de entradas ($r = 0.3894$, $p = 0.0130$; correlación de Pearson; **(Fig. 31A)**), el número de entradas al compartimento donde fueron condicionados ($r = 0.3779$, $p = 0.0162$; correlación de Pearson; **(Fig. 31B)**), y el número de entradas al compartimento asociado a salino ($r = 0.3609$, $p = 0.0222$; correlación de Pearson; **(Fig. 31C)**).

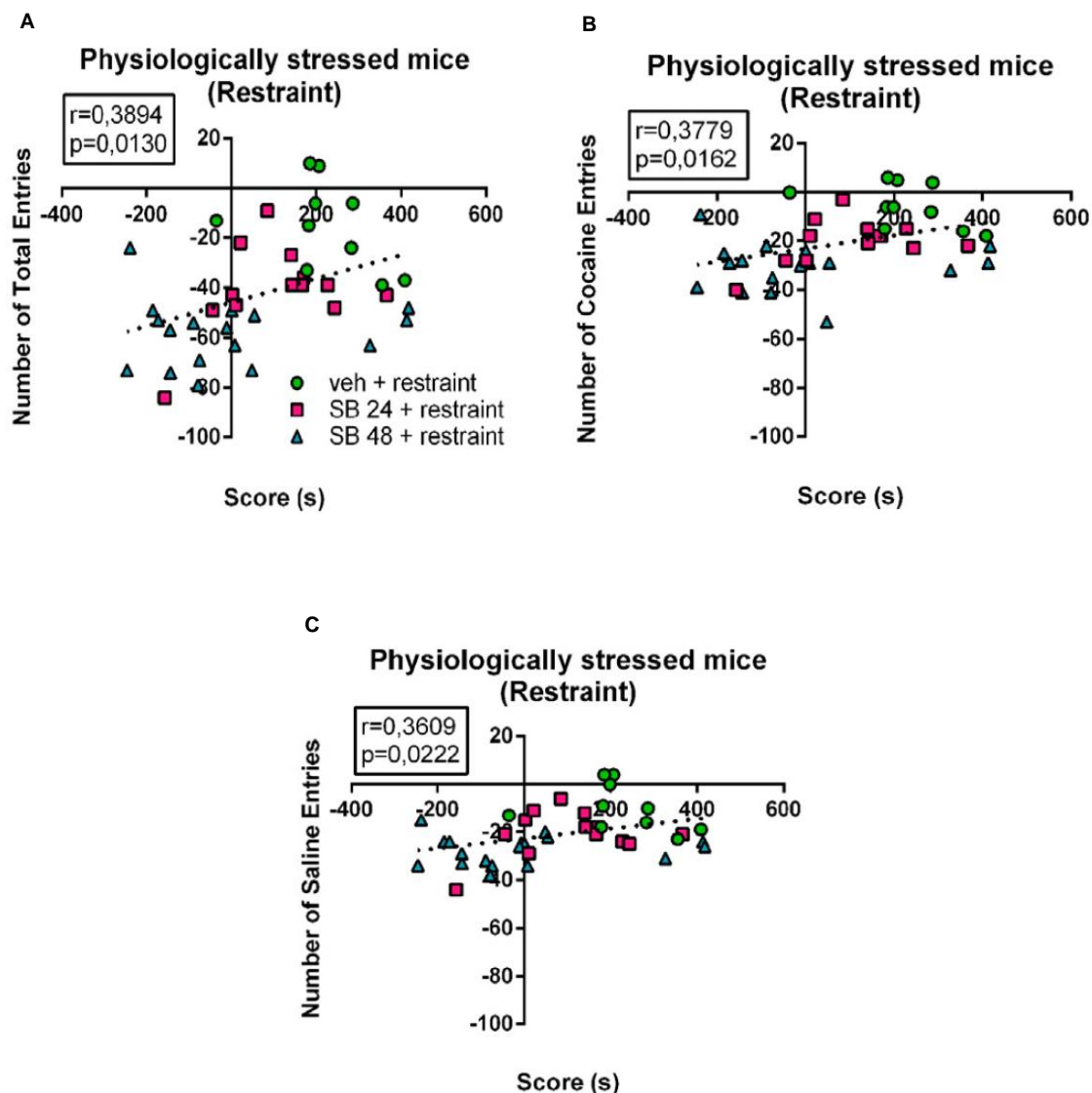


Figura 31. Correlación entre el score de la CPP durante la recaída producida por inmovilización y la diferencia en el número total de entradas (A), entradas a la cámara apareada con cocaína (B) o apareada con salino (C) durante la recaída y las entradas durante el test de Pre-C. La diferencia en el número de entradas totales y en las entradas a la cámara apareada con cocaína o solución salina se correlacionó positiva y significativamente ($p < 0.05$) con el score de CPP de la recaída.

El antagonista de D3R también disminuyó de forma dosis-dependiente el número total de entradas, así el número de entradas a los compartimentos asociados tanto con salino como con cocaína (**Fig. 32A-C**). La administración de 24 mg/kg de SB-277011-A a ratones sometidos a un pinzamiento de la cola disminuyó significativamente el número de entradas a la cámara emparejada con salino con respecto a los animales que recibieron el vehículo en lugar del antagonista. La inyección de la dosis más alta del antagonista a los animales sometidos a pinzamiento de la cola también disminuyó significativamente el

número de entradas totales, el número de entradas a la cámara emparejada con cocaína y el número de entradas a la cámara emparejada con salino con, respecto al grupo de control. No se observaron correlaciones significativas entre el *score*-CPP del Post-reinst de animales que fueron sometidos a pinzamiento de la cola y su número de entradas totales (**Fig. 33A**), el número de entradas a la cámara asociada a la cocaína (**Fig. 33B**) y el número de entradas a la cámara emparejada con salino (**Fig. 33C**).

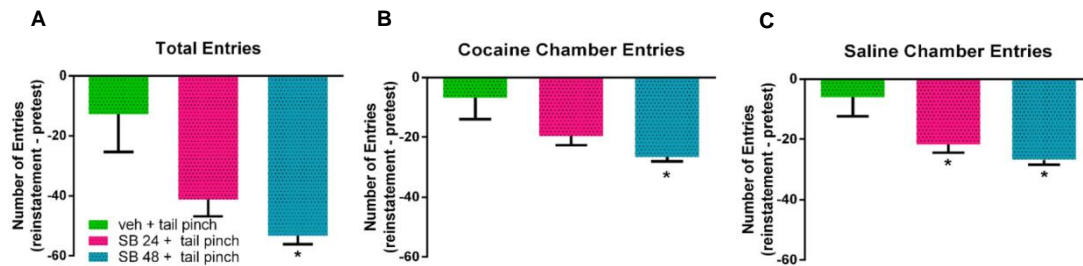
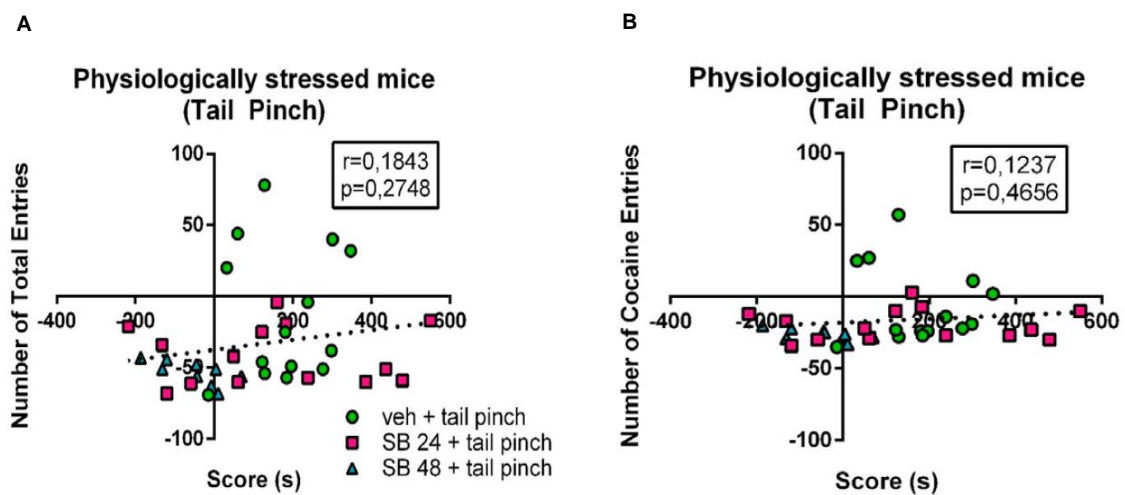


Figura 32. Diferencia entre el número de entradas totales a las cámaras de puntos y rayas (A), a la cámara apareada con cocaína (B) y a la cámara apareada con salino (C) durante el test de recaída de animales sometidos a pinzamiento de cola y durante el test Pre-C. Las barras representan la media \pm SEM. * $p < 0.05$ vs veh + pinzamiento de la cola.



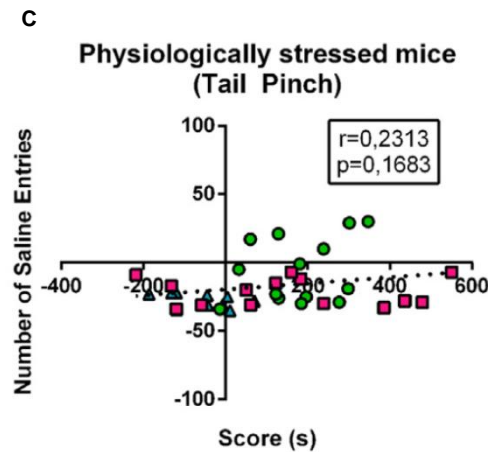


Figura 33. Correlación entre el score de la CPP durante la recaída inducida por pinzamiento de la cola y la diferencia en el número total de entradas (A), entradas a la cámara apareada con cocaína (B) o apareada con salino (C) durante la recaída, y entradas durante el test de Pre-C. La diferencia en el número de entradas totales y en las entradas a la cámara apareada con cocaína o con salino no se correlacionó significativamente con el score de CPP de la recaída.

4.2. El D3R está implicado en el incremento de los niveles plasmáticos de corticosterona durante la recaída en la CPP

Estudios previos han demostrado que el eje HHA se activa después de la administración aguda de muchas drogas, entre ellas la cocaína, lo que produce un aumento de los niveles de corticoides en plasma (162, 163). Para estudiar la posible implicación de los glucocorticoides en las recaídas en la CPP, se cuantificaron los niveles plasmáticos de corticosterona (principal glucocorticoide en roedores) en todos los grupos experimentales estudiados.

El ANOVA de una vía mostró diferencias significativas en la concentración plasmática de corticosterona para todos los grupos de experimentales de animales [F (4,33) = 31,00, $p < 0,0001$ para el grupo *priming* cocaína; F (4,45) = 38,00, $p < 0,0001$ para el grupo de derrota social; F (3,43) = 84,00, $p < 0,0001$ para el grupo de estrés por inmovilización; F (3,39) = 67,00, $p < 0,0001$ para el grupo de estrés por dolor]. Los niveles plasmáticos de corticosterona en animales que recibieron una dosis *priming* de cocaína o fueron sometidos a estrés social o fisiológico, sufrieron un incremento significativo respecto a sus niveles basales en animales de control (**Fig. 34A, B, C, D**). Por otra parte, una inyección de solución salina o un encuentro agonista sin derrota también aumentaron significativamente la concentración

plasmática de la hormona (**Fig. 34A, B**). Sin embargo, los niveles de corticosterona en animales que recibieron un *priming* de cocaína fueron significativamente más elevados que los que recibieron un *priming* de salino (**Fig. 34A**).

A continuación se estudió la posible implicación del D3R en la liberación de corticosterona durante la recaída en la CPP inducida por un *priming* de cocaína o por diferentes tipos de estrés. Para ello, se pretrataron los animales con diferentes dosis de SB-277011-A. Los resultados muestran que la dosis de 12 mg/kg del antagonista no bloqueó el aumento en la liberación de corticosterona en el Post-reinst en animales derrotados socialmente (**Fig. 34B**). Sin embargo, la dosis de 24 mg/kg de SB-277011-A bloqueó el aumento de los niveles plasmáticos de corticosterona tras el test Post-reinst, tanto en ratones que recibieron un *priming* de cocaína como aquellos sometidos a estrés social o fisiológico, con respecto a dichos niveles tras el test Post-cond. (**Fig. 34A, B, C, D**). La administración de 48 mg/kg de SB-277011-A antes del *priming* de cocaína o de la exposición a cualquiera de los dos tipos de estrés fisiológico, antagonizó significativamente el aumento en la liberación de corticosterona observado después del test Post-reinst (**Fig. 34A, C, D**).

Por otra parte, la correlación de Pearson mostró correlaciones significativas entre los niveles plasmáticos de corticosterona y el *score* de CPP tras el test Post-reinst en animales socialmente estresados que recibieron una inyección del antagonista D3R o su vehículo ($r = 0.3410$, $p = 0.0484$; **Fig. 35A**), los animales que recibieron una inyección del antagonista D3R o su vehículo antes de la inmovilización ($r = 0.3755$, $p = 0.0185$; **Fig. 35B**) y los ratones que recibieron una inyección del antagonista D3R o su vehículo antes del pinzamiento de la cola ($r = 0.33592$, $p = 0.0341$; **Fig. 35C**). No obstante, la correlación entre la concentración plasmática de corticosterona y el *score* de CPP en el Post-reinst de animales que recibieron un *priming* de cocaína no fue significativa (**Fig. 35D**).

Los niveles plasmáticos de corticosterona de ratones socialmente estresados que recibieron cualquier dosis de antagonista o su vehículo también

se correlacionó significativamente ($r = 0.3563$, $p = 0.0454$; **Fig. 37A**) con el número de entradas al compartimento donde fueron condicionados con cocaína, aunque las correlaciones con el número de entradas totales (**Fig. 37B**) y el número de entradas al compartimento asociado con solución salina (**Fig. 37C**) no fueron significativas. Además, los niveles de corticosterona en plasma de ratones con estrés físico que se pretrataron con el antagonista de D3R o con su vehículo, se correlacionaron significativamente con el número de entradas totales ($r = 0.6566$, $p < 0.0001$ para el grupo de inmovilización; $r = 0.4692$, $p = 0.0045$ para el grupo de pinzamiento de la cola; **Fig. 38A, Fig.39A**), con el número de entradas al compartimento asociado con la cocaína ($r = 0.3755$, $p = 0.0185$ para el grupo de inmovilización; $r = 0.4041$, $p = 0.0161$ para el grupo de pinzamiento de la cola; correlación de Pearson; **Fig. 38B, Fig. 39B**) y con el número de entradas al compartimento asociado a salino ($r = 0.5837$, $p < 0.0001$ para el grupo de inmovilización; $r = 0.4920$, $P = 0.0027$ para el grupo del pinzamiento de la cola; **Fig. 38C, Fig. 39C**).

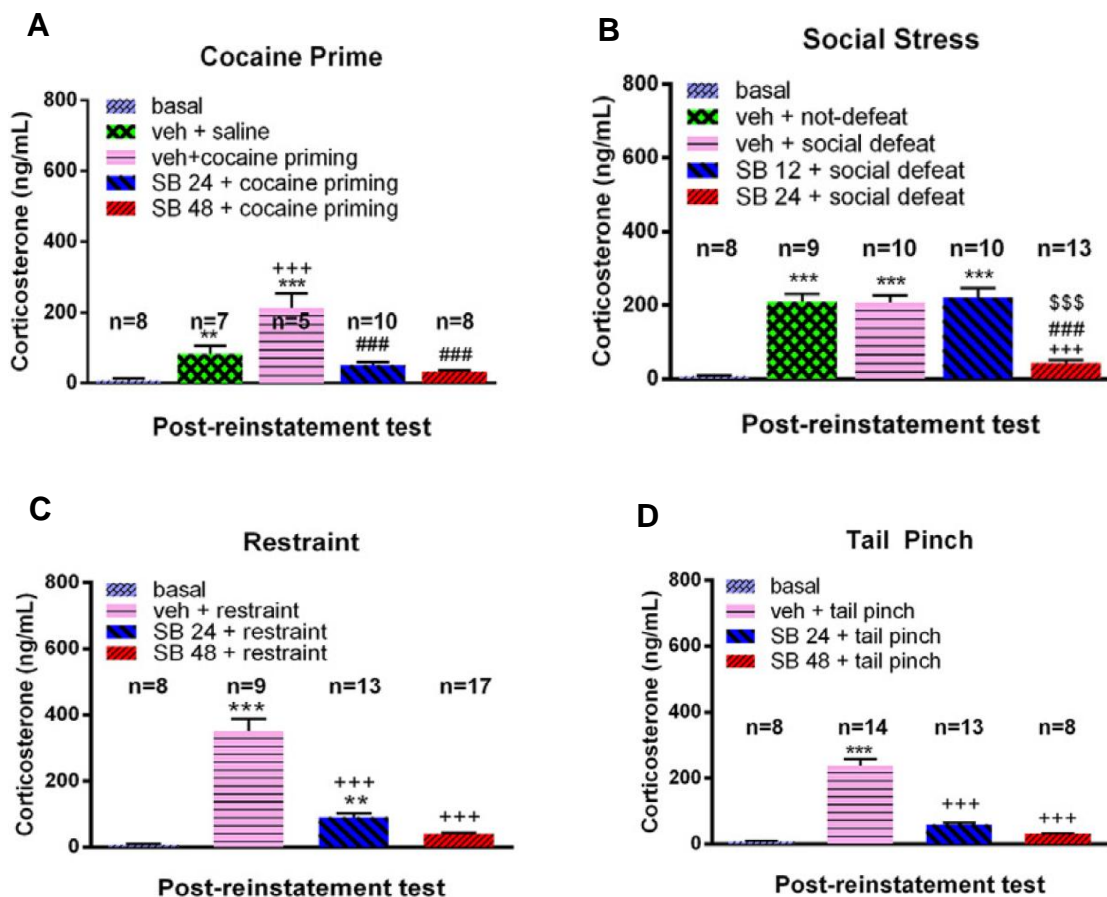


Figura 34. El bloqueo del D3R antagonizó el aumento en la concentración de corticosterona en plasma inducida por un *priming* de cocaína o por estrés social o fisiológico. Niveles de corticosterona en plasma tras el test de recaída en animales que recibieron salino o un *priming* de cocaína (A), en ratones que fueron sometidos a un estrés social (B), ratones que fueron sometidos a un estrés por inmovilización (C) y en animales sometidos a dolor mediante pinzamiento de cola (D), 30 min después de una inyección de vehículo o SB-277011-A (12, 24 o 48 mg/kg i.p.). Las barras representan la media \pm SEM. (A) ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs basal; +++ $p < 0.001$ vs veh + solución salina; ### $p < 0.001$ vs veh + *priming* cocaína. (B)*** $p < 0.001$ vs basal; +++ $p < 0.001$ vs veh + no derrota; ### $p < 0.001$ vs veh + derrota social; \$\$\$ $p < 0.001$ vs SB 12 + derrota social. (C) ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs basal; +++ $p < 0.001$ vs veh + inmovilización. (D) *** $p < 0.001$ vs basal; +++ $p < 0.001$ vs veh + pinzamiento de cola.

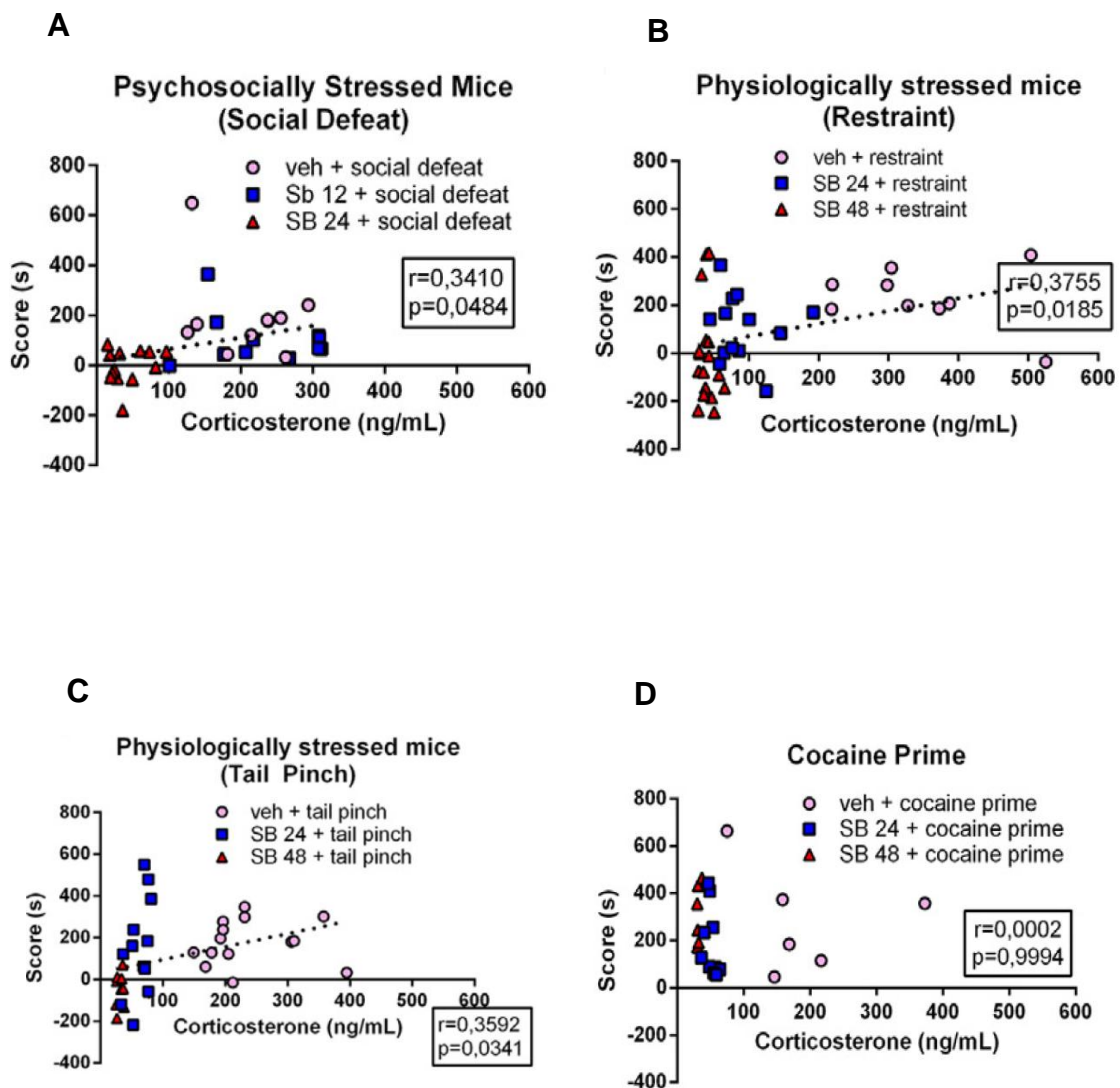


Figura 35. Correlación entre los niveles plasmáticos de corticosterona tras el test de recaída inducida por derrota social (A), inmovilización (B), dolor (C) y por un *priming* cocaína (D). Los niveles plasmáticos de corticosterona se correlacionaron positiva y significativamente ($p < 0.05$) con el score CPP en los animales con estrés social y fisiológico, pero no con los que recibieron un *priming* cocaína (correlación de Pearson).

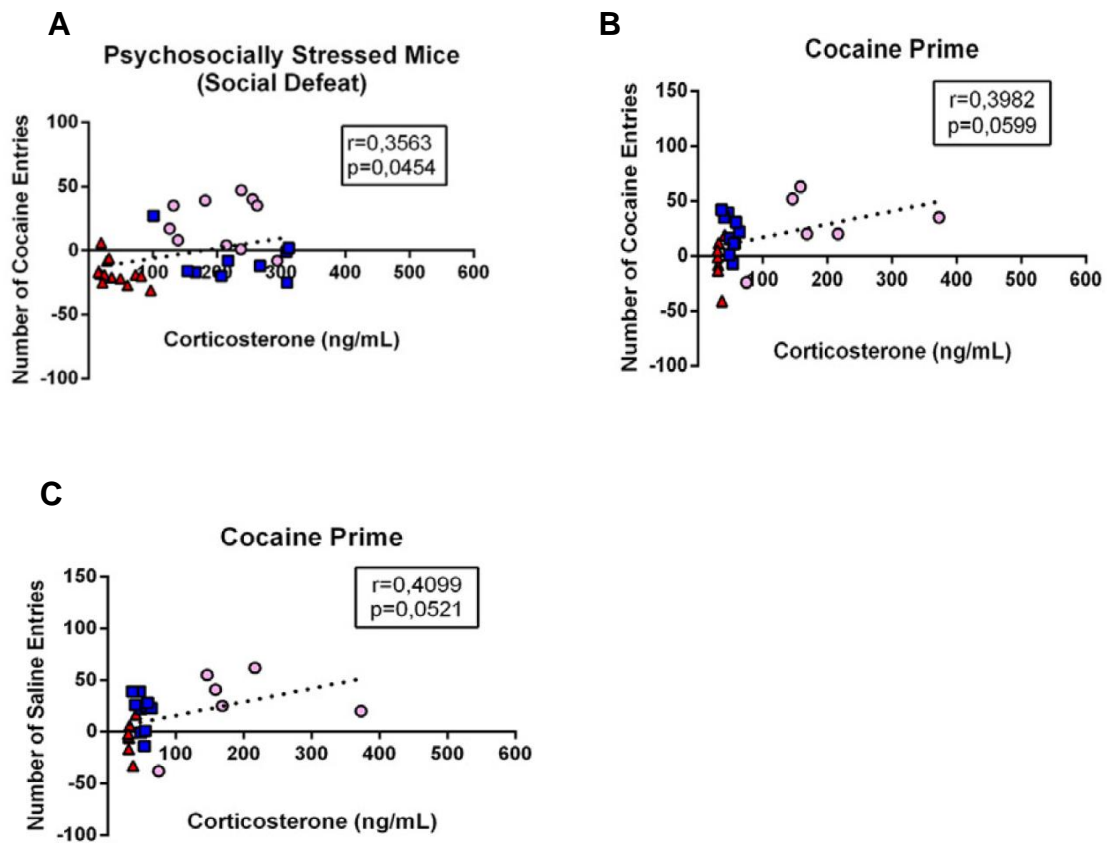
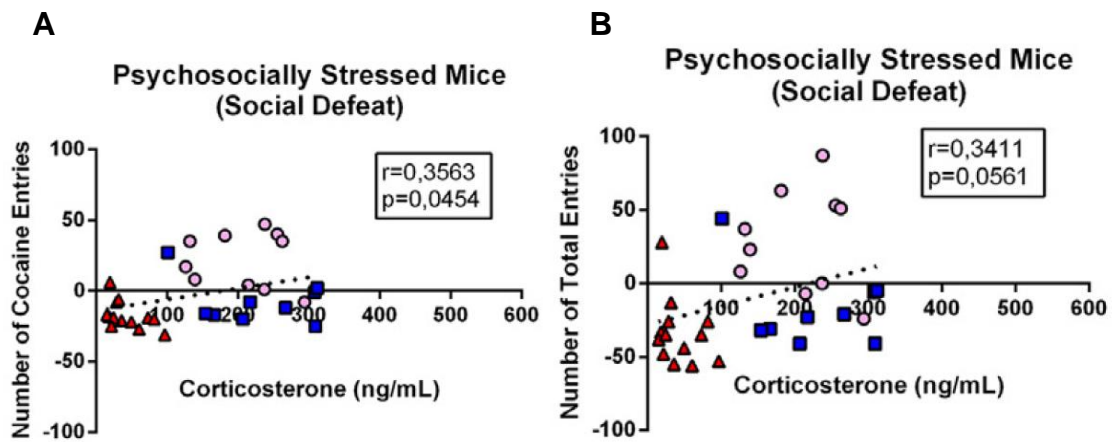


Figura 36. Correlación entre la concentración plasmática de corticosterona después del test de recaída provocada por un *priming* de cocaína y la diferencia entre el número total de entradas (A), entradas a la cámara apareada con cocaína (B), y entradas a la apareada con salino (C) durante el test de recaída y el del test Pre-C. Los niveles plasmáticos de corticosterona se correlacionaron positiva y significativamente ($p < 0.05$) con la diferencia en el número de entradas totales.



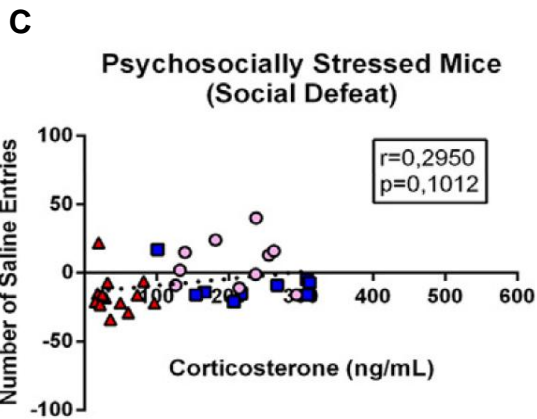


Figura 37. Correlación entre la concentración plasmática de corticosterona después del test de recaída provocada por un episodio de estrés social y la diferencia entre el número de entradas a la cámara apareada con cocaína (A), número total de entradas (B), y número de entradas a la cámara apareada con salino (C) durante el test de recaída y el del test Pre-C. Los niveles plasmáticos de corticosterona se correlacionaron positiva y significativamente ($p < 0.05$) con el número total de entradas a la sala asociada con cocaína.

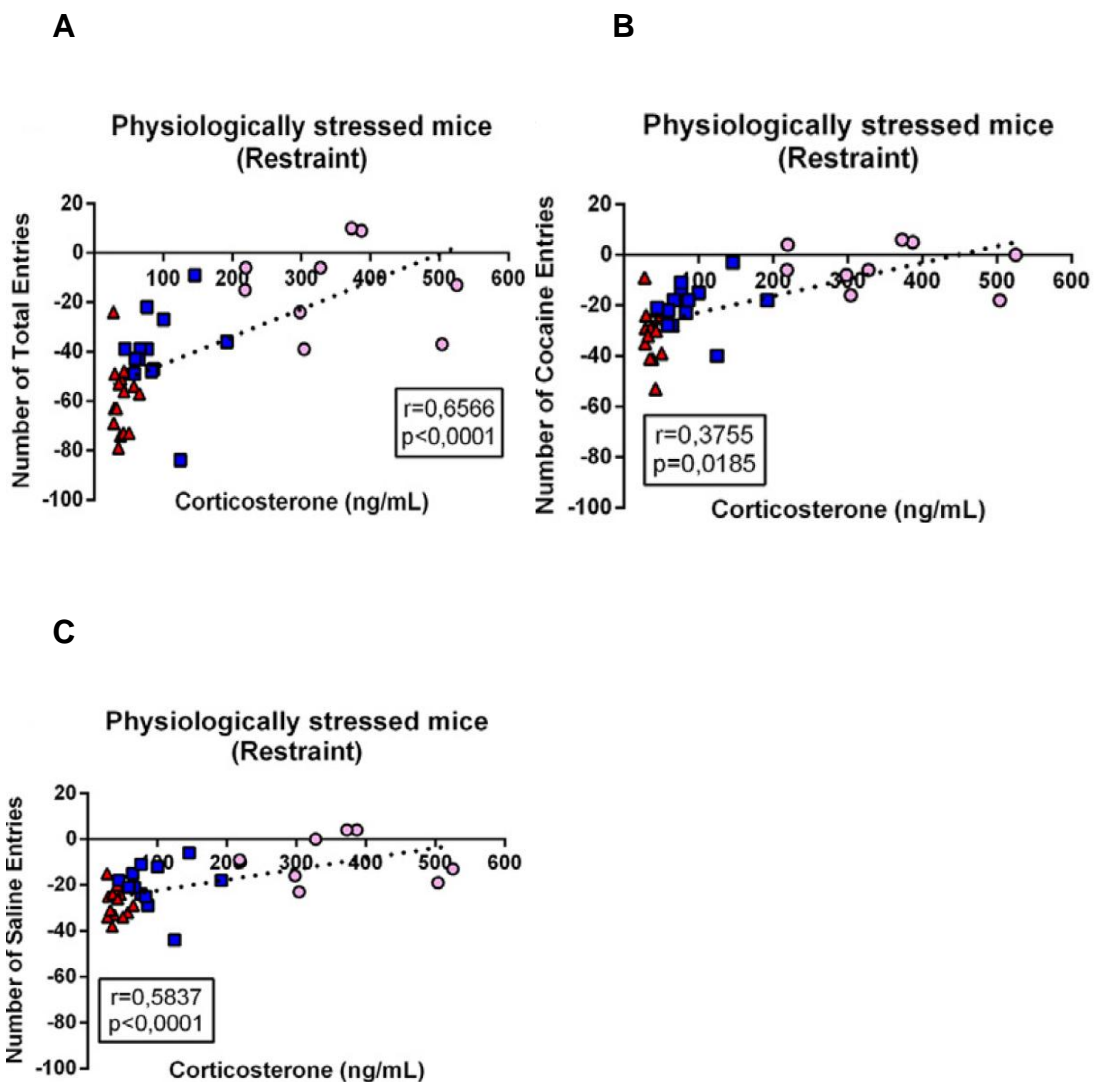


Figura 38. Correlación entre la concentración plasmática de corticosterona después del test de recaída provocada por inmovilización y la diferencia en el número de entradas totales (A), entradas a la cámara de cocaína (B), y a la sala pareada con salino (C) durante el test de recaída y el test pre-C. Los niveles plasmáticos de corticosterona se correlacionaron positiva y significativamente con la diferencia en el número de entradas totales ($p < 0.001$) y en las entradas a los compartimentos apareados con cocaína ($p < 0.05$) y con salino ($p < 0.001$)

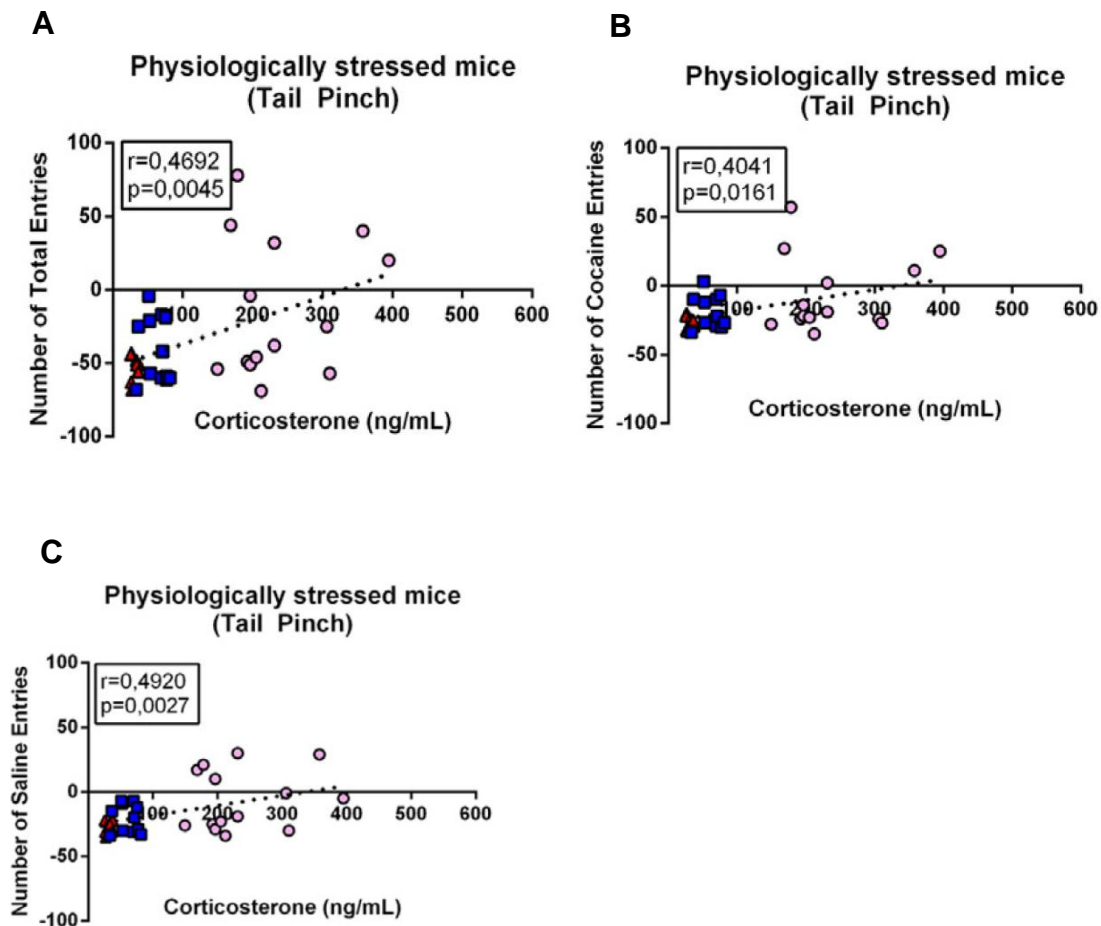


Figura 39. Correlación entre la concentración plasmática de corticosterona después del test de recaída provocada por dolor y la diferencia en el número de entradas totales (A), entradas a la cámara de cocaína (B), y a la sala pareada con salino (C) durante el test de recaída y el test pre-C. Los niveles plasmáticos de corticosterona se correlacionaron positiva y significativamente con la diferencia en el número de entradas totales ($p < 0.01$) y en las entradas a las cámaras emparejadas con cocaína ($p < 0.05$) y salino ($p < 0.01$).

4.3. El bloqueo de D3R previene las modificaciones en la expresión de DAT y D3R en NAc shell durante la recaída en la CPP provocada por estrés y por un priming de cocaína en ratones condicionados a cocaína

4.3.1 Cambios en la expresión de DAT y D3R en el NAc shell tras la recaída en la CPP provocada por un priming de cocaína y por estrés social

En primer lugar se estudiaron los cambios en la expresión de DAT y D3R en el NAc tras la recaída en la CPP inducida por un *priming* de cocaína o por un episodio de estrés social, en ratones que habían extinguido el comportamiento de la CPP, ya que este núcleo está enriquecido tanto en DAT (que se expresa en las terminaciones dopaminérgicas que lo inervan y que proceden del VTA) como en D3R, los cuales desempeñan un papel crítico en la homeostasis de DA. Además, se ha postulado que el D3R estaría críticamente involucrado en el humor y las emociones, así como en determinadas alteraciones neurológicas, como es el caso de las adicciones a sustancias de abuso (135).

El ANOVA de una vía para la expresión de DAT y D3R después de la recaída inducida por un *priming* de cocaína, mostró diferencias significativas entre los tratamientos ($F(2,19) = 26.08$, $p < 0.0001$ para DAT; $F(2,22) = 5.958$, $p = 0.0086$ para D3R). El test hoc mostró que hubo un aumento significativo de la expresión de DAT tras la recaída la CPP inducida por un *priming* de cocaína (**Fig. 40A**; $n = 8$), en comparación con la observada en el grupo que recibió salino ($n = 8$). Dicho incremento se inhibió significativamente mediante el pretratamiento con SB-277011A (24 mg/kg i.p.; **Fig. 40A**; $n = 6$). Se obtuvieron resultados similares cuando se estudió la expresión de D3R (**Fig. 40B**), con un aumento significativo de la expresión del receptor ($n = 9$) respecto a su control ($n = 8$). Dicho incremento fue antagonizado por SB-277011A (24 mg/kg i.p.; **Fig. 40B**; $n = 8$). Puesto que el NAc tiene un elevado contenido de neuronas GABAérgicas (medium spiny neurons-MSN), en otros grupos de animales se

realizó un estudio mediante IF en el NAc shell, con el fin de investigar si la expresión de D3R se producía en dichas neuronas tras la recuperación de memoria de preferencia de lugar. Para ello se utilizó GAD (glutamato decarboxilasa, enzima que transforma glutamato en GABA) como marcador de neuronas GABAérgicas y DAPI como marcador nuclear. Como se muestra en la **Fig. 41**, se pudo observar que el D3R se expresaba en neuronas positivas para GAD.

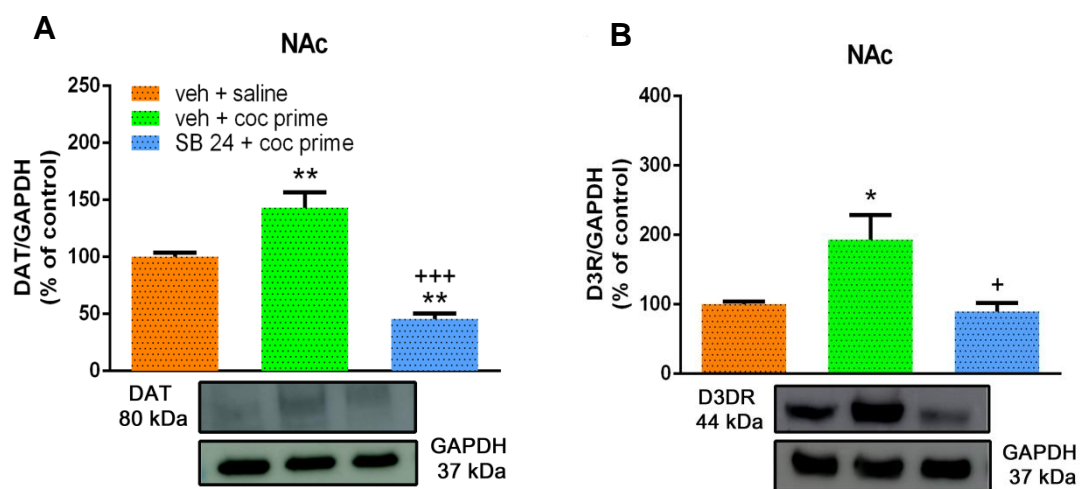


Figura 40. Análisis, mediante Western-blot, de la expresión de DAT (A) y de D3R (B) en el NAc shell. Los ratones fueron condicionados a cocaína y tras de 60 días de abstinencia recibieron una inyección de salino (veh + salino; controles), un *priming* de cocaína (12,5 mg/kg; veh + *priming* coc) o una inyección del antagonista del D3R, SB-277011-A (24 mg/kg) antes del *priming* de cocaína (SB 24 + *priming* coc). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs veh + salino; + $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ vs veh + *priming* coc.

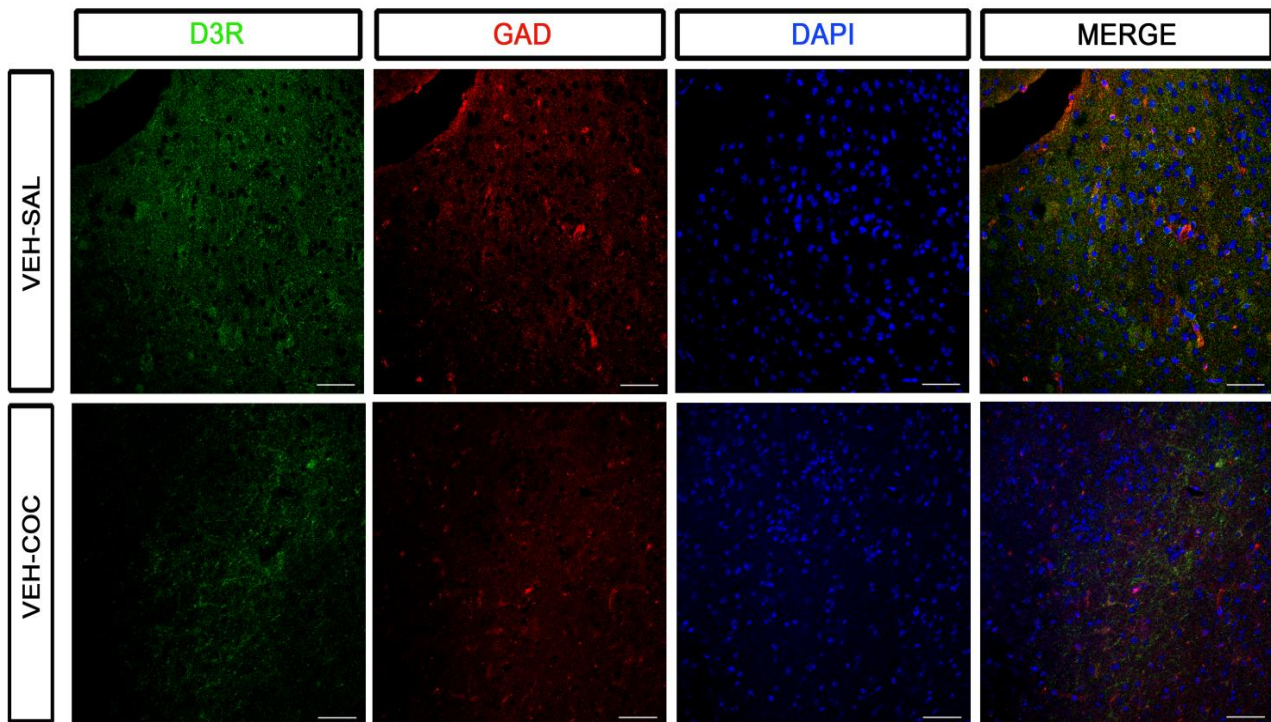


Figura 41. Imágenes representativas de secciones coronales del NAc shell que expresaron D3R (verde), GAD (rojo; neuronas glutamatérgicas) y DAPI (tinción nuclear, azul), en los controles (vehículo) y tras la recaída inducida por un *priming* de cocaína (veh-coc). Escala de la barra, 50 μ m.

A continuación se estudió la expresión de DAT y D3R en NAc después del CPP-reinst provocado por un episodio agudo de estrés social (**Fig. 42**). El ANOVA de una vía reveló diferencias significativas entre los tratamientos para todas las series de animales ($F(3,28) = 6.474$, $p = 0.0018$ para DAT; $F(3,25) = 6.048$, $p = 0.0030$ para D3R). La prueba post hoc indicó que hubo un aumento significativo en la expresión de DAT en NAc tras la recaída provocada por la derrota social ($n = 6$), respecto a los ratones no derrotados ($n = 9$). La administración de SB-277011-A (12 y 24 mg/kg i.p., $n = 8$, $n = 9$, respectivamente) 30 minutos antes del restablecimiento de la CPP provocada por la derrota social, antagonizó el aumento de la expresión de DAT de forma dosis-dependiente (**Fig. 42A**). Resultados similares se obtuvieron cuando se cuantificó el D3R (**Fig. 42B**). Se observó un aumento significativo en la expresión de D3R en ratones que sufrieron recaída en la CPP provocada por estrés social ($n = 6$), en comparación con el grupo no derrotado ($n = 9$). Además, la administración de SB-277011A (12 y 24 mg/kg i.p.; $n = 7$, $n = 7$,

respectivamente) 30 minutos antes del episodio de derrota social, bloqueó el aumento de la expresión de D3R de forma dosis-dependiente (**Fig. 42B**). Para ampliar nuestros resultados, se realizó un estudio fenotípico para caracterizar las poblaciones neuronales involucradas en la expresión de D3R en el NAc shell. Mediante IF, se observó que las neuronas D3R positivas colocalizaban con neuronas GABAérgicas, como indica la **Fig. 43**.

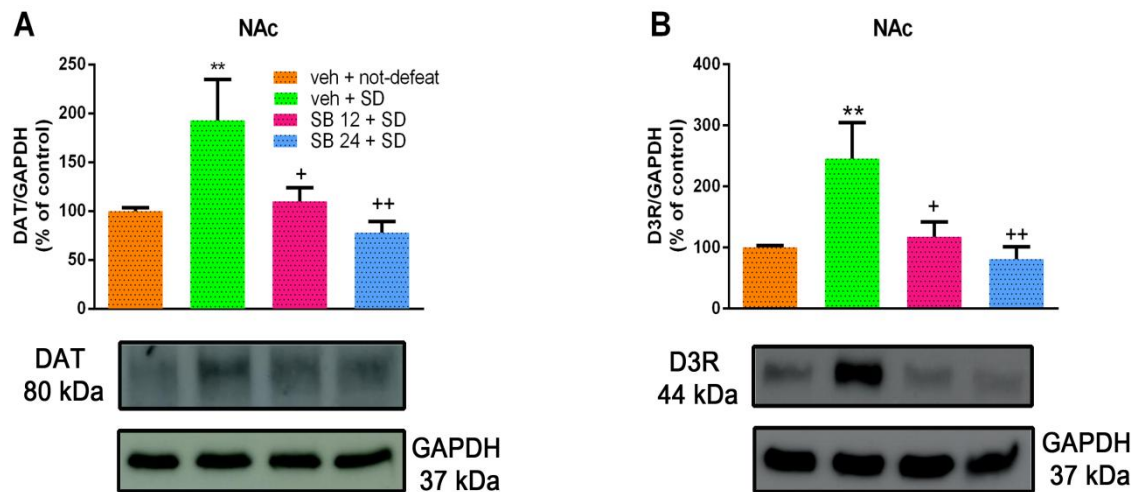


Figura 42. Análisis semicuantitativo representativo de la expresión de DAT (A) y del D3R (B) en el NAc shell. Los ratones fueron condicionados a cocaína y después de 60 días de abstinencia sufrieron un encuentro social no agresivo (veh + no derrotado; controles), un encuentro con derrota (veh + derrota social) o una inyección del antagonista del D3R, SB-277011-A (12 o 24 mg/kg) antes del encuentro con derrota. ** $p < 0,01$ vs veh + no derrotado; + $p < 0,05$, ++ $p < 0,01$ vs veh + derrota social.

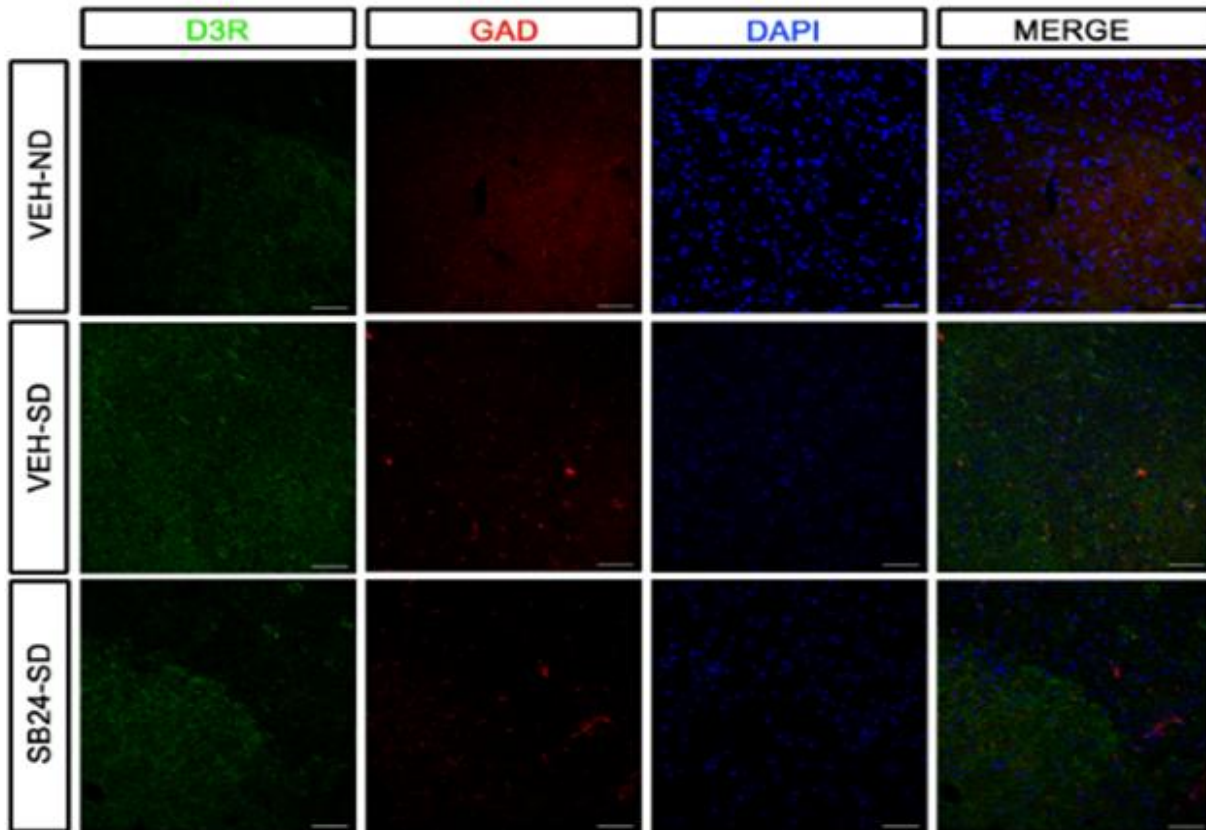


Figura 43. Imágenes representativas que muestran secciones coronales del NAc shell que expresaron D3R (verde), GAD (rojo; neuronas glutamatérgicas) y DAPI (tinción nuclear, azul) en controles (veh-ND), tras la derrota social (veh-SD) y en ratones que recibieron una inyección de SB-277011-A (24 mg/kg) antes de la derrota social (SB-SD). Escala de la barra, 50 μ m.

4.3.2 Regulación de la expresión de pAkt y pmTOR en el NAc tras la recaída en la CPP provocada por un *priming* de cocaína y por estrés social

Puesto que se ha propuesto que la cascada de señalización Akt-mTOR está acoplada al D3R (164), se determinó la expresión de pAkt y pmTOR (fosforilados; activados) en el NAc tras la recaída en la CPP inducida por la administración de un *priming* de cocaína y por un episodio de estrés social. El ANOVA de una vía no reveló diferencias significativas en la expresión de pAkt tras la recaída de la preferencia de lugar provocada por un *priming* de cocaína ($F(2,16) = 2.445$, $p = 0.1184$). Aunque se observó una tendencia hacia un aumento de pAkt (**Fig. 44A**, $n = 6$), dicho incremento no alcanzó significación estadística, en comparación con el grupo control ($n = 7$). De manera similar, el

ANOVA de una vía no mostró diferencias significativas entre los grupos en los niveles de pmTOR en el NAc tras la recaída en la CPP provocada por una dosis de *priming* de cocaína ($F(2,16) = 1.371$; $p = 0.2822$). Encontramos un aumento no significativo en la expresión de pmTOR después del restablecimiento de la CPP de cocaína ($n = 6$) con respecto al grupo de control ($n = 7$) que volvió a los niveles basales después de la administración de SB-277011A (24 mg/kg; $n = 6$) (**Fig. 44A**).

A continuación se realizó una caracterización de las poblaciones neurales involucradas en la expresión de pAkt. Como se muestra en la **Fig. 45A**, la mayoría de las neuronas positivas para pAkt son de tipo GABAérgico. Por otra parte, se pudo observar que el D3R se expresaba en neuronas positivas para pAkt (**Fig. 45B**), lo que añade evidencia a la noción de que el D3R podría regular la señalización de Akt después de la exposición a un *priming* de cocaína.

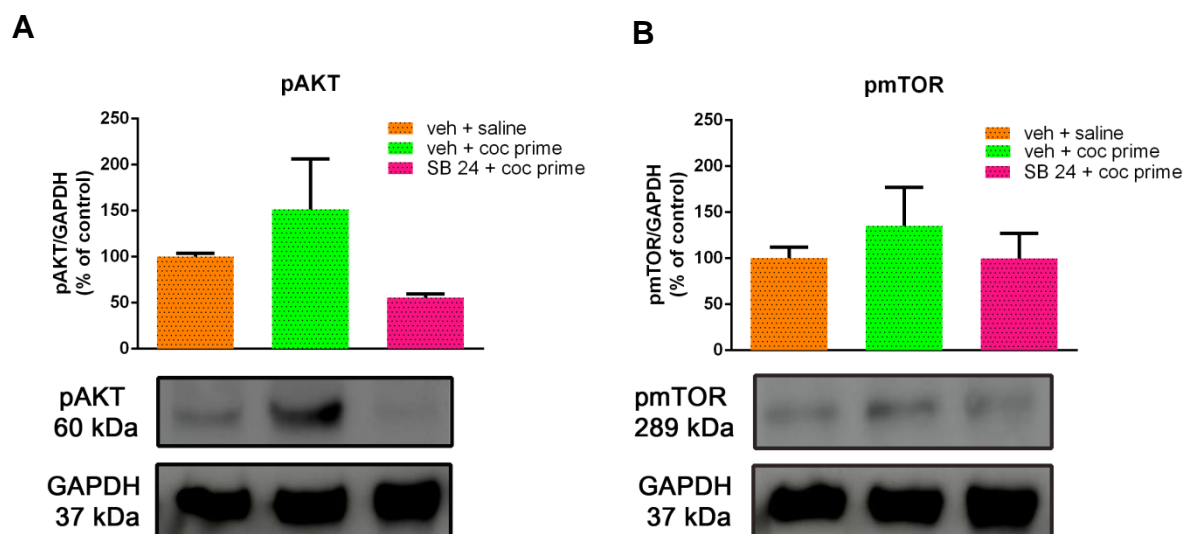
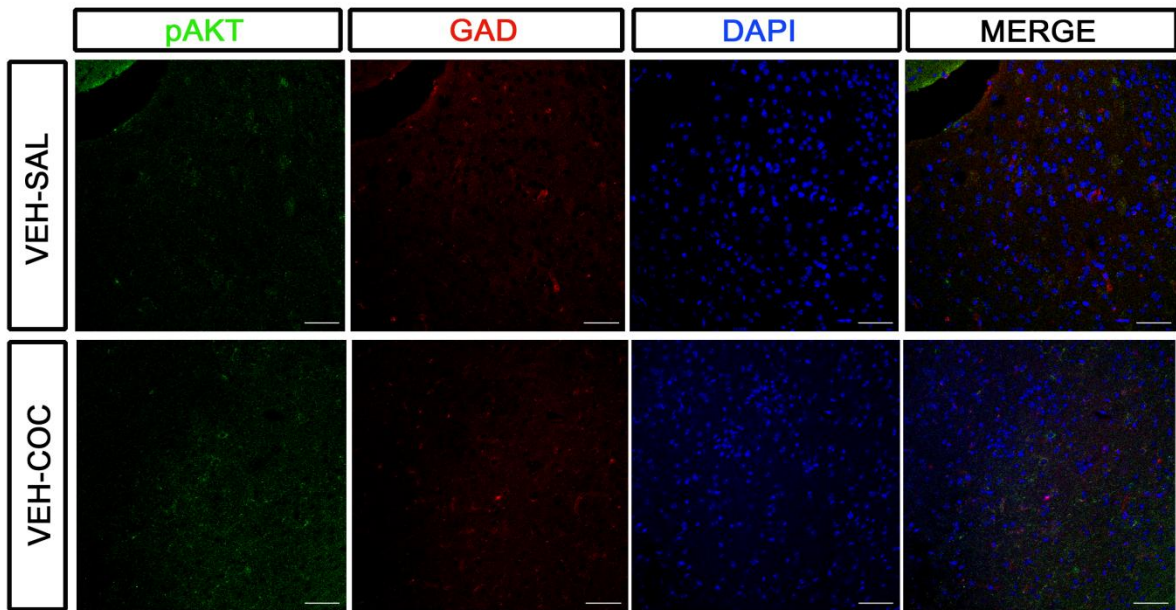


Figura 44. Análisis semicuantitativo representativo de la expresión de la proteína Akt fosforilada (activada; pAkt; A) y de mTOR fosforilado (pmTOR; B) en el NAc shell (A) durante la recaída. Los ratones fueron condicionados a cocaína y después de 60 días de abstinencia recibieron una inyección de salino (veh + salino; controles), una dosis *priming* de cocaína (12,5 mg/kg; veh + *priming* coc) o una inyección del antagonista del D3R (SB-277011-A; 24 mg/kg) antes de un *priming* de cocaína (SB 24 + *priming* coc). No se observaron cambios significativos en los niveles de pAkt o de pmTOR.

A



B

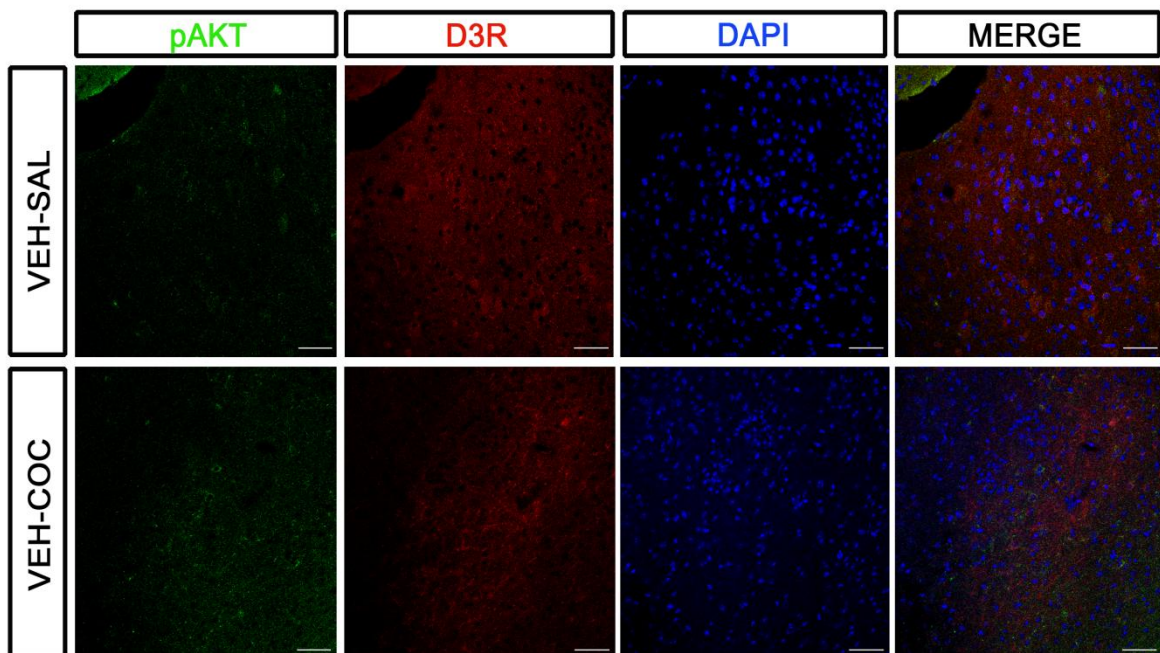


Figura 45. Imágenes representativas del NAc shell para pAkt (verde;A,B), GAD (A, rojo; neuronas glutamatérgicas), D3R (B, rojo) y DAPI (A,B; tinción nuclear, azul) en los controles (VEH-SAL) y tras la recaída inducida por un *priming* de cocaína (VEH-COC). Escala de la barra, 50 μ m.

Cuando evaluamos los efectos de la derrota social en la expresión de pAkt y pmTOR en el NAc, el ANOVA de una vía no reveló diferencias significativas entre los tratamientos. Como se representa en la **Fig. 46**, los niveles de pAkt después de la derrota social ($n = 6$) fueron similares a los obtenidos en ratones no derrotados ($n = 7$). Cuando se administró SB-277011-A (12 mg/kg, $n = 6$; 24 mg/kg, $n = 6$) antes del episodio de derrota social, hubo una disminución no significativa en la expresión de pAkt. Del mismo modo, el ANOVA de una vía no reveló cambios significativos en los niveles de pmTOR en el NAc después de la recaída de la CPP provocada por la derrota social ($F(3,21) = 2.000$; $p = 0.1513$). La recaída de la CPP inducida por el estrés social ($n = 6$) no alteró significativamente la relación pmTOR/GAPDH en NAc en comparación con los animales no derrotados ($n = 7$), y no se observaron modificaciones significativas después de la administración de 12 mg/kg ($n = 6$) o 24 mg/kg ($n = 6$) de SB-277011-A.

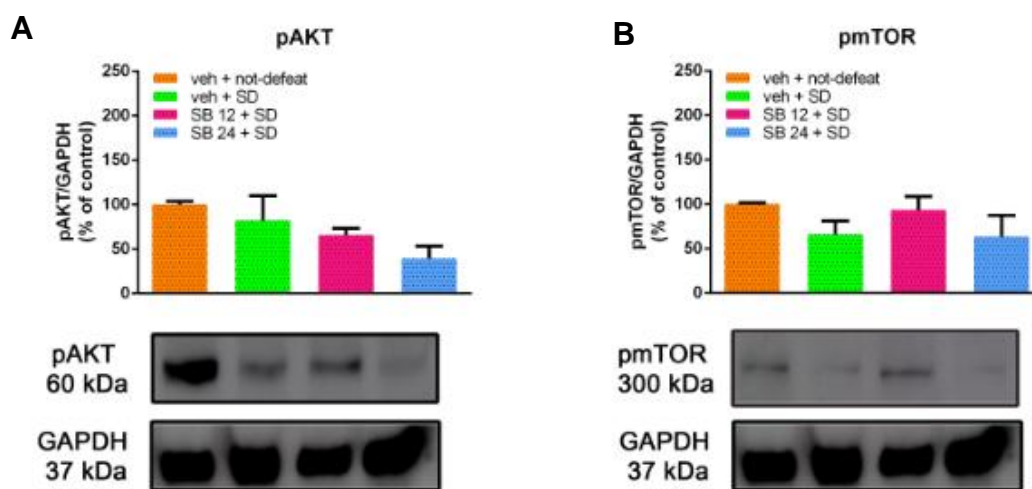
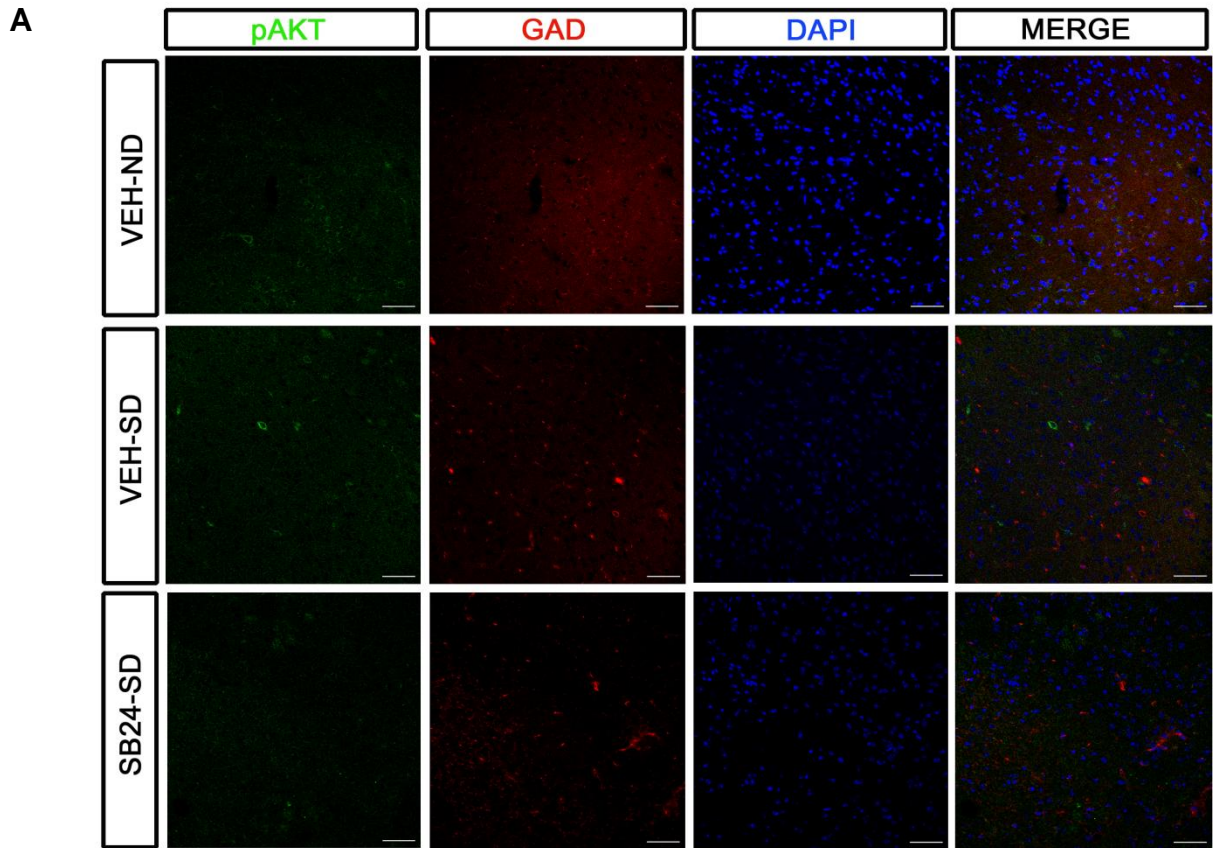


Figura 46. Expresión de pAkt fosforilada (A) y de pmTOR (B) en el NAc shell. Los ratones fueron condicionados a cocaína y después de 60 días de abstinencia sufrieron un encuentro social no agresivo (veh + no derrota; controles), un encuentro con derrota (veh + SD) o una inyección del antagonista del D3R (SB-277011-A; 12 o 24 mg/kg) antes del encuentro antagónico. Tras la recaída en la CPP no se observaron cambios significativos en los niveles de pAkt o pmTOR.

A continuación, se realizó un estudio, mediante IF, para caracterizar la posible expresión de pAkt en neuronas GABAérgicas del NAc shell. Tras el episodio de derrota social, se observó que pAkt colocalizaba con neuronas

positivas para GAD (**Fig. 47A**). Además, y como se observa en la **Fig. 47B**, el D3R colocalizó con pAkt.



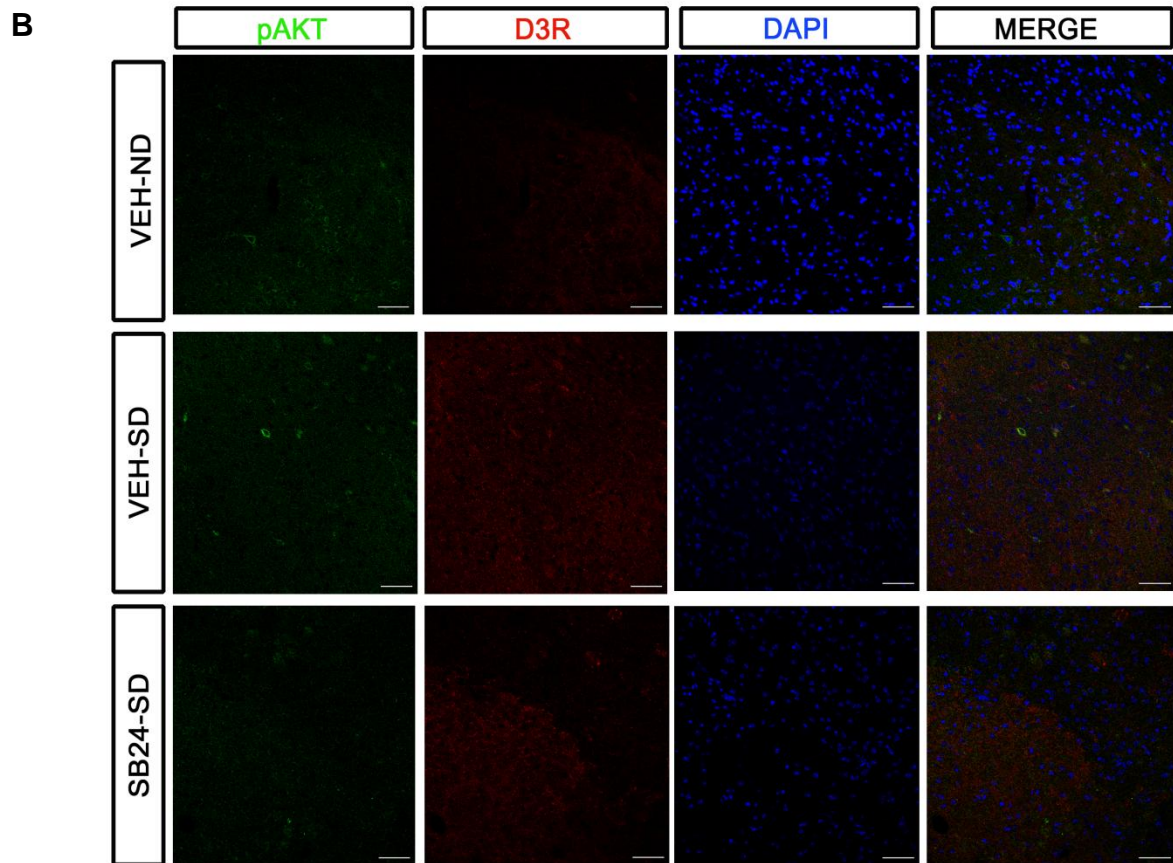


Figura 47. Imágenes representativas que muestran la expresión, secciones coronales del NAc shell, de pAkt (verde; A,B), GAD (A, rojo; neuronas glutamatérgicas), D3R (B, rojo) y DAPI (A,B; tinción nuclear, azul), en animales control (VEH-ND), en ratones que sufrieron derrota social (VEH-SD) y en aquellos que recibieron una inyección de SB-277011-A (24 mg/kg) antes del episodio de derrota social (SB24-SD). Escala de la barra, 50 μ m.

4.4. Implicación del D3R en BLA y en el DG en la recaída en la CPP provocada por un priming de cocaína y por estrés social

La función del D3R en el refuerzo, motivación y autocontrol, le confiere un papel destacado en la adicción (165). Dado que la liberación de DA desde sus terminaciones, que provienen del VTA, regula la actividad de las áreas del cerebro, como BLA y DG, involucradas en el procesamiento de recuerdos relacionados con el consumo de drogas y en la recaída en los comportamientos de búsqueda de drogas, (166-172), y puesto que el consumo de sustancias de abuso induce neuroplasticidad en las sinapsis dopaminérgicas (173) y que se ha postulado que DAT está bajo control del D3R (174, 175), evaluamos la expresión de ambos en BLA y DG después de la recaída en la CPP desencadenada por un *priming* de cocaína o por un episodio agudo de derrota social.

4.4.1 La recaída en la CPP inducida por un priming de cocaína o por estrés social modificó la expresión D3R y DAT en BLA, pero no en DG hipocampal

El ANOVA de una vía para la expresión de DAT y D3R en BLA tras la recaída inducida por un *priming* de cocaína puso de manifiesto diferencias significativas entre tratamientos ($F(2,18) = 3.759$, $p = 0.0432$ para DAT; $F(2,18) = 3.662$, $p = 0.0463$ para D3R). El test *post hoc* de Turkey mostró un incremento no significativo en la expresión de D3R y DAT en BLA tras de la recaída en la CPP desencadenada por un *priming* de cocaína con respecto a los animales control, a los que se les administró una inyección de salino (**Fig. 48A, B**). Además, a pesar de que SB-277011-A no bloqueó la recaída en el CPP, sí que provocó una disminución significativa de los niveles de ambas proteínas en esta región (**Fig. 48A, B**).

El ANOVA de una vía para la expresión de DAT y D3R en DG después de la recaída inducida por un *priming* de cocaína no evidenció diferencias significativas entre tratamientos ($F(2,17) = 1.603$, $p = 0.2302$ para DAT; $F(2,19) = 2.737$, $p = 0.0903$ para D3R). Igualmente, el test de Tukey no reveló cambios

en la expresión de D3R y DAT en el DG de ratones que recibieron un *priming* de cocaína en comparación con sus respectivos controles (Fig. 48C, D) ni de animales pretratados con el antagonista del D3R (Fig. 48C, D).

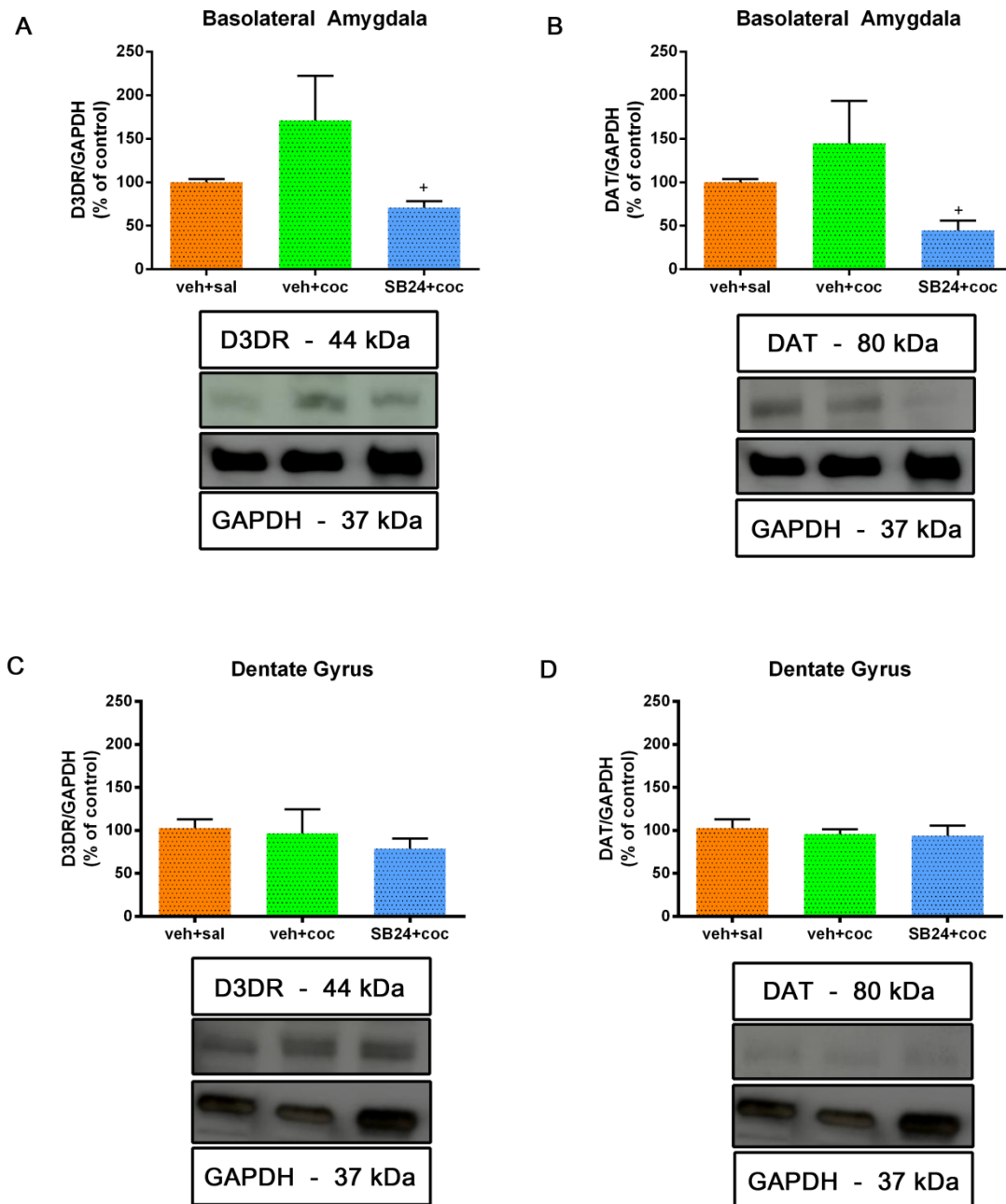
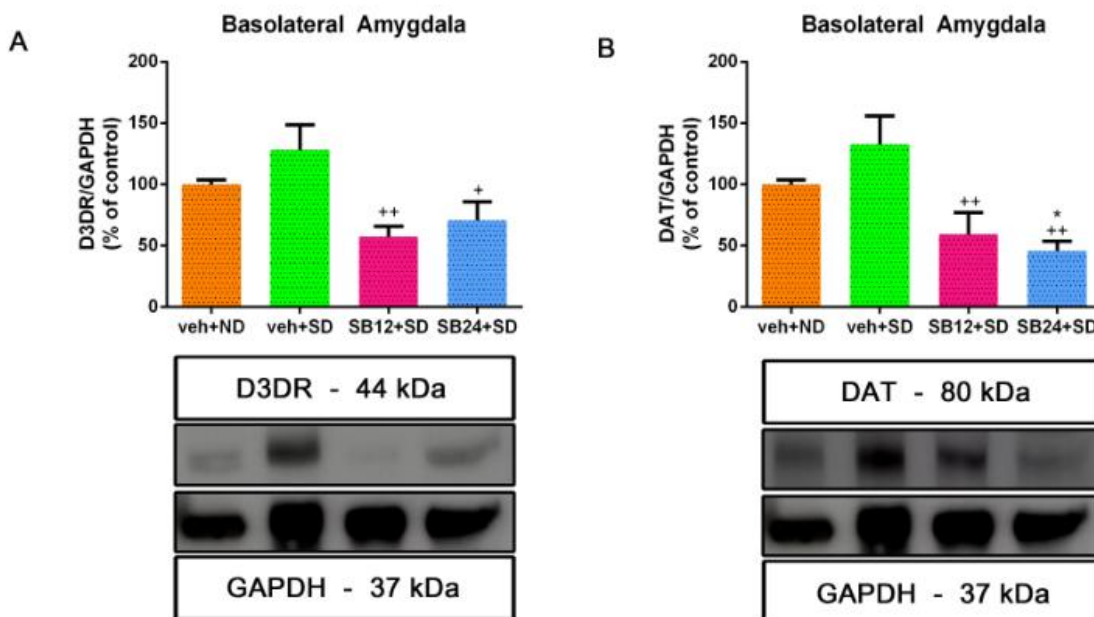


Figura 48. Análisis semicuantitativo de la expresión de D3R y DAT en BLA (A,B) y en DG (C,D). Los ratones fueron condicionados a cocaína y después de 60 días de abstinencia recibieron una inyección de salino (veh + sal; controles), un *priming* de cocaína (12,5 mg/kg; veh + coc prime) o una inyección del antagonista D3R SB-277011-A (24 mg/kg) antes del *priming* de cocaína (SB 24 + *priming* coc). A continuación se realizó un test de CPP durante 15 minutos. Se produjo una disminución significativa de la expresión de D3R y DAT en BLA en animales pretratados con SB-277011-A, ⁺ p< 0.05 vs veh + coc; pero no se observaron cambios significativos en los niveles de D3R o DAT en ningún grupo en DG.

El ANOVA para la expresión de DAT y D3R en BLA después de la reactivación de la CPP provocada por un episodio agudo de estrés social reveló diferencias significativas entre tratamientos ($F(3,23) = 8.035$, $p = 0.0008$ para DAT; $F(3,22) = 6.079$, $p = 0.0036$ para D3R). Paralelamente, el test de Tukey mostró un incremento no significativo en la expresión de D3R y DAT en BLA (**Fig. 49A, B**) tras la recaída en la CPP desencadenada por una sesión aguda de estrés social con respecto a los controles. La administración de SB-277011-A disminuyó significativamente los niveles de D3R y DAT observados tras la recaída en la CPP en esta área (**Fig. 49A, B**).

El ANOVA no manifestó diferencias significativas entre tratamientos para la expresión de DAT y D3R en DG después del CPP-reinst provocado por un episodio agudo de estrés social ($F(3,24) = 0.6896$, $p = 0.5673$ para DAT; $F(3,25) = 2.441$, $p = 0.0879$ para D3R). La prueba de Tukey tampoco puso de manifiesto cambios significativos en los niveles de D3R y DAT en el DG de ratones con estrés social que restablecieron la CPP pretratados con vehículo, ni de aquellos que fueron pretratados con el antagonista y que no recayeron (**Fig. 49C, D**).



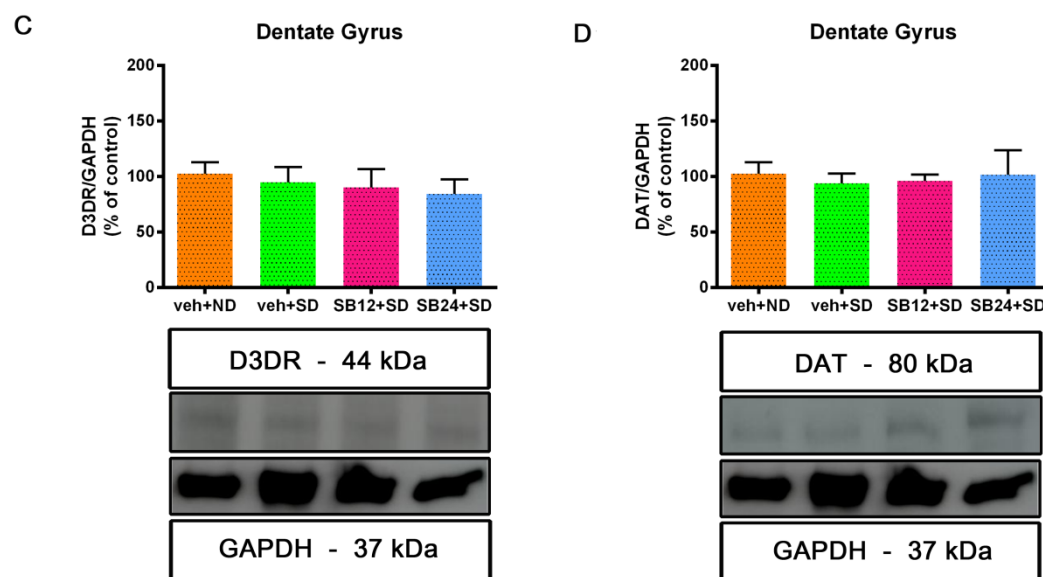


Figura 49. Expresión de D3R y DAT en BLA (A,B) y en DG (C,D). Los ratones fueron condicionados a cocaína y después de 60 días de abstinencia sufrieron un encuentro social no agresivo (veh + no derrota; controles), un encuentro con derrota (veh + SD) o una inyección del antagonista D3R SB-277011-A (12 o 24 mg/kg) antes del encuentro con derrota social. A continuación se realizó un test de CPP durante 15 minutos. Se observaron cambios significativos en los niveles de D3R y DAT entre los grupos en BLA pero no en DG. D3R: * $p < 0.05$ vs veh + ND; + $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs veh + SD.

4.4.2 La recaída en la CPP provocada por un *priming* de cocaína o por estrés social, disminuyó la activación de mTOR en BLA y DG

La señalización de mTOR es esencial en el NAc para el restablecimiento inducido por señal de la autoadministración de cocaína en ratas (176) y, en el hipocampo y la amígdala, desempeña un papel importante en la plasticidad sináptica relacionada con la reconsolidación de la CPP inducida por cocaína y en el procesamiento de otras memorias de comportamiento (55, 177, 178). Por ello, hemos estudiado la expresión de mTOR fosforilado (activado; pmTOR) en BLA y DG tras del restablecimiento de la CPP provocado por un *priming* de cocaína y un episodio agudo de derrota social.

El ANOVA de una vía para la expresión de pmTOR en BLA tras la recaída inducida por un *priming* de cocaína mostró diferencias significativas entre tratamientos ($F(2,26) = 5.270$, $p = 0.0120$). Paralelamente, mediante la prueba de Tukey, los resultados mostraron una disminución significativa en la relación pmTOR/mTOR en BLA después de la recaída en la CPP provocada

por un *priming* de cocaína, que fue antagonizado mediante la administración de 24 mg/kg de SB-277011-A (**Fig. 50A**). Por otra parte, el ANOVA de una vía para la fosforilación de mTOR en DG tras la recaída inducida por un *priming* de cocaína mostró diferencias significativas entre tratamientos ($F(2,28) = 8.016$, $p = 0.0018$). El test de Turkey indicó que el bloqueo de D3R disminuyó significativamente dicha fosforilación con respecto a los animales control (**Fig. 50B**).

El ANOVA de una vía para la ratio de fosforilación de mTOR en BLA después del CPP-reinst provocado por un episodio agudo de estrés social mostró diferencias significativas entre tratamientos ($F(3,31) = 17.96$, $p < 0.0001$). La prueba de Tukey puso de manifiesto que después de la recaída de la CPP provocada por un episodio agudo de derrota social hubo una menor ratio de fosforilación de mTOR en el BLA con respecto a los animales control. El bloqueo del D3R evitó dicha disminución (**Fig. 50C**).

El ANOVA de una vía para la fosforilación de pmTOR en DG después de la restauración provocada por un episodio agudo de estrés social no mostró diferencias significativas entre tratamientos ($F(3,36) = 2.846$, $p = 0,0511$). Sin embargo, el test de Turkey mostró que la relación pmTOR/mTOR disminuyó significativamente en el DG después del restablecimiento de la CPP provocado por un episodio agudo de derrota social, y esta disminución fue revertida por el pretratamiento con SB-277011-A previamente al episodio agudo de estrés (**Fig. 50D**).

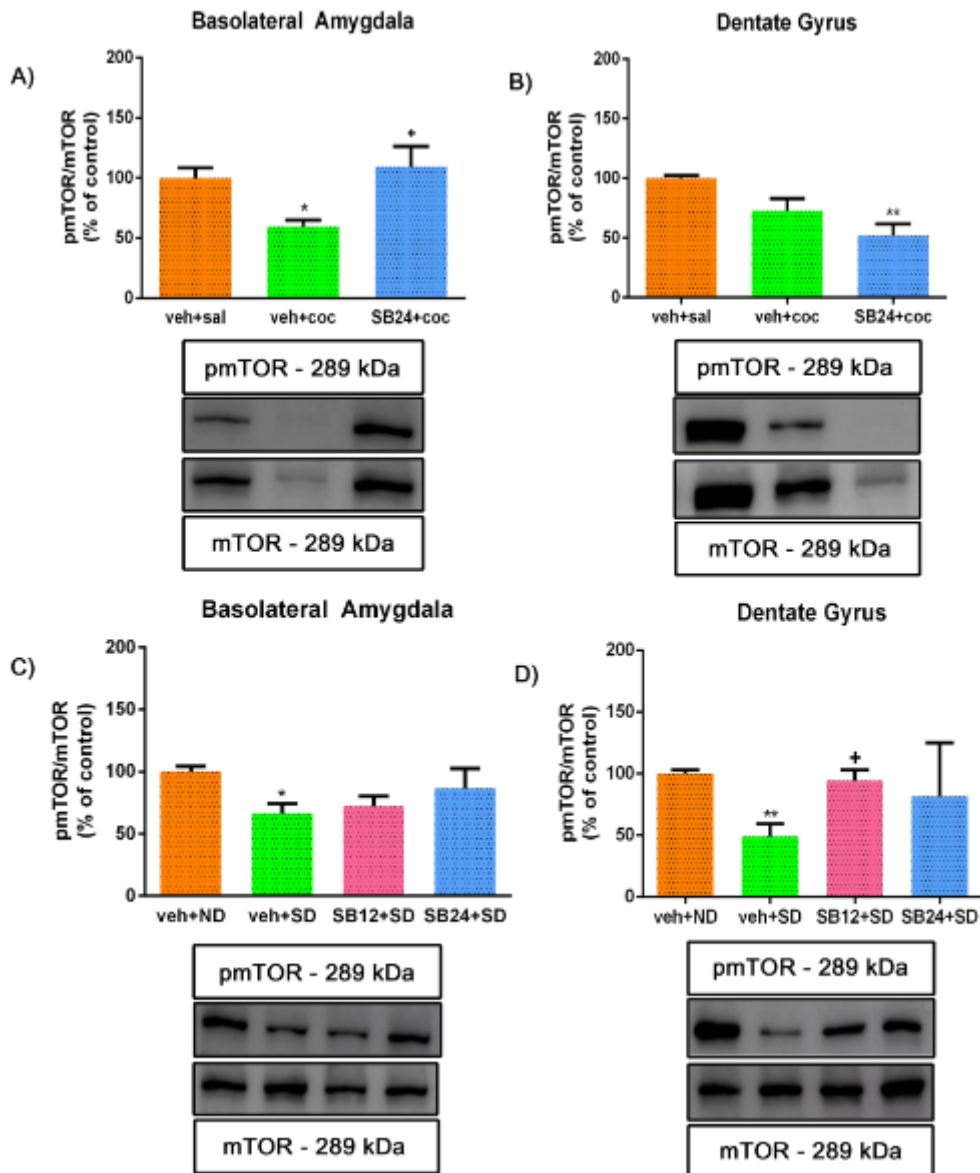


Figura 50. Análisis semicuantitativo representativo de la ratio pmTOR/mTOR en BLA (A, C) y en DG (B, D). Los ratones fueron condicionados a cocaína y después de 60 días de abstinencia recibieron una inyección de salino (veh + solución sal; controles), una dosis *priming* de cocaína (12,5 mg/kg; veh + coc prime) o una inyección del antagonista D3R SB-277011-A (24 mg/kg) antes del *priming* de cocaína (SB 24 + *priming* coc); sufrieron un encuentro social no agresivo (veh + no derrota; controles), un encuentro antagonístico (veh + SD) o una inyección del antagonista D3R SB-277011-A (12 o 24 mg/kg) antes del encuentro agonista con derrota. Se realizó una prueba de preferencia que proporcionó a los animales acceso libre a ambos compartimentos del aparato de CPP durante 15 minutos. Se observaron cambios significativos en * $p < 0.05$, + $p < 0.05$ vs veh + sal (A); ** $p < 0.01$ vs veh + sal (B); * $p < 0.05$ vs veh + ND (C); ** $p < 0.01$ vs veh + ND, + $p < 0.05$ vs veh + SD (D).

4.5. Caracterización de neuronas que expresan D3R en la BLA y DG

La BLA es necesaria para el procesamiento de la memoria asociada con las drogas y para la recaída en la búsqueda de drogas inducida por el estrés (167, 179). Está compuesta principalmente por neuronas glutamatérgicas piramidales, interneuronas GABAérgicas en menor proporción y células neurogliales (180). Asimismo, el DG, una estructura del hipocampo organizada en capas, procesa la información para producir recuerdos episódicos y es esencial para la adquisición de la CPP de cocaína (90, 181). En consecuencia, estudiamos, mediante IF, las poblaciones neuronales que expresaban D3R en BLA y DG, así como la posible colocalización de D3R con pS6, (como un marcador de la actividad de la vía mTORC1).

Nuestro estudio mostró que, en la BLA, la mayoría de las neuronas positivas para D3R eran glutamatérgicas (**Figs. 51, 52**), aunque algunas neuronas GABAérgicas también expresaban D3R (**Figs. 53, 54**). Es importante destacar que encontramos que D3R y pS6 colocalizan en neuronas glutamatérgicas y GABAérgicas en la BLA, lo que respalda que D3R podría controlar la actividad de mTORC1 durante el restablecimiento de la CPP de cocaína inducida por un estrés social.

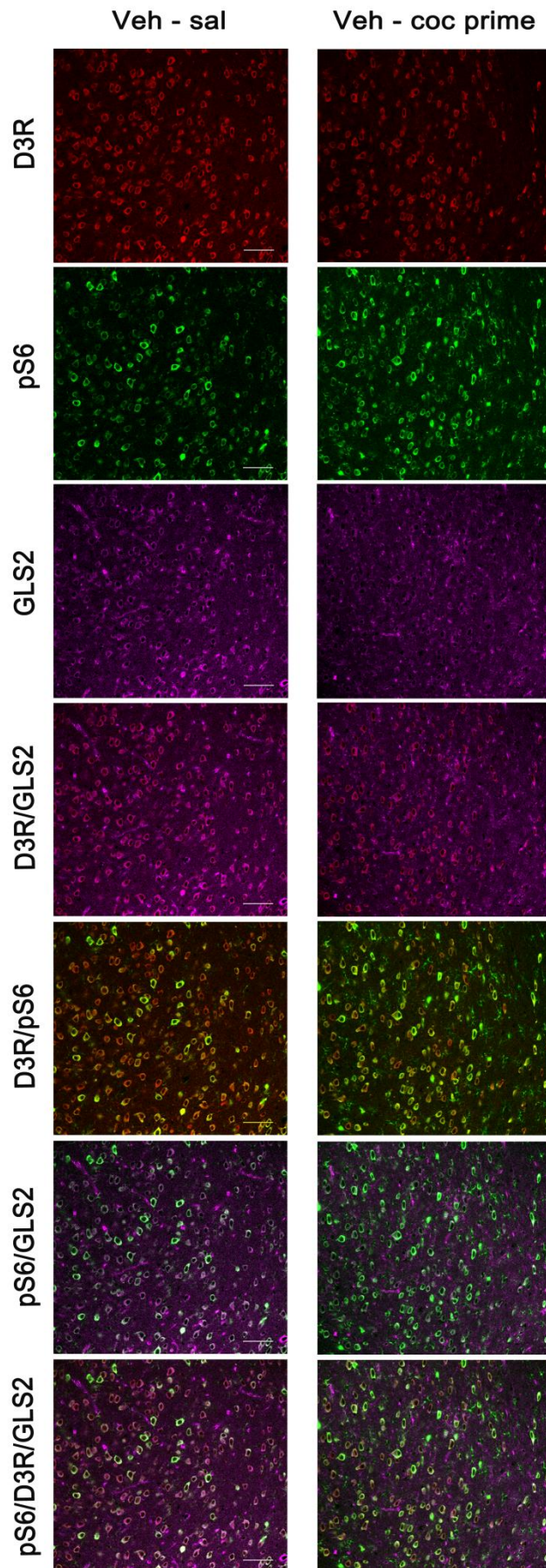


Figura 51. Imágenes representativas de secciones coronales de la BLA que expresaron D3R (rojo), pS6 fosforilada (activada; verde) y GLS2 (magenta; neuronas glutamatérgicas) en los controles (veh-sal) y tras la recaída inducida por un *priming* de cocaína (veh-coc prime). La colocalización de D3R/GLS2, D3R/pS6, pS6/GLS2 y D3R/pS6/GLS2 también se muestran en la figura. Barras de escala: 50 μ m.

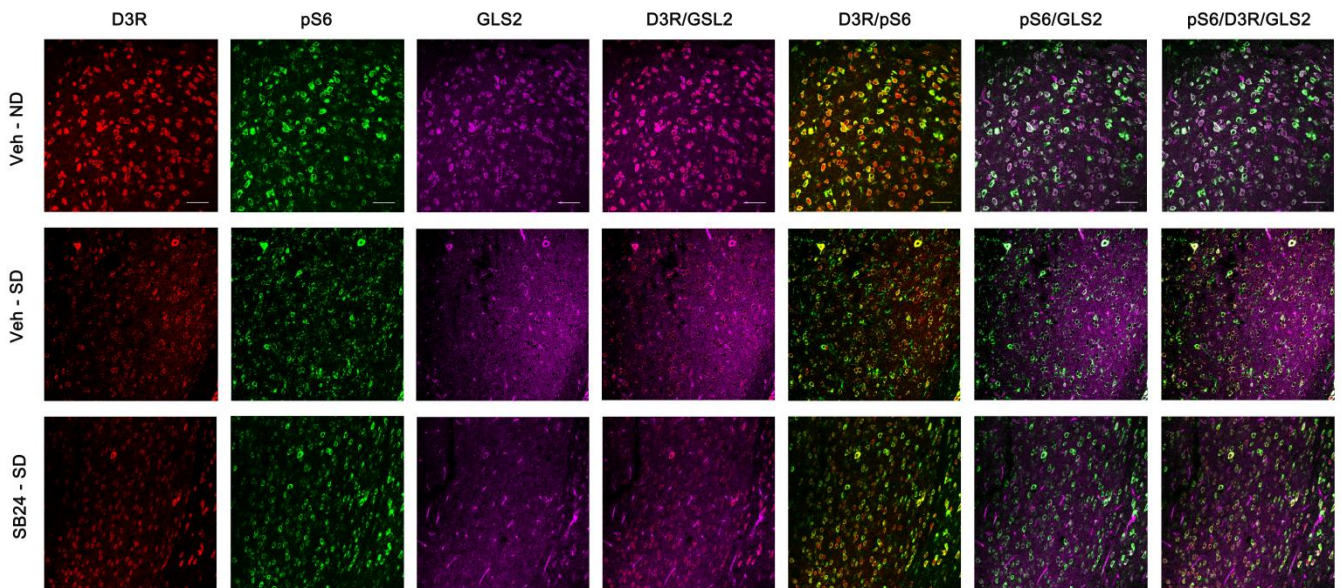


Figura 52. Imágenes representativas de secciones coronales de la BLA que expresaron D3R (rojo), pS6 fosforilada (activada; verde) y GLS2 (magenta; neuronas glutamatérgicas) en los controles (veh-ND), tras la recaída inducida por derrota social (veh-SD) y tras recibir una inyección de antagonista D3R SB-277011-A (24 mg/kg i.p. previo a la inducción de la recaída por SD). La colocalización de D3R/GLS2, D3R/pS6, pS6/GLS2 y pS6/D3R/GLS2 también se muestran en la figura. Barras de escala: 50 μ m.

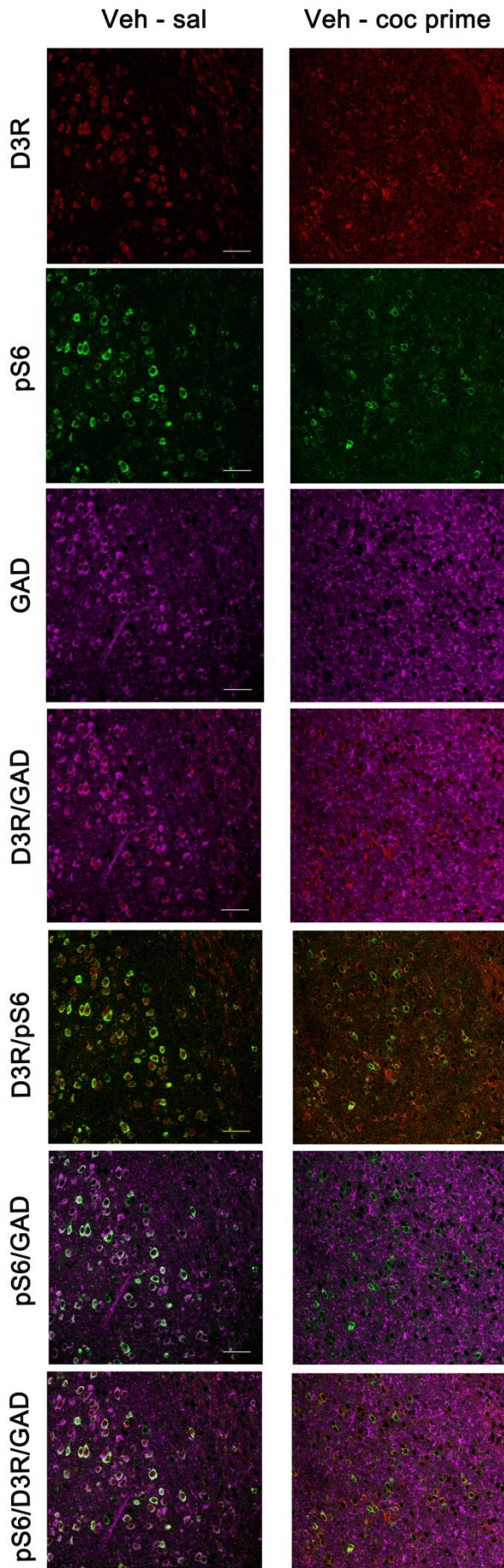


Figura 53. Imágenes representativas de secciones coronales de la BLA que expresaron D3R (rojo), pS6 fosforilada (activada; verde) y GAD (magenta; neuronas gabaérgicas) en los controles (veh-sal) y tras la recaída inducida por un *priming* de cocaína (veh-coc prime). La colocalización de D3R/GAD, D3R/pS6, pS6/GAD y D3R/pS6/GAD también se muestran en la figura. Barras de escala: 50 µm.

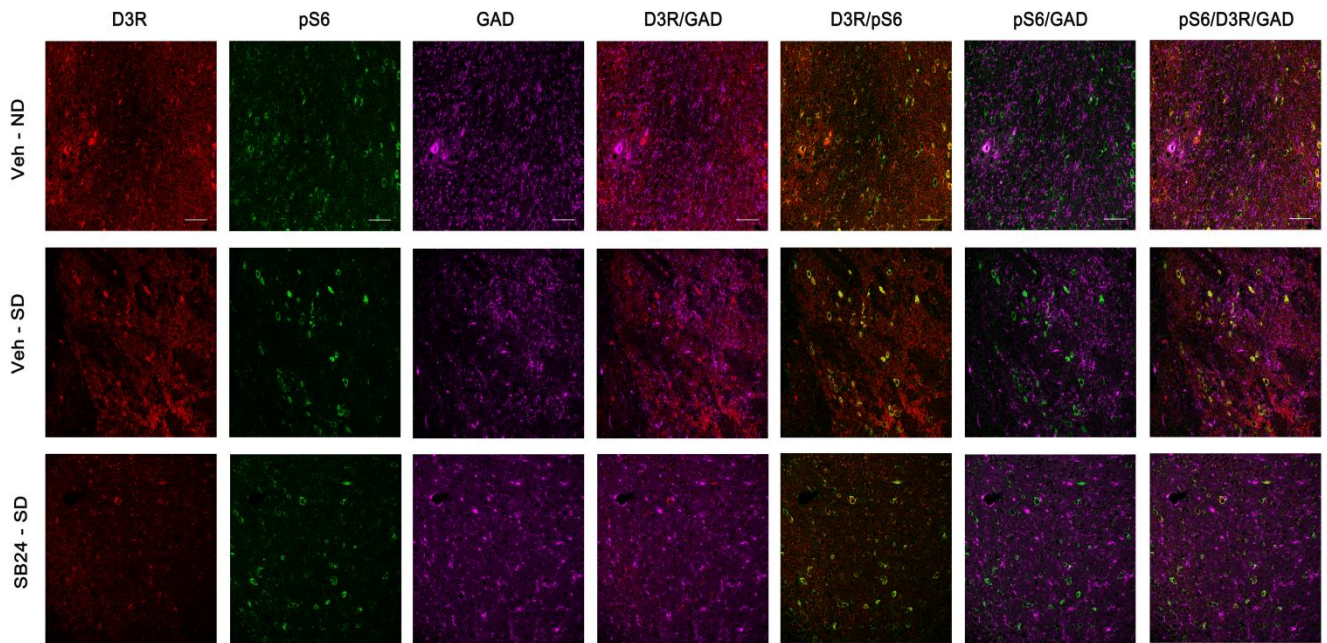


Figura 54. Imágenes representativas de secciones coronales de la BLA que expresaron D3R (rojo), pS6 fosforilada (activada; verde) y GAD (magenta; neuronas gabaérgicas) en los controles (veh-ND) y tras la recaída inducida por un episodio de derrota social (veh-SD) y tras recibir una inyección de antagonista D3R SB-277011-A (24 mg/kg i.p. previo a la inducción de la recaída por SD). La colocalización de D3R/GAD, D3R/pS6, pS6/GAD y pS6/D3R/GAD también se muestran en la figura. Barras de escala: 50 μ m.

De manera similar, las imágenes de IF del DG manifestaron que D3R se expresa en neuronas glutamatérgicas y en algunas neuronas GABAérgicas de las capas granular y polimórfica tras del restablecimiento de la CPP inducida tanto por un *priming* de cocaína (**Figs. 55, 56**) como por derrota social (**Figs. 57,58**). De manera relevante, todas las neuronas positivas para D3R coexpresaron pS6, sosteniendo así que D3R podría regular la vía mTORC1 en el DG en la recaída en la CPP de cocaína inducida por un *priming* de cocaína y por un episodio de derrota social.

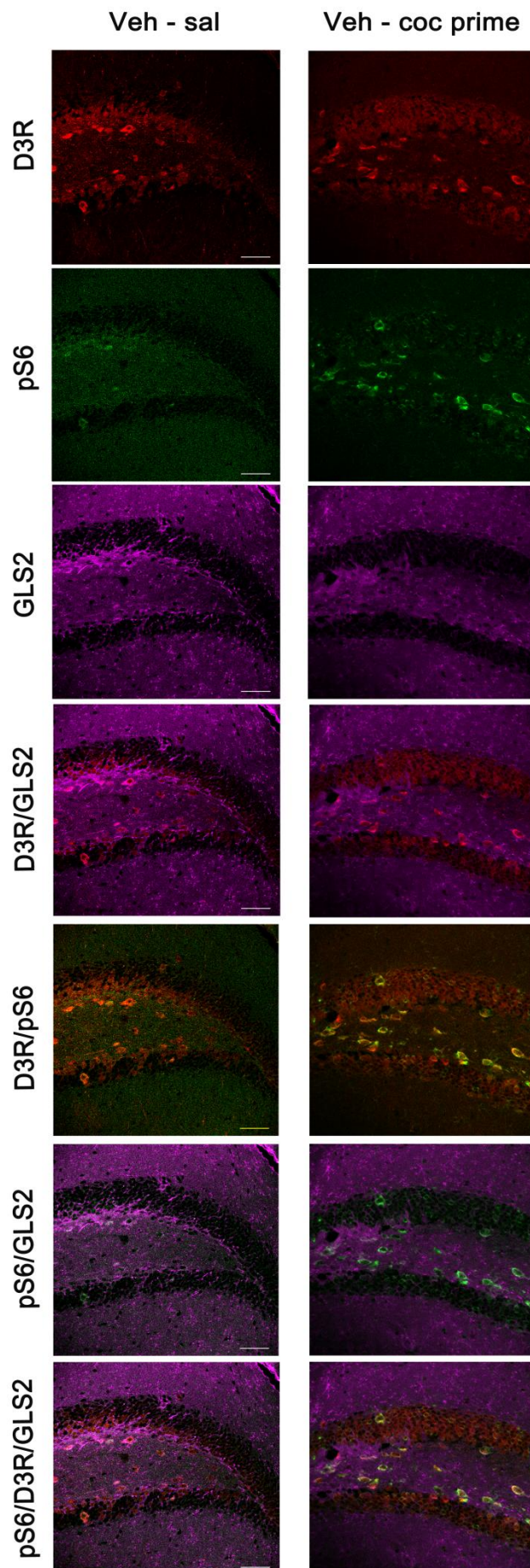


Figura 55. Imágenes representativas de secciones coronales de DG que expresaron D3R (rojo), pS6 fosforilada (activada; verde) y GLS2 (magenta; neuronas glutamatergicas) en los controles (veh-sal) y tras la recaída inducida por un *priming* de cocaína (veh-coc prime). La colocalización de D3R/GLS2, D3R/pS6, pS6/GLS2 y D3R/pS6/GLS2 también se muestran en la figura. Barras de escala: 50 μ m.

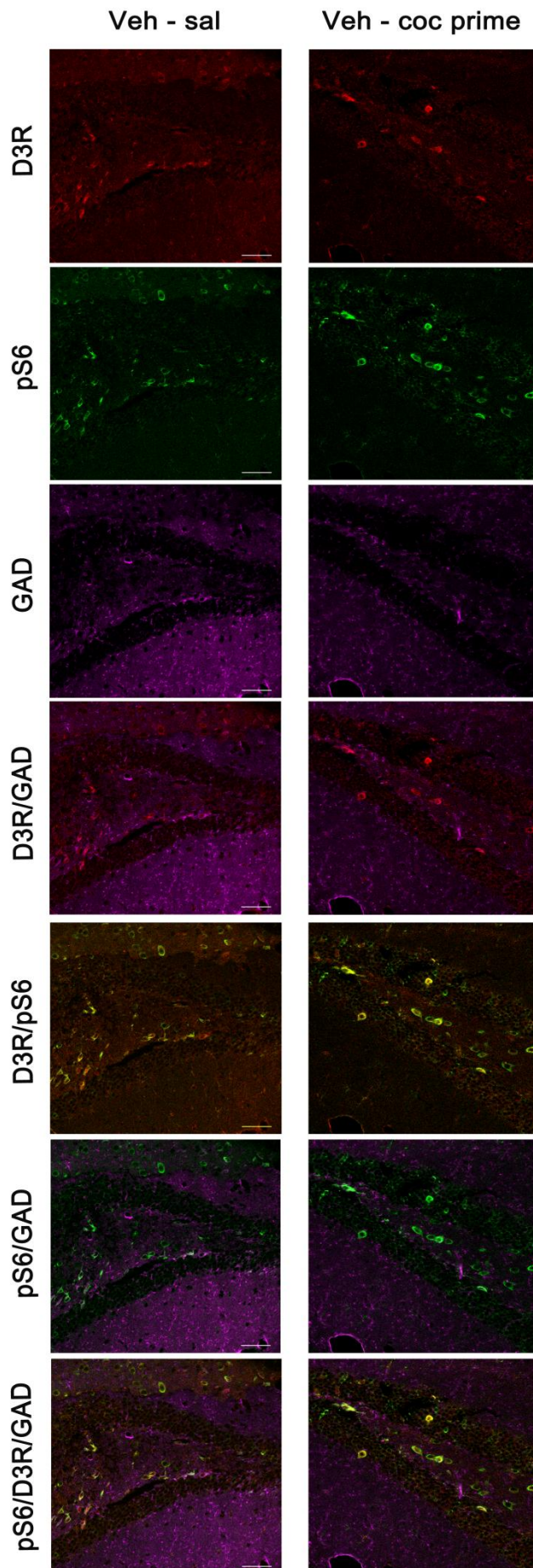


Figura 56. Imágenes representativas de secciones coronales de DG que expresaron D3R (rojo), pS6 fosforilada (activada; verde) y GAD (magenta; neuronas gabaérgicas) en los controles (veh-sal) y tras la recaída inducida por un *priming* de cocaína (veh-coc prime). La colocalización de D3R/GAD, D3R/pS6, pS6/GAD y pS6/D3R/GAD también se muestran en la figura. Barras de escala: 50 μ m.

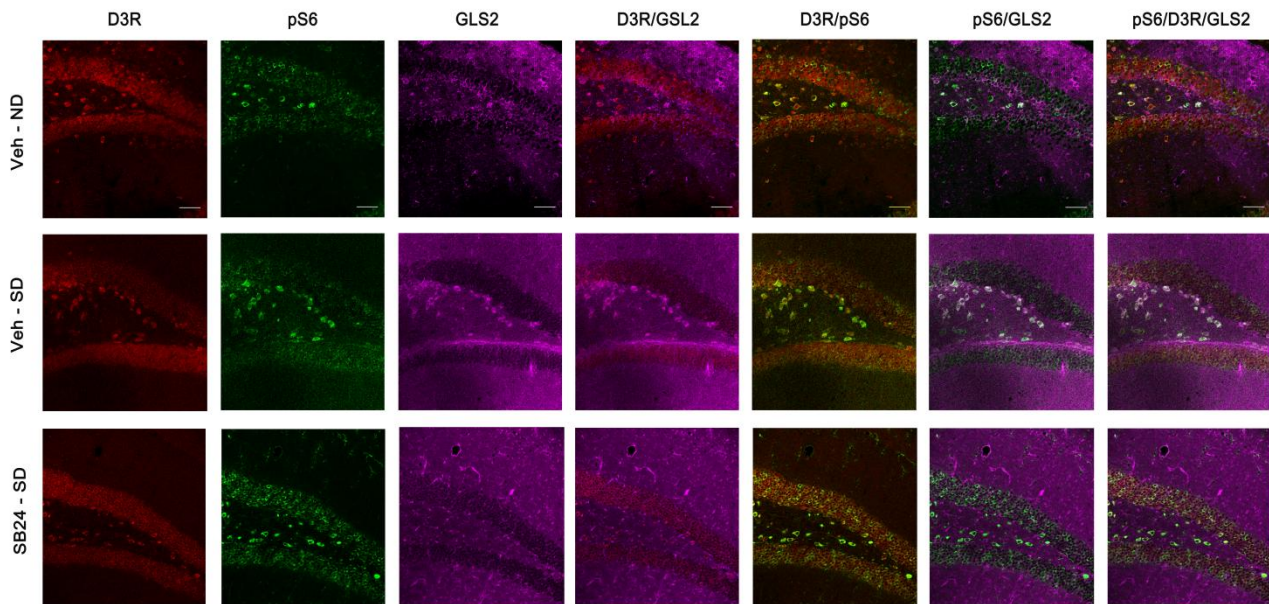


Figura 57. Imágenes representativas de secciones coronales de DG que expresaron D3R (rojo), pS6 fosforilada (activada; verde) y GLS2 (magenta; neuronas glutamatérgicas) en los controles (veh-ND), tras la recaída inducida por un episodio de derrota social (veh-SD) y tras recibir una inyección de antagonista D3R SB-277011-A (24 mg/kg i.p. previo a la inducción de la recaída por SD). La colocalización de D3R/GLS2, D3R/pS6, pS6/GLS2 y pS6/D3R/GLS2 también se muestran en la figura. Barras de escala: 50 μ m.

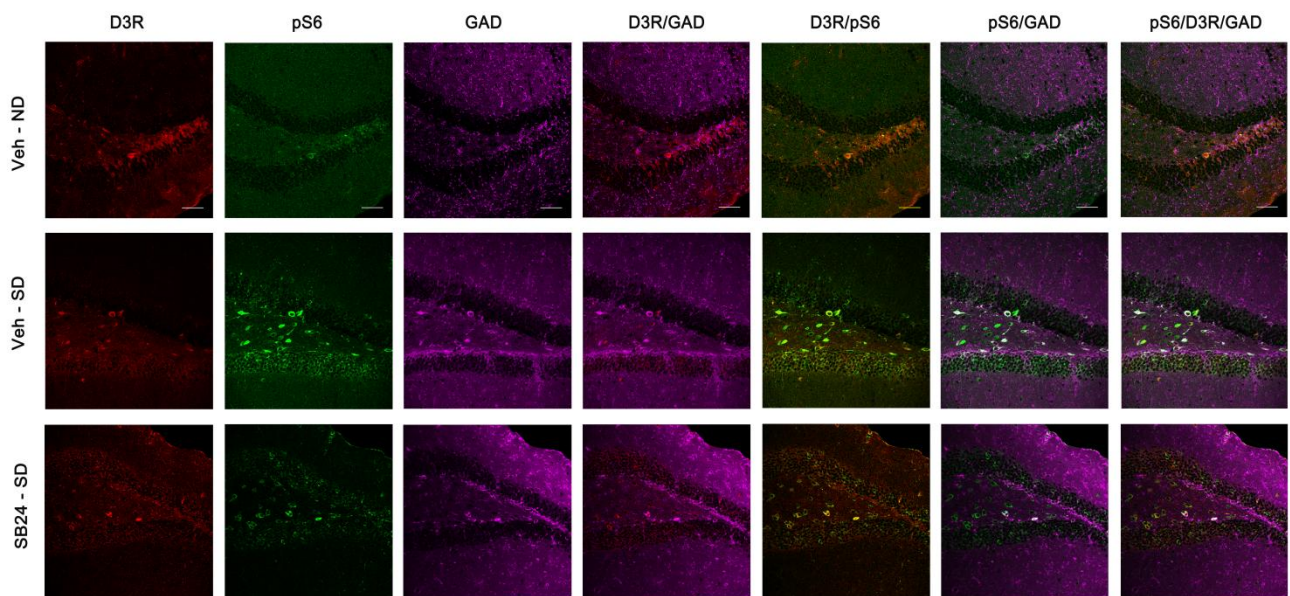


Figura 58. Imágenes representativas de secciones coronales de DG que expresaron D3R (rojo), pS6 fosforilada (activada; verde) y GAD (magenta; neuronas gabaérgicas) en los controles (veh-ND) y tras la recaída inducida por un episodio de derrota social (veh-SD) y tras recibir una inyección de antagonista D3R SB-277011-A (24 mg/kg i.p. previo a la inducción de la recaída por SD). La colocalización de D3R/GAD, D3R/pS6, pS6/GAD y pS6/D3R/GAD también se muestran en la figura. Barras de escala: 50 μ m.

DISCUSIÓN

V. DISCUSIÓN

5.1 El D3R está involucrado en la recaída en la CPP inducida por cocaína y desencadenada por estrés social y fisiológico

En este estudio hemos utilizado el paradigma de la CPP para valorar la posible implicación del D3R en las recaídas (reinstatement) en el comportamiento de búsqueda de cocaína desencadenadas por un *priming* de esta droga y por diferentes tipos de estrés (social y fisiológico). Además, se determinó la respuesta del eje HHA (como marcador de respuesta al estrés) al bloqueo de los D3R. Aquí, describimos un papel previamente poco conocido para el D3R en el restablecimiento de las memorias asociadas a la cocaína, inducidas por el estrés psicosocial. Encontramos que una inyección aguda del antagonista selectivo del D3R, SB-277011-A redujo significativamente la reactivación de la CPP inducida por cocaína en animales que sufrieron derrota social y que habían extinguido previamente la respuesta de CPP. Se obtuvieron resultados similares al aplicar diferentes episodios de estrés fisiológicos, como la inmovilización y el pinzamiento de cola. Estos resultados indican que la neurotransmisión dopaminérgica, a través de la estimulación de D3R, es crítica para la recaída en la CPP provocada por diferentes tipos de estrés en animales que habían extinguido la CPP. Por el contrario, SB-277011-A no alteró la recaída provocada por un *priming* de cocaína.

De acuerdo con estudios previos (161), encontramos que en ratones el emparejamiento con la administración de cocaína y señales visuales y táctiles específicas producía un CPP robusto. A través de sesiones repetidas de entrenamiento de extinción (exposición al contexto previamente asociado con la droga sin tratamiento con ella), la preferencia de lugar se extinguió, de acuerdo con los estudios reportados previamente (52, 64, 146). Actualmente está ampliamente aceptado que la extinción de los recuerdos de drogas es ampliamente aceptada para involucrar un nuevo aprendizaje que inhibe o sobre-escribe el aprendizaje inicial, pero que no produce un olvido del mismo.

Por ello, la extinción de estos recuerdos no ha demostrado ser eficaz para reducir la recaída/restauración tanto de humanos como de roedores (57, 182). De hecho, descubrimos que la exposición de los ratones al estrés social/emocional, como la derrota en una interacción social, fue muy efectiva para restablecer la CPP, mientras que un encuentro agonístico sin derrota con un ratón no agresivo (control) no indujo el restablecimiento de la CPP.

Es importante destacar que el presente estudio puso de manifiesto que una administración aguda de 24 mg/kg del antagonista selectivo D3R, SB-277011-A evitó por completo la reactivación de la CPP inducida por cocaína y desencadenada por la derrota social después de haber extinguido el comportamiento adictivo. Hasta donde sabemos, estos resultados proporcionan la primera ilustración (si examinamos el potencial terapéutico de los antagonistas de D3R como prevención de la recaída a cocaína inducida por el estrés social) de que la estimulación de D3R podría desempeñar un papel esencial en la reactivación, previamente extinguida, de la CPP inducida por cocaína y provocada por el estrés social. Se ha demostrado que los encuentros de derrota social aumentan la liberación de DA en la vía mesolímbica (183, 184). Nuestros resultados son consistentes con estos estudios que muestran que el estrés aumenta la actividad de las neuronas dopaminérgicas mesolímbicas. Por lo tanto, al antagonizar la señalización de DA en los D3R postsinápticos, SB-277011-A inhibiría los efectos de liberación de este neurotransmisor.

Uno de los efectos más estudiados sobre los antagonistas de D3R es su capacidad para bloquear la búsqueda de drogas desencadenada por estímulos ambientales asociados a drogas, en diferentes modelos animales con recaída en la conducta de búsqueda de drogas (185-188). El D3R se expresa altamente en las neuronas cerebrales inervadas por la vía de recompensa dopaminérgica mesolímbica, como NAc, y se postula que participa de manera crítica en recompensas, emociones, motivación y enfermedades como la esquizofrenia y la adicción (189, 190).

Se ha postulado que el estrés puede inducir el restablecimiento de la cocaína al reactivar el valor motivacional de las señales condicionadas por las drogas (191). De acuerdo con ello, se ha demostrado que los antagonistas selectivos de D3R disminuyen la motivación para las drogas de abuso y el comportamiento de búsqueda de la misma (135, 192, 193). Aunque no se conoce bien el proceso por el que el D3R interviene en el efecto condicionado a cocaína inducida por el estrés social, el estudio actual podría sugerir que la activación del D3R estaría involucrado en las asociaciones entre señales y los efectos subjetivos de la droga y/o en la motivación para obtener las señales condicionales, ya que el antagonista selectivo de D3R SB-277011-A atenuó ese efecto.

En nuestro estudio, el número de entradas totales a ambos compartimentos y las entradas a la sala emparejada con cocaína, sufrieron un aumento durante la reactivación de la CPP inducida por la derrota social, lo que indica que el estrés social indujo actividad locomotora durante la reactivación de la CPP, lo cual se asemeja a la respuesta a la cocaína, la cual induce actividad locomotora (194). Esto podría indicar que dicha hiperactividad estaría desencadenada por los estímulos contextuales asociados con cocaína y otras sustancias de abuso, y se ha propuesto que estaría asociada con las propiedades motivadoras de incentivos (195), aunque los aspectos motivacionales no se pudieron evaluar en el procedimiento utilizado en el presente trabajo, ya que los animales no realizaron ninguna tarea operante. Nuestros hallazgos también mostraron que los animales derrotados tratados con SB-277011-A mostraron una disminución tanto de las entradas totales como de las entradas al compartimento emparejado con cocaína, y no se observaron diferencias entre el número de entradas a la cámara emparejada con cocaína y a la cámara emparejada con solución salina, lo que refuerza la idea de que el antagonista D3R produce una ocupación selectiva de dichos receptores.

La inhibición por el bloqueo del D3R en la CPP inducida por cocaína también podría implicar una interrupción de la memoria. Sin embargo, esto es poco probable, ya que se ha observado que SB-277011-A no altera el

aprendizaje o la memoria en los roedores, sino que mejora la memoria social (122, 196). En estudios realizados en humanos, se ha comprobado que los antagonistas selectivos del D3R mejoran los aspectos cognitivos en pacientes esquizofrénicos, incluyendo memoria, reconocimiento social, atención y función ejecutiva (197). Conjuntamente, los datos del presente estudio y estos resultados previos podrían explicar en parte cómo el antagonismo del D3R atenúa el restablecimiento de la CPP inducida por cocaína y desencadenada por el estrés social.

En este estudio, también hemos utilizado el estrés social frente a dos tipos de estrés fisiológicos (restricción física de movimiento y dolor por pinzamiento de la cola) para comparar los efectos del antagonismo del D3R en dichos tipos de estrés. De acuerdo con otros estudios que utilizan estrés fisiológico, como descargas de impulsos eléctricos en las patas de ratas (140), nuestros resultados mostraron que SB-277011-A también disminuyó el restablecimiento de la CPP provocado por la inmovilización y por el pinzamiento de la cola, aunque fue necesaria una dosis más alta (48 mg/kg) que la utilizada para inhibir las recaídas al estrés social, por lo que nos planteamos si este efecto inhibitorio podría ser atribuible al bloqueo del D2R en lugar del antagonismo selectivo del D3R. Sin embargo, otros estudios han comprobado que SB-277011-A (hasta 90 mg/kg) y otros antagonistas selectivos del D3R no tienen ningún efecto sobre la locomoción espontánea o inducida por estimulantes y no producen catalepsia cuando se administran en dosis superiores a dos veces a la dosis más alta utilizada en el presente experimento, en contraste con los antagonistas D2R (188). De hecho, SB-277011-A tiene una selectividad de 80 a 100 veces mayor sobre el D3R que sobre otros receptores dopaminérgicos y una alta afinidad por el D3R humano (pK_i , 7.95) y rata (pK_i , 7.97) (198). Además, el SB-277011-A invierte los niveles de DA extracelular en el NAc (rico en D3R) producido por el agonista de D3R quinerolano, mientras que dicho efecto del agonista sobre la DA extracelular en el estriado dorsal (pobre en D3R; rico en D2R) no se revierte con dosis más altas de SB-277011-A, ni por la dosis más alta utilizada en el presente estudio (199).

Nuestro estudio también muestra que, en contraste con lo observado durante la reactivación de la CPP inducida por el estrés social, los ratones expuestos a estrés fisiológico no mostraron hiperlocomoción, como se pudo comprobar al cuantificar el número de entradas a ambas cámaras. Esto implicaría que pasaron más tiempo en la cámara emparejada con cocaína sin aumentar el número de cruces entre cámaras y podría indicar que los estímulos contextuales relacionados con el uso de una droga adquieren un valor emocional más fuerte tras de la reactivación de la CPP por inmovilización o por dolor que por estrés social. También es posible que estas diferencias probablemente reflejen que la respuesta al estrés dependería de la naturaleza del contexto, como se ha sugerido previamente (147). También podría plantearse la hipótesis de que el estrés fisiológico aumentó la memoria gratificante de la cocaína, lo que motivó a los animales a permanecer en esta cámara por períodos más largos, de acuerdo con estudios previos (200). Sin embargo, no se puede descartar una posible disminución inespecífica de la actividad locomotora inducida por SB-277011-A a las dosis más altas utilizadas en el presente trabajo, por lo que se necesitan más estudios para abordar este problema. En conjunto, podríamos concluir que el efecto atenuador de SB-277011-A sobre la recaída en la CPP inducida por estrés fisiológico no puede interpretarse fácilmente sobre la base de nuestros resultados. Por otra parte, la diferencia en la potencia aparente de SB-277011A en la reducción de las recaídas inducidas por episodios de estrés sociales frente a episodios de estrés fisiológicos, podría estar relacionada con los diferentes mecanismos anatómicos por los cuales estos tipos de estrés influyen en el sistema dopaminérgico mesolímbico.

5.2. SB-277011-A no impidió las recaídas en la CPP inducida por cocaína y provocada por un priming de cocaína

La adicción a cocaína se caracteriza por una susceptibilidad persistente a las recaídas, por lo que la reexposición a la misma ha sido identificada como uno de los determinantes más importantes de recaída en humanos y en

modelos con animales de experimentación. Como se indicó anteriormente, el sistema dopaminérgico mesolímbico está críticamente involucrado en el comportamiento de búsqueda de drogas inducido por cocaína o por señales externas asociadas a su consumo (165, 201). Además, la creciente evidencia sugiere que los D3R cerebrales (particularmente en el NAc) están regulados al alza (up-regulation) tras una ausencia prolongada de la autoadministración crónica de cocaína, tanto en animales experimentales como en humanos (202, 203). En consecuencia, el bloqueo de D3R podría antagonizar el comportamiento de búsqueda de cocaína inducida por cocaína o por señales. Este postulado es consistente con el estudio de Xi et al. (204) que pone de manifiesto que microinyecciones de SB-277011-A en el NAc o en la amígdala inhiben la búsqueda de cocaína inducida por señales.

Aquí mostramos que una inyección de *priming* de cocaína reactivó la respuesta de CPP extinguida, de acuerdo con estudios anteriores (185). Nuestro estudio también mostró que la administración de 24 o 48 mg/kg de SB-277011-A no atenuó la reactivación de la respuesta de CPP inducida por cocaína después de la extinción de la CPP. Se ha informado que el antagonista de D3R NGB 2904 inhibió significativamente el restablecimiento provocado por 2 mg/kg, pero no 10 mg/kg de cocaína (205). De manera similar, SB-277011-A inhibe el refuerzo inducido por cocaína, excepto a altas dosis de cocaína (193). Es bien sabido que la cocaína, al bloquear DAT induce un aumento de DA extracelular en el NAc (206). Por lo tanto, es posible que la dosis de cocaína utilizada en el presente estudio produzca un aumento importante en los niveles de DA y que las acciones de antagonismo de SB-277011-A dependan de los niveles endógenos de DA, lo que a su vez puede explicar por qué las mismas dosis de SB-277011-A que producen la inhibición de la derrota social y los distintos tipos de estrés fisiológicos provocados por el restablecimiento de la conducta de búsqueda de drogas no tuvieron ningún efecto en el grupo experimental que recibió un *priming* de cocaína (12.5 mg/kg).

En general, estos datos sugieren que una diferencia fundamental en la eficacia terapéutica potencial de los agentes antagonistas de D3R depende de la cantidad de cocaína presente a nivel sistémico. Dado que los hallazgos

anteriores han demostrado que SB-277011-A atenúa las propiedades gratificantes de la cocaína según lo medido por la CPP (188), otra posible explicación es que la CPP inducida por cocaína es más vulnerable al antagonismo de D3R que el restablecimiento inducido por la misma. El hecho de que el antagonismo D3R no bloqueó el restablecimiento de CPP provocado por la droga, sino que evitó su restablecimiento cuando fue provocado por factores estresantes sociales y fisiológicos, respalda la existencia de diferencias neurobiológicas ya conocidas entre la recaída inducida por la droga y el estrés (207).

5.3. Diferente papel de los glucocorticoides en la atenuación del restablecimiento inducido por estrés y priming de cocaína previo bloqueo de D3R

El eje HHA a través de la liberación de glucocorticoides y, posteriormente, la concentración de glucocorticoides cerebrales, desempeña un papel clave en la mediación de los efectos de refuerzo de las drogas de abuso y recaída inducida por el estrés (208, 209). Se hipotetiza que estos efectos de los glucocorticoides son atribuibles a la activación de las neuronas dopaminérgicas en el VTA y al aumento de la liberación de DA en el NAc (210) (210) y respaldan que los glucocorticoides pueden estar involucrados en la vulnerabilidad a la recaída después de la abstinencia, particularmente durante situaciones estresantes (211).

Abordamos aquí la posible participación de los glucocorticoides en la inhibición del restablecimiento del comportamiento de búsqueda de cocaína inducido por el estrés social que se observó en animales pretratados con el antagonista D3R, SB-277011-A. Nuestros resultados mostraron que hubo un aumento en la liberación de corticosterona durante la reincorporación inducida por la derrota social, la inmovilización, el pinzamiento de la cola y el *priming* de cocaína. Además, encontramos que niveles más altos de glucocorticoides se correlacionaron con *scores* más altos durante el restablecimiento inducido por el estrés psicosocial y fisiológico, pero no en el restablecimiento de la CPP

inducido por un *priming* de cocaína. Además, la respuesta a la corticosterona en animales derrotados, así como en ratones que sufrieron un estrés fisiológico, se correlacionó significativamente con las entradas de cocaína. Por lo tanto, la liberación de glucocorticoides relacionada con el eje HHA podría mediar al menos parcialmente el comportamiento de búsqueda de cocaína inducido por el estrés, como se ha propuesto (209).

Por el contrario, los resultados de nuestro estudio señalan que los glucocorticoides no son críticos para el restablecimiento de la CPP inducido por un *priming* de cocaína, dado que no encontramos una correlación significativa entre las concentraciones de corticosterona en plasma y el *score* de la CPP en la recaída. Se sabe que, si bien la adrenalectomía no bloqueó el restablecimiento de la autoadministración de cocaína inducida por un *priming* de cocaína en ratas, este restablecimiento fue atenuado por la administración i.c.v. de un antagonista selectivo del receptor CRF1(212), lo que sugiere que el CRF pero no los glucocorticoides estarían involucrados en el restablecimiento inducido por la cocaína. Además, también se ha demostrado que los inhibidores de la síntesis de corticosterona tampoco lograron bloquear el restablecimiento de la búsqueda de drogas en ratas desencadenado por un *priming* de cocaína (213). En conjunto, estos datos apoyan un papel disociable para los glucocorticoides en el restablecimiento de la CPP y sugieren que los aspectos subjetivos y de comportamiento del restablecimiento de la CPP inducida por cocaína posiblemente no estén asociados con los glucocorticoides.

En animales socialmente derrotados pretratados con SB-277011-A hubo un paralelismo entre los niveles de corticosterona y el comportamiento. Por lo tanto, la dosis más baja de SB-277011-A no evitó el restablecimiento o la liberación de corticosterona, mientras que los ratones que recibieron SB-277011-A a la dosis de 24 mg/kg, que inhibió el restablecimiento inducido por la derrota social, mostraron niveles de corticosterona igual que en condiciones basales. Estos datos sugerirían que la activación de D3R podría mediar al menos parcialmente el restablecimiento social inducido por la derrota a través de la liberación de corticosterona relacionada con el eje HHA. Tales hallazgos

son consistentes con los informes de que la derrota social desencadenó la liberación de DA en la NAc, mientras que este efecto disminuyó en ratones privados del receptor de glucocorticoides (214).

Por lo tanto, al antagonizar el receptor D3R, SB-277011-A puede inhibir los efectos de la liberación de glucocorticoides inducida por el estrés. Juntos, estos hallazgos sugieren que el D3R puede ser un punto de intersección crucial entre el estrés social y el restablecimiento de drogas. Los niveles de corticosterona en plasma no diferían entre animales sometidos a encuentros sociales agudos con ratones desconocidos (ratones sociables, controles), que no mostraron reincorporación, y entre ratones derrotados. Estos hallazgos sugieren que el restablecimiento inducido por la derrota social no solo dependía de la respuesta del eje HHA y podría llevar a la idea de que los individuos sociables y derrotados procesan información motivadoramente relevante de diferentes maneras y por diferentes sistemas neuronales y, por lo tanto, pueden ser o no sensibles a diferentes desencadenantes de reincorporación/recaída.

Por otro lado, los resultados actuales mostraron que en animales pretratados con SB-277011-A a dosis de 24 y 48 mg/kg antes de sufrir estrés fisiológico hubo una disminución dependiente de la dosis de los niveles plasmáticos de corticosterona. Sin embargo, solo la dosis más alta de SB-277011-A previno el restablecimiento. Esto podría significar que las neuronas dopaminoceptivas en el sistema mesolímbico responderían de manera más sensible a la corticosterona liberada por el estrés fisiológico, lo que resultaría en una fuerte activación de las neuronas dopaminérgicas y, en consecuencia, en una liberación amplificada de DA en el NAc, y podría explicar que es necesaria una dosis alta de SB-277011-A para antagonizar el restablecimiento inducido por el estrés. Nuestro estudio también mostró que el pretratamiento con SB-277011-A revirtió los niveles plasmáticos mejorados de corticosterona inducidos por un *priming* de cocaína, pero no bloqueó el restablecimiento de la CPP. Estos datos parecen validar la hipótesis de un papel disociable para los glucocorticoides en el restablecimiento de la conducta de búsqueda de cocaína, que dependería del tipo de estímulo que desencadena el restablecimiento.

En resumen, la recaída de cocaína es un fenómeno complejo, que involucra una variedad de circuitos cerebrales y receptores que varían debido a los detalles experimentales de los estudios en animales. Nuestro estudio podría indicar que D3R modula la reactivación del valor del incentivo y/o la memoria gratificante de las señales asociadas a la cocaína inducidas por el estrés social y fisiológico, que parece estar asociado a un mecanismo dependiente de glucocorticoides. Aquí proporcionamos una descripción general de los estudios que señalan D3R como un objetivo para la terapia farmacológica para tratar la adicción a las drogas.

5.4. Cambios en la expresión de la proteína DAT y D3R en el NAc tras el restablecimiento de la CPP inducida por cocaína y desencadenada por un priming de cocaína y por estrés social

El sistema dopaminérgico mesolímbico y, en particular, la DA en el NAc es en gran parte responsable de la recompensa y el aprendizaje basado en recompensas (215), que refuerzan los comportamientos esenciales para la supervivencia. Las drogas de abuso modifican este sistema para mantener la búsqueda y el consumo compulsivos de drogas. La neurotransmisión de DA está regulada por DAT en terminales presinápticas de neuronas dopaminérgicas, específicamente en las regiones como el NAc, que está involucrado en la ejecución de comportamientos motivados basados en la experiencia previa (216). Además de DAT, la liberación y la síntesis de DA están moduladas por los autorreceptores inhibitorios D2R y D3R ubicados en las terminales nerviosas de DA, regulando así los niveles sinápticos de DA (189). Otros estudios también proponen que el autorreceptor D3 también regula la neurotransmisión dopaminérgica a través de su interacción con DAT (217). Informes recientes han sugerido un impacto duradero de la cocaína en la función del sistema dopaminérgico que proporcionó un supuesto mecanismo de recaída, que puede ocurrir en adictos a la cocaína después de años de abstinencia (218). Sin embargo, la regulación de la señalización acoplada a la

acción de DA por estímulos aversivos o un *priming* de cocaína que causa el restablecimiento de CPP aún no está bien caracterizado. Abordamos aquí los efectos del antagonismo de D3R sobre los cambios en los niveles de DAT y D3R tras el restablecimiento de la CPP inducido por la cocaína y desencadenado por un *priming* de cocaína y por estrés social. Los factores estresantes afectan negativamente el estado emocional e impulsan la búsqueda de drogas y promueven la recaída en los adictos al inducir el deseo (219, 220). Descubrimos que durante el restablecimiento de la CPP producida tanto por el estrés social como por el consumo de cocaína, hubo una elevación de los niveles de DAT y D3R en la shell de NAc de ratones. Otros estudios también han evidenciado que el *craving*, o deseo irrefrenable de consumo, desencadenada por señales asociadas al consumo de cocaína coincidió con un aumento de la expresión de D3R en el NAc después de una retirada prolongada de la droga, lo que sugiere un posible papel para una mayor señalización de D3R en la ansiedad desarrollada por la cocaína (202), que está de acuerdo con los datos actuales. Está bien establecido que la cocaína inhibe al DAT, que es una proteína de la membrana plasmática encargada de la recaptación de la DA liberada en la terminal nerviosa presináptica, lo que induce un aumento de los niveles extracelulares de DA y la señalización posterior relacionada durante el abuso de drogas (221). Por otra parte, y además de su papel como receptor postsináptico clásico, el D3R se expresa en terminales dopaminérgicos, sirviendo como autorreceptor presináptico que disminuye la síntesis y liberación de DA. En conjunto, nuestros hallazgos indicarían que el aumento en la expresión de DAT en NAc en ratones después de un *priming* de cocaína y un episodio de estrés social podría ser un mecanismo compensador neuronal para disminuir los niveles sinápticos de DA y su acción a nivel postsináptico. Además, la regulación al alza de D3R serviría como mecanismo de retroalimentación paralelo destinado a reducir los elevados niveles de DA extracelular. De acuerdo con estos hallazgos, el uso crónico de cocaína tiene un impacto a largo plazo en la regulación de DAT y por mecanismos que no están bien definidos (222), lo que indica que los psicoestimulantes inducen cambios fisiológicos que podrían conducir a la adaptación al transportador y de los receptores presinápticos D2 y D3 durante la adicción a los psicoestimulantes (223). Sin embargo, el efecto agudo de la

cocaína en la expresión de DAT es menos consistente, ya que algunos hallazgos han demostrado que la cocaína produce un rápido aumento en los niveles de DAT, mientras que otros no han encontrado efectos en la expresión de DAT (224, 225).

La evidencia acumulada sugiere una eficacia limitada del procedimiento de extinción de recuperación de memoria de estímulo condicionado, en la modificación de memorias patológicas (174). Recientemente, el D3R ha llamado la atención con respecto al sistema VTA-NAc, la recompensa inducida por drogas, la motivación y la recaída y la manifestación conductual de muchas drogas de abuso. Esto ha llevado a sugerir que el D3R puede ser un objetivo terapéutico útil para los medicamentos contra la adicción (135). Nuestros resultados mostraron que el pretratamiento con el antagonista selectivo D3R, SB-277011A antagonizó de manera dependiente de la dosis, el aumento en la expresión de DAT y D3R en el shell de NAc inducida por el estrés social, paralelamente a la atenuación de la recaída inducido por dicho estrés que se observó en los animales que recibieron el bloqueante de D3R. En general, estos datos sugieren que la eficacia terapéutica potencial de los fármacos antagonistas de D3R para atenuar la recaída inducida por el estrés implicaría una regulación a la baja de DAT y D3R en el NAc.

En el NAc, D3R funciona como un autorreceptor presináptico en los terminales dopaminérgicos que provienen del VTA y como receptor postsináptico en las MSN, por lo tanto, están posicionados para modular la liberación de DA presináptica y los cambios mediados por el receptor postsináptico en la actividad neuronal, respectivamente (139). Aunque de nuestros resultados no podemos distinguir si la disminución de D3R inducida por el antagonista de D3R afecta a D3R pre y/o postsináptico, la regulación negativa inducida por antagonista de D3R de la disponibilidad de DAT y D3R conduciría a un aumento en los niveles de DA extracelular en el NAc, concomitantemente con la capacidad del antagonista para reducir el restablecimiento de la CPP inducida por el estrés social. Esto es algo sorprendente, ya que en el NAc la DA es esencial para el aprendizaje relacionado con la recompensa y para la búsqueda de drogas. Recientemente,

se ha demostrado que la búsqueda de drogas inducida por el estrés puede ocurrir en un entorno de bajo nivel de DA (226). Además, la evidencia de los estudios en animales y humanos sugiere que puede ocurrir una hipoactividad de la función de recompensa después de una abstinencia prolongada de las drogas de abuso (227), y se ha especulado que el bloqueo del D3R puede aumentar la DA extra neuronal, que se sabe que es baja en individuos adictos (228, 229). De hecho, ensayos clínicos previos han investigado el efecto de medicamentos que aumentan la transmisión de DA estriatal como tratamiento de la dependencia de la cocaína, aunque se han obtenido resultados inconsistentes (222). Tomados en conjunto, estos hallazgos y los resultados actuales pueden sugerir que la disminución de DAT y D3R que se observó en animales pretratados con el antagonista de D3R aumentaría los niveles sinápticos de DA en el NAc y atenuaría el restablecimiento inducido por la derrota social. Por lo tanto, la capacidad selectiva del antagonista de D3R para inhibir la regulación positiva de DAT y D3R podría representar un posible mecanismo para sus efectos conductuales en el restablecimiento de la CPP inducido por la derrota social.

Anteriormente hemos observado que el subtipo D3R es crítico para el restablecimiento de la CPP inducida por el estrés, pero no para la CPP inducida por *priming* de cocaína (154), lo cual se ha corroborado en el presente estudio. Los hallazgos actuales mostraron que, aunque el antagonista de D3R inhibió el aumento de los niveles de DAT y D3R que fueron inducidos por un *priming* de cocaína, tras un período de abstinencia de 60 días (aproximadamente equivalente a 4 años en humanos) la CPP se restableció con una sola inyección de cocaína (230). Tomados en conjunto, estos resultados podrían sugerir que D3R no contribuiría al desarrollo del comportamiento de recaída inducido por un *priming* de cocaína.

En resumen, los resultados presentados aquí indicaron que DAT y D3R en el NAc están comprometidos en la reactivación de los recuerdos de recompensa de cocaína. El bloqueo de D3R evitó el aumento en los niveles de DAT y D3R producidos por el estrés social, que fue acompañado por una atenuación de la recaída inducida por derrota social. En conjunto, estos datos

sugieren que la eficacia terapéutica potencial de los agentes antagonistas de D3R para atenuar la recaída en la memoria asociada a cocaína inducida por el estrés social podría implicar regulación a la baja de DAT y D3R en el NAc.

5.5. Cambios en la fosforilación de Akt y mTOR en el NAc tras el restablecimiento de la CPP desencadenada por un priming de cocaína y por estrés social

Los mecanismos subyacentes a la señalización neuronal del D3R están pobremente caracterizados. Se ha propuesto Akt como una cascada de señalización en el estriado en la transmisión dopaminérgica y relacionada con el comportamiento (164). Como se mencionó anteriormente, está bien caracterizado que D3R activa las proteínas $G_{i/o}$ para inhibir la producción de AMPc, pero D3R también regula otras vías intracelulares, incluidas las cascadas ERK y Akt (128). Dado que la vía de señalización de Akt se ha implicado recientemente en los efectos conductuales y celulares inducidos por psicoestimulantes, en el presente estudio cuantificamos la expresión de Akt fosforilado (pAkt) y pmTOR en el shell de NAc tras el restablecimiento de la CPP inducida por estrés social y por un *priming* de cocaína. Los resultados mostraron que pAkt se expresó en las MSN, de acuerdo con estudios previos (231). Se observaron tendencias hacia un aumento en pAkt y pmTOR en el shell de NAc, aunque no alcanzaron significación estadística cuando la memoria asociada a cocaína fue reactivada por un *priming* de cocaína. Estos efectos tendieron a disminuir cuando los animales se pretrataron con el antagonista selectivo D3R. Del mismo modo, no se observaron modificaciones significativas en pAkt y pmTOR después de la recaída inducida por la derrota social o en animales pretratados con el antagonista D3R antes del estrés social. Por lo tanto, sería tentador especular que la señalización de Akt-mTOR en el NAc no está regulada por la reactivación de la memoria asociada a la cocaína. Se necesitan más experimentos para determinar la cascada de señalización que está relacionada con el restablecimiento de la CPP inducida por el estrés social y la cocaína (55).

5.6. Modificaciones en la expresión de D3R, DAT y mTOR en BLA y DG tras el restablecimiento de la CPP inducida por cocaína y desencadenada por un priming de cocaína y por estrés social

Aunque el antagonismo de D3R afectó de manera diferente la recaída en la CPP, en la BLA procedente de los ratones que recibieron una inyección con SB-277011-A antes de recibir un *priming* de cocaína o estar expuestos al estrés social, en ambas condiciones se produjo una disminución significativa tanto de D3R como de DAT, lo que indicaría la participación de diferentes mecanismos neurobiológicos en estos procesos. Paralelamente, la fosforilación de mTOR en la BLA disminuyó en los ratones en los que se produjo la recaída en la CPP después de un episodio de derrota social, y esa disminución no se observó cuando previamente se administró SB-27701-A. En el DG no encontramos cambios en los niveles de D3R ni de DAT tras un *priming* de cocaína o una derrota social, lo que indica que, en contraste con BLA, la señalización directa de D3R en esta región del hipocampo no es crítica en la recaída en el comportamiento de búsqueda de cocaína inducido por el estrés social o por un *priming* cocaína. Sin embargo, en esta región observamos una reducción de la fosforilación de mTOR después de la recaída inducida por la derrota social y una tendencia a la misma tras el *priming* cocaína. La administración de SB-277011-A bloqueó la reducción de pmTOR después de la recaída provocada por el estrés social, pero no por un *priming* de cocaína.

La BLA participa en la formación de las asociaciones entre las drogas y sus estímulos condicionados, así como en las respuestas conductuales a estas señales previamente condicionadas (67). Este área también es esencial en las recaídas (147, 232). Por ejemplo, la activación de D3R en la BLA parece ser necesaria para el restablecimiento de la búsqueda de nicotina inducida por señales (233). En consecuencia, uno de nuestros objetivos fue evaluar si la expresión de D3R se alteró en la BLA durante la restauración de la CPP inducida por el estrés social o un *priming* de cocaína y conocer los efectos del bloqueo de dicho receptor. Aunque de manera no significativa, observamos que

los niveles de D3R tendían a aumentar en la BLA de los ratones que recaen en ambas condiciones. Estos datos indican, paralelamente a lo observado en el NAc, un incremento significativo de la expresión de D3R en la BLA de ratones que recayeron en la CPP de después de un *priming* de cocaína o una derrota social, y están de acuerdo con los estudios que han mostrado un aumento de D3R en el sistema de recompensa de adictos humanos a cocaína y de ratones condicionados a señales asociadas a cocaína (195, 234). Este aumento se ha relacionado con la asociación de los efectos de la cocaína con los contextos ambientales y no con la droga de abuso *per se* (195). Aunque en estudios realizados en ratas con morfina crónica se ha mostrado un incremento de D3R en áreas dopaminérgicas y dopaminoceptivas (235), otros trabajos indican una reducción en la expresión de D3R en BLA en ratas inyectadas con heroína durante 7 días (173), así como en la amígdala de consumidores humanos de opiáceos (236). Estas discrepancias podrían deberse a los diferentes efectos de las sustancias psicoestimulantes y los de las depresoras, como los opiáceos, y ciertamente se necesitan más estudios para comprender esta disparidad. De acuerdo con lo propuesto en otros estudios (237), nuestros resultados probablemente muestran un mecanismo adaptativo para contrarrestar la mayor concentración extracelular de DA asociada con el *priming* de droga (238) y el estrés social (183, 184) que desencadenaron la reactivación de CPP, por el cual la expresión de los autorreceptores D3R en terminales dopaminérgicos aumentaría, lo que representaría un mecanismo de automodulación de la neurotransmisión dopaminérgica. Cuando administramos SB-277011-A, el aumento de D3R después del restablecimiento de la CPP provocado por un *priming* de cocaína o estrés social fue antagonizado. Nuestros datos, si bien refuerzan las evidencias de la existencia de diferentes sustratos neurobiológicos que subyacerían en las recaídas inducidas por el estrés o por la droga (147), son también en cierto modo sorprendentes, dado que también podrían indicar que, como resultado del bloqueo del D3R, tendría lugar un aumento en la DA extracelular (239) que mediaría la inhibición de las recaídas inducidas por el estrés social. Sin embargo, varias investigaciones podrían reforzar esta hipótesis. Por una parte, se ha descrito que la abstinencia de drogas induce una baja actividad de la función de recompensa dopaminérgica (14, 240) y, consecuentemente, se ha descrito que la liberación

de DA está disminuida en los adictos humanos (228). Además, se ha propuesto que el estrés induce la búsqueda de drogas a pesar de poseer bajos niveles de DA (226). Incluso ensayos clínicos han probado los efectos de los tratamientos que aumentaron la transmisión dopaminérgica en el sistema límbico, aunque no se obtuvieron resultados concluyentes (222). Por otro lado, se ha informado de que la inhibición de las neuronas glutamatérgicas en la BLA mediada por receptores opioides *kappa* es necesaria para el restablecimiento de la CPP inducida por nicotina (241). Asumiendo el carácter inhibitorio de D3R como receptor de la familia tipo D2, su mayor expresión en la BLA produciría la inhibición de las neuronas aferentes glutamatérgicas que podría ser necesaria para la reactivación de la CPP inducida por el estrés y, por lo tanto, el bloqueo de D3R revertiría esa inhibición. En su conjunto, los estudios antes mencionados y nuestros datos podrían señalar que la administración de SB-277011-A a ratones socialmente derrotados reduciría la expresión de D3R en la BLA para prevenir la reactivación de la CPP inducida por el estrés social, lo que respaldaría la utilidad de los antagonistas del D3R como un tratamiento potencial para prevenir la recaída en el abuso de cocaína inducido por el estrés.

DAT es un transportador de monoaminas Na^+/Cl^- ubicado en la membrana plasmática de los terminales dopaminérgicos, que regula los niveles de DA mediante la rápida recaptación del neurotransmisor liberado. Por tanto, este intercambiador es un factor determinante en la modulación de la intensidad y la duración de la acción de la DA (232). Por otro lado, se sabe que la cocaína ejerce sus principales efectos en el sistema mesocorticolímbico al unirse a DAT e inhibir la recaptación de DA en los terminales dopaminérgicos que proceden del VTA, aumentando así la concentración extracelular de DA en sus áreas de proyección (242). Nuestro estudio reveló incrementos no significativos de DAT en la BLA de ratones que recayeron en la CPP. Estudios previos han mostrado que la activación aguda del D3R conduce a un aumento de la actividad DAT (243). Por lo tanto, el aumento de DAT después de la reactivación de la CPP podría estar mediado por D3R como mecanismo compensatorio para disminuir los niveles extracelulares de DA (244). El efecto del bloqueo D3R impidiendo el aumento de DAT después de la reactivación de

CPP apoyaría esa hipótesis. Estudios previos han propuesto la existencia de diferentes mecanismos implicados en la modulación de la actividad DAT por D3R. Por ejemplo, se ha demostrado la existencia de interacciones físicas entre D3R y DAT que reducirían la recaptación de DA, aunque parece necesaria una exposición prolongada de D3R a los agonistas (245). Investigaciones anteriores también han demostrado que D3R controla la actividad DAT a través de diferentes quinasas, como la proteína quinasa activada por mitógenos y la PI3K (243), lo que ofrecería una explicación más plausible de nuestros resultados.

Aquí mostramos que el restablecimiento de la CPP inducida por el estrés social ocurre paralelamente a un aumento de DAT y D3R, encontrándose este último tanto en las neuronas glutamatérgicas principales como en las interneuronas GABAérgicas de la BLA. Esto podría ser una respuesta compensatoria al incremento en la neurotransmisión dopaminérgica inducida por un *priming* cocaína (238) o el estrés social agudo (183, 184, 246). Además, la activación de D3R parece ser esencial para la recaída inducida por el estrés social en la búsqueda de drogas, aunque los mecanismos subyacentes a este efecto no están bien establecidos. Sin embargo, nuestros datos respaldan que la mayor expresión de DAT mediada por D3R podría estar involucrada en este proceso. Nuestros hallazgos pueden indicar que, mientras que en las neuronas dopaminérgicas presinápticas la activación de D3R participaría en el aumento de DAT para reducir los niveles de DA extraneuronal, la activación de D3R en neuronas glutamatérgicas postsinápticas en la BLA mediaría en la inhibición de estas células, lo que podría ser crítico para la recaída en el comportamiento social de búsqueda de cocaína inducida por el estrés.

En el paradigma de la CPP, el entorno asociado con la droga adquiere propiedades gratificantes después de repetidas asociaciones. Por lo tanto, la preferencia posterior por el compartimento asociado a la droga podría conceptualizarse como un tipo de comportamiento de búsqueda de drogas, que puede medirse de manera diferente a la toma de droga (167). El hipocampo es el área principal que codifica la relación entre las drogas y sus señales contextuales y, en particular, se sabe que la actividad de DG es vital para la

adquisición y recuperación de recuerdos asociados a las drogas (170, 247). Además, el DG desempeña un papel fundamental en la recaída inducida por el estrés o búsqueda de psicoestimulantes y opioides (91, 248, 249). De acuerdo con nuestros datos, se ha informado que la administración de antagonistas de los receptores tipo D1 y D2 en el DG atenúa la recaída en la CPP en ratas previamente condicionadas con morfina (250, 251). Sin embargo, nuestros resultados indican que, aunque el bloqueo sistémico de D3R evitó la recaída por derrota social, las alteraciones en la expresión de D3R o DAT en DG parecen no participar en este proceso. Del mismo modo, no se encontraron cambios en los niveles de D3R o DAT después del restablecimiento de la CPP inducida por un *priming* de cocaína. La regulación por D3R de la recuperación de memoria mediada por DG podría estar mediada por un mecanismo indirecto a través del control de liberación de glucocorticoides. Se sabe que los glucocorticoides inducen la recuperación de la memoria episódica en el DG (252). Resultados de este trabajo revelan que el aumento de la concentración plasmática de corticosterona en ratones que recayeron en la CPP después del episodio agudo de estrés social se correlacionaron positivamente con el *score* de la post-reinst, y que esta subida de los niveles de corticosterona fue revertida por el antagonismo D3R (154). Por lo tanto, aunque la señalización de D3R en DG podría ser esencial para la recaída inducida por el estrés social en la búsqueda de drogas, se necesita más investigación para esclarecer su mecanismo.

Una de las vías de señalización que puede ser modulada por D3R es la cascada PI3K-Akt-mTOR (175). mTORC1 se ha relacionado con neuroadaptaciones inducidas por drogas y con comportamientos asociados con estas sustancias, como la sensibilización locomotora y la CPP (253). Además, mTORC1 desempeña un papel fundamental en la formación, recuperación y reconsolidación de recuerdos asociados a drogas mediante el control de la transcripción y la síntesis de proteínas en las dendritas a través de fosforilación de la quinasa de la proteína ribosómica S6 y posteriormente de la proteína ribosómica S6 (253, 254). Nuestros datos, que muestran una disminución de la fosforilación de mTOR después de la recaída en la CPP inducida por un *priming* de cocaína en la BLA, o estrés social en la BLA y DG, parecen indicar

que la estimulación de D3R en BLA y DG durante la reactivación de CPP provoca la inhibición de mTOR, que a su vez es atenuada o prevenida por el antagonismo de este receptor. La colocalización de D3R y pS6 en neuronas aferentes glutamatérgicas de la BLA y en las células granulares de DG apoya que la actividad de mTORC1 es dependiente de D3R en estas áreas. Se han publicado hallazgos contradictorios sobre la modulación D3R sobre la actividad de mTOR. El nuestro y otros grupos han informado una mayor actividad dependiente de D3R de la vía de señalización de mTOR en el NAc de ratones que restablecieron la CPP después de un *priming* de cocaína o en varias áreas límbicas después de la administración de ketamina (255). Por otro lado, se ha publicado que D3R media la autofagia en el cuerpo estriado induciendo la inhibición de mTORC1 (256). La función mTOR está modulada, además de por receptores dopaminérgicos, por otros de tipo ionotrópico (N-metil-D-aspartato-NMDA, ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico-AMPA) y metabotrópicos (receptor metabotrópico de glutamato 5) y diferentes factores neurotróficos (93). Sin embargo, nuestros datos parecen indicar que el control de D3R es esencial para el mantenimiento de la actividad basal de mTOR durante la reactivación de los recuerdos de cocaína inducidos por un *priming* de cocaína y estrés social en DG y BLA. También se han encontrado datos controvertidos con respecto a la actividad de mTOR en el hipocampo, la amígdala o el NAc después de la administración de drogas de abuso, como el tetrahidrocannabinol (257, 258), alcohol (259), nicotina (260) o metanfetamina (261), y durante los comportamientos relacionados con las drogas. En este trabajo se ha observado una mayor actividad de mTOR en el NAc después del restablecimiento inducido por una dosis de recuerdo de cocaína, y se han reportado resultados similares tras la búsqueda de alcohol (262), y también en la amígdala (pero no en la NAc o PFC) después de la administración de morfina (263). Además, los niveles de Akt fosforilado, pmTOR y p70S6K aumentaron significativamente en el área CA3 del hipocampo, pero no en el CA1, NAc o VTA después de la CPP por morfina (264), y en la recaída en la CPP inducida por la derrota social no hemos observado modificaciones en la relación pmTOR/mTOR en el NAc. En conjunto, nuestros hallazgos y los publicados por otros grupos sugieren que la regulación de la vía de mTOR por las drogas y los comportamientos relacionados con las mismas podría estar

condicionada por los estímulos y las áreas cerebrales implicadas en su respuesta.

La actividad equilibrada de mTOR es necesaria para un procesamiento de memoria adecuado. La señalización de mTOR ejerce esta función controlando la transcripción y la síntesis de proteínas dendríticas que median en la potenciación a largo plazo de fase tardía y la plasticidad sináptica (265). Aunque se han realizado más investigaciones en VTA y NAc estudiando la implicación de mTOR en las neuroadaptaciones inducidas por drogas, se sabe menos sobre la función de esta vía en el hipocampo y en la amígdala de cerebros adictos. Parece ampliamente aceptado que el aumento de la actividad mTOR ocurre paralelamente a un incremento de la actividad sináptica (265). Sobre este asunto, el estrés, que se sabe que altera los procesos cognitivos y de memoria (266), cuando es agudo se ha relacionado con una disminución de la fosforilación de mTOR en el hipocampo (267) y cuándo es crónico se ha relacionado con una disminución de la actividad de mTOR en la amígdala (268). Además, la inhibición de mTORC1 en el hipocampo ha resultado en un deterioro de la recuperación de la memoria espacial (269) y en la formación interrumpida de la memoria de miedo contextual a largo plazo (270). Sin embargo, en el presente estudio hemos observado una disminución en la fosforilación de mTOR en el BLA y DG de ratones que reactivaron los recuerdos asociados a cocaína después de un episodio agudo de estrés social o de un *priming* de cocaína. De acuerdo con las investigaciones antes mencionadas, nuestros resultados señalarían que la recaída en la CPP inducida por drogas o estrés disminuiría los procesos de sinaptoplasticidad. Sin embargo, Al-Ali y colaboradores (271) describieron que la inhibición de S6K1, una diana aguas abajo de mTOR, promueve la proliferación de neuritas *in vitro*, lo que se ha asociado con la retroalimentación negativa mediada por P70S6K1 en la señalización de PI3K-mTOR. Concordantemente, la inhibición de la vía mTORC1-S6K1 mejora la plasticidad sináptica y el aprendizaje en el hipocampo de ratones con síndrome de Angelman (272). Por lo tanto, se necesita más investigación para comprender mejor la función mTOR en los procesos cognitivos y de memoria.

CONCLUSIONES

VI. CONCLUSIONES

En base a los resultados obtenidos, se ha llegado a las siguientes conclusiones:

1. Las recaídas inducidas por estímulos estresantes (SD, inmovilización y dolor) y su modificación en animales pretratados con un antagonista selectivo del D3R indican que la neurotransmisión dopaminérgica, a través de la estimulación del D3R, es crítica y podría modular de forma diferente el restablecimiento de los comportamientos de búsqueda de drogas dependiendo del estímulo que desencadena dicha recaída.
2. La liberación de glucocorticoides durante las recaídas y los efectos del antagonista del D3R sugieren que dicho receptor podría constituir un punto de confluencia crucial entre el estrés y las recaídas en la búsqueda de cocaína.
3. En el NAc shell se produjo un aumento de la expresión de DAT y D3R, tras las recaídas en la CPP inducidas por una sesión aguda de SD y por un *priming* de cocaína tras un periodo de abstinencia. Esta expresión se inhibió cuando se administró de forma previa una dosis aguda del antagonista del D3R. Estos resultados indican que DAT y D3R se hayan comprometidos en la reactivación de las memorias de recompensa de las drogas. El incremento en dichas proteínas durante el estrés social fue efectivamente prevenido mediante el bloqueo selectivo del D3R, lo que paralelamente indujo una atenuación en las recaídas. Estos datos sugieren que la potencial eficacia terapéutica de los fármacos antagonistas del D3R para impedir las recaídas inducidas por estrés y asociadas a las memorias emocionales y placenteras establecidas entre cocaína y lugar de consumo, podría involucrar una regulación a la baja de DAT y D3R en el NAc shell.

4. El estudio de la activación de la cascada de señalización Akt/mTOR en el NAc mostró que no existen cambios significativos en la misma durante las recaídas en el CPP inducidas por estrés social o por un *priming* de cocaína, aunque en este último caso se observó un aumento que fue suprimido por el antagonista del D3R. Todo ello sugiere que dicha cascada no participaría, al menos directamente, en dichas recaídas. La caracterización, mediante estudio inmunohistoquímico, de las poblaciones neuronales del NAc que expresan pAkt y/o mTOR evidenció que ambas se expresan en las neuronas GABAérgicas de dicho núcleo, y que el D3R postsináptico se expresa en neuronas pAkt-positivas, lo que evidenciaría que el D3R podría regular la señalización mediada por Akt tras la exposición a un *priming* de cocaína.
5. Mientras que en la BLA la recaída en la CPP provocada por estrés social o por una dosis *priming* de cocaína produjo una disminución de los niveles de D3R y DAT, que fue antagonizada mediante la administración sistémica de SB-277011-A, estos parámetros no sufrieron modificaciones en el DG en las mismas condiciones experimentales. Por una parte, estos datos indicarían una regulación directa por D3R de la recuperación de memorias asociadas con esta droga en BLA, mientras que D3R modularía este proceso por mecanismos indirectos en DG. Además, nuestros datos podrían apuntar a que la inhibición de las neuronas glutamatérgicas de la BLA, subsecuente a la estimulación de sus D3R, podría ser necesaria para la reactivación de las memorias asociadas al consumo de cocaína inducidas por un episodio agudo de estrés social.
6. La recaída en la CPP tras la administración de un *priming* de cocaína o de un episodio de derrota social provocó una disminución de la actividad de mTOR en BLA y DG. El bloqueo de D3R provocó alteraciones en la actividad de esta quinasa en ambas regiones, lo que, junto con la colocalización de D3R y pS6 observada en neuronas glutamatérgicas y GABAérgicas de las mismas, apoya la hipótesis de que la actividad de

esta ruta de señalización está modulada, directa o indirectamente, por D3R en BLA y DG, con probables consecuencias en los procesos sinaptoplásticos de estas áreas.

7. Los resultados del presente trabajo sugieren que el D3R media, al menos en parte, los procesos emocionales y de aprendizaje que subyacen en las recaídas en el consumo de cocaína inducidas por estrés y apoyan la utilización de antagonistas de este receptor como potencial tratamiento en humanos para la prevención de las mismas.

VII. BIBLIOGRAFÍA

1. Muller TE, Fontana BD, Bertencello KT, Francescon F, Mezzomo NJ, Canzian J, et al. Understanding the neurobiological effects of drug abuse: Lessons from zebrafish models. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2020;100:109873.
2. Baptiste-Roberts K, Hossain M. Socioeconomic Disparities and Self-reported Substance Abuse-related Problems. *Addiction & health*. 2018;10(2):112-22.
3. Fattore L, Weinstein AM. Editorial: Novel Psychoactive Drugs. *Frontiers in psychiatry*. 2019;10:119.
4. Pachado MP, Scherer JN, Guimaraes LSP, von Diemen L, Pechansky F, Kessler FHP, et al. Markers for Severity of Problems in Interpersonal Relationships of Crack Cocaine Users from a Brazilian Multicenter Study. *The Psychiatric quarterly*. 2018;89(4):923-36.
5. [wonder.cdc.gov CWIWcgcmAfh](http://wonder.cdc.gov/CWIWcgcmAfh).
6. <https://www.drugabuse.gov/related-topics/trends-statistics/overdose-death-rates> ODRIDgcmAf.
7. Toxicomanías OEdIDyl. Informe Europeo sobre Drogas 2019: Tendencias y novedades. In: Oficina de Publicaciones de la Unión Europea L, editor. 2019.
8. Goodman A. Neurobiology of addiction. An integrative review. *Biochemical pharmacology*. 2008;75(1):266-322.
9. Venniro M, Caprioli D, Shaham Y. Chapter 2 - Animal models of drug relapse and craving: From drug priming-induced reinstatement to incubation of craving after voluntary abstinence. In: Ekhtiari H, Paulus MP, editors. *Progress in Brain Research*. 224: Elsevier; 2016. p. 25-52.
10. Goode TD, Maren S. Common neurocircuitry mediating drug and fear relapse in preclinical models. *Psychopharmacology*. 2019;236(1):415-37.
11. Nestler EJ. Molecular basis of long-term plasticity underlying addiction. *Nature reviews Neuroscience*. 2001;2(2):119-28.
12. Sun W, Rebec GV. Repeated cocaine self-administration alters processing of cocaine-related information in rat prefrontal cortex. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2006;26(30):8004-8.
13. Zou Z, Wang H, d'Oleire Uquillas F, Wang X, Ding J, Chen H. Definition of Substance and Non-substance Addiction. *Advances in experimental medicine and biology*. 2017;1010:21-41.

14. Koob GF, Volkow ND. Neurobiology of addiction: a neurocircuitry analysis. *The Lancet Psychiatry*. 2016;3(8):760-73.
15. Mantsch JR, Baker DA, Funk D, Le AD, Shaham Y. Stress-Induced Reinstatement of Drug Seeking: 20 Years of Progress. *Neuropsychopharmacology* : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology. 2016;41(1):335-56.
16. Greenwald MK. Anti-stress neuropharmacological mechanisms and targets for addiction treatment: A translational framework. *Neurobiology of stress*. 2018;9:84-104.
17. Koob GF, Volkow ND. Neurocircuitry of addiction. *Neuropsychopharmacology* : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology. 2010;35(1):217-38.
18. Volkow ND, Koob GF, McLellan AT. Neurobiologic Advances from the Brain Disease Model of Addiction. *N Engl J Med*. 2016;374(4):363-71.
19. Kirshenbaum AP, Olsen DM, Bickel WK. A quantitative review of the ubiquitous relapse curve. *Journal of substance abuse treatment*. 2009;36(1):8-17.
20. Czoty PW, Stoops WW, Rush CR. Evaluation of the "Pipeline" for Development of Medications for Cocaine Use Disorder: A Review of Translational Preclinical, Human Laboratory, and Clinical Trial Research. *Pharmacological reviews*. 2016;68(3):533-62.
21. Sgritta M. Control of Cocaine Relapse: Lost in Translation. *Biological psychiatry*. 2018;84(3):e25-e6.
22. de Wit H, Stewart J. Reinstatement of cocaine-reinforced responding in the rat. *Psychopharmacology (Berl)*. 1981;75(2):134-43.
23. Shaham Y, Shalev U, Lu L, de Wit H, Stewart J. The reinstatement model of drug relapse: history, methodology and major findings. *Psychopharmacology (Berl)*. 2003;168(1-2):3-20.
24. Bouton ME. A learning theory perspective on lapse, relapse, and the maintenance of behavior change. *Health psychology* : official journal of the Division of Health Psychology, American Psychological Association. 2000;19(1S):57-63.
25. Bouton ME. Context, ambiguity, and unlearning: sources of relapse after behavioral extinction. *Biological psychiatry*. 2002;52(10):976-86.
26. Bouton ME. Why behavior change is difficult to sustain. *Preventive Medicine*. 2014;68:29-36.
27. Peters J, Kalivas PW, Quirk GJ. Extinction circuits for fear and addiction overlap in prefrontal cortex. *Learning & memory*. 2009;16(5):279-88.

28. Rosas JM, Todd TP, Bouton ME. Context change and associative learning. *WIREs Cognitive Science*. 2013;4(3):237-44.
29. Olds J, Milner P. Positive reinforcement produced by electrical stimulation of septal area and other regions of rat brain. *Journal of comparative and physiological psychology*. 1954;47(6):419-27.
30. Russo SJ, Nestler EJ. The brain reward circuitry in mood disorders. *Nature reviews Neuroscience*. 2013;14(9):609-25.
31. Tritsch NX, Ding JB, Sabatini BL. Dopaminergic neurons inhibit striatal output through non-canonical release of GABA. *Nature*. 2012;490(7419):262-6.
32. Koob GF, Le Moal M. Review. Neurobiological mechanisms for opponent motivational processes in addiction. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences*. 2008;363(1507):3113-23.
33. Salamone JD, Correa M. The mysterious motivational functions of mesolimbic dopamine. *Neuron*. 2012;76(3):470-85.
34. Volkow ND, Morales M. The Brain on Drugs: From Reward to Addiction. *Cell*. 2015;162(4):712-25.
35. Liu JF, Li JX. Drug addiction: a curable mental disorder? *Acta pharmacologica Sinica*. 2018;39(12):1823-9.
36. DePoy L, Daut R, Brigman JL, MacPherson K, Crowley N, Gunduz-Cinar O, et al. Chronic alcohol produces neuroadaptations to prime dorsal striatal learning. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2013;110(36):14783-8.
37. Madhavan A, Argilli E, Bonci A, Whistler JL. Loss of D2 dopamine receptor function modulates cocaine-induced glutamatergic synaptic potentiation in the ventral tegmental area. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2013;33(30):12329-36.
38. Koob GF. Antireward, compulsivity, and addiction: seminal contributions of Dr. Athina Markou to motivational dysregulation in addiction. *Psychopharmacology (Berl)*. 2017;234(9-10):1315-32.
39. Schwabe L, Joels M, Roozendaal B, Wolf OT, Oitzl MS. Stress effects on memory: an update and integration. *Neuroscience and biobehavioral reviews*. 2012;36(7):1740-9.
40. Koob GF, Le Moal M. Drug addiction, dysregulation of reward, and allostasis. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*. 2001;24(2):97-129.

41. Kosari-Nasab M, Sadeghi T, Bashiri H, Shokouhi G, Salari AA. The blockade of corticotropin-releasing factor 1 receptor attenuates anxiety-related symptoms and hypothalamus-pituitary-adrenal axis reactivity in mice with mild traumatic brain injury. *Behavioural pharmacology*. 2019;30(2 and 3 - Special Issue):220-8.
42. Sapolsky RM, Romero LM, Munck AU. How Do Glucocorticoids Influence Stress Responses? Integrating Permissive, Suppressive, Stimulatory, and Preparative Actions*. *Endocrine Reviews*. 2000;21(1):55-89.
43. Auclair A, Blanc G, Glowinski J, Tassin JP. Role of serotonin 2A receptors in the D-amphetamine-induced release of dopamine: comparison with previous data on alpha1b-adrenergic receptors. *Journal of neurochemistry*. 2004;91(2):318-26.
44. Grenhoff J, Svensson TH. Prazosin modulates the firing pattern of dopamine neurons in rat ventral tegmental area. *European journal of pharmacology*. 1993;233(1):79-84.
45. Devoto P, Flore G, Saba P, Fa M, Gessa GL. Stimulation of the locus coeruleus elicits noradrenaline and dopamine release in the medial prefrontal and parietal cortex. *Journal of neurochemistry*. 2005;92(2):368-74.
46. Morón JA, Brockington A, Wise RA, Rocha BA, Hope BT. Dopamine uptake through the norepinephrine transporter in brain regions with low levels of the dopamine transporter: evidence from knock-out mouse lines. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2002;22(2):389-95.
47. Sauvage M, Steckler T. Detection of corticotropin-releasing hormone receptor 1 immunoreactivity in cholinergic, dopaminergic and noradrenergic neurons of the murine basal forebrain and brainstem nuclei--potential implication for arousal and attention. *Neuroscience*. 2001;104(3):643-52.
48. Koob GF. Dynamics of neuronal circuits in addiction: reward, antireward, and emotional memory. *Pharmacopsychiatry*. 2009;42 Suppl 1:S32-41.
49. Nunez C, Foldes A, Laorden ML, Milanes MV, Kovacs KJ. Activation of stress-related hypothalamic neuropeptide gene expression during morphine withdrawal. *Journal of neurochemistry*. 2007;101(4):1060-71.
50. Dunn AJ, Swiergiel AH. The role of corticotropin-releasing factor and noradrenaline in stress-related responses, and the inter-relationships between the two systems. *European journal of pharmacology*. 2008;583(2-3):186-93.
51. Bickel WK, Mellis AM, Snider SE, Athamneh LN, Stein JS, Pope DA. 21st century neurobehavioral theories of decision making in addiction: Review and evaluation. *Pharmacol Biochem Behav*. 2018;164:4-21.
52. Torregrossa MM, Corlett PR, Taylor JR. Aberrant learning and memory in addiction. *Neurobiology of learning and memory*. 2011;96(4):609-23.

53. Schultz W. Dopamine signals for reward value and risk: basic and recent data. *Behavioral and brain functions* : BBF. 2010;6:24.
54. Garcia Pardo MP, Roger Sanchez C, De la Rubia Orti JE, Aguilar Calpe MA. Animal models of drug addiction. *Adicciones*. 2017;29(4):278-92.
55. Shi X, Miller JS, Harper LJ, Poole RL, Gould TJ, Unterwald EM. Reactivation of cocaine reward memory engages the Akt/GSK3/mTOR signaling pathway and can be disrupted by GSK3 inhibition. *Psychopharmacology*. 2014;231(16):3109-18.
56. Carey RJ, Carrera MP, Damianopoulos EN. A new proposal for drug conditioning with implications for drug addiction: the Pavlovian two-step from delay to trace conditioning. *Behavioural brain research*. 2014;275:150-6.
57. Everitt BJ. Neural and psychological mechanisms underlying compulsive drug seeking habits and drug memories--indications for novel treatments of addiction. *The European journal of neuroscience*. 2014;40(1):2163-82.
58. Wang X, Luo Y-x, He Y-y, Li F-q, Shi H-s, Xue L-f, et al. Nucleus Accumbens Core Mammalian Target of Rapamycin Signaling Pathway Is Critical for Cue-Induced Reinstatement of Cocaine Seeking in Rats. *The Journal of Neuroscience*. 2010;30(38):12632-41.
59. White NM. Addictive drugs as reinforcers: multiple partial actions on memory systems. *Addiction*. 1996;91(7):921-49; discussion 51-65.
60. Everitt BJ, Dickinson A, Robbins TW. The neuropsychological basis of addictive behaviour. *Brain research Brain research reviews*. 2001;36(2-3):129-38.
61. Thomas MJ, Kalivas PW, Shaham Y. Neuroplasticity in the mesolimbic dopamine system and cocaine addiction. *British journal of pharmacology*. 2008;154(2):327-42.
62. Roozendaal B, McEwen BS, Chattarji S. Stress, memory and the amygdala. *Nature Reviews Neuroscience*. 2009;10(6):423-33.
63. Gipson CD, Kupchik YM, Kalivas PW. Rapid, transient synaptic plasticity in addiction. *Neuropharmacology*. 2014;76 Pt B:276-86.
64. Milton AL, Everitt BJ. The persistence of maladaptive memory: addiction, drug memories and anti-relapse treatments. *Neuroscience and biobehavioral reviews*. 2012;36(4):1119-39.
65. Nestler EJ. Cellular basis of memory for addiction. *Dialogues in clinical neuroscience*. 2013;15(4):431-43.
66. Bossert JM, Marchant NJ, Calu DJ, Shaham Y. The reinstatement model of drug relapse: recent neurobiological findings, emerging research topics, and translational research. *Psychopharmacology (Berl)*. 2013;229(3):453-76.

67. Everitt BJ, Robbins TW. Neural systems of reinforcement for drug addiction: from actions to habits to compulsion. *Nature neuroscience*. 2005;8(11):1481-9.
68. Garavan H, Pankiewicz J, Bloom A, Cho JK, Sperry L, Ross TJ, et al. Cue-induced cocaine craving: neuroanatomical specificity for drug users and drug stimuli. *The American journal of psychiatry*. 2000;157(11):1789-98.
69. Hyman SE, Malenka RC, Nestler EJ. NEURAL MECHANISMS OF ADDICTION: The Role of Reward-Related Learning and Memory. *Annual Review of Neuroscience*. 2006;29(1):565-98.
70. Kauer JA. Learning Mechanisms in Addiction: Synaptic Plasticity in the Ventral Tegmental Area as a Result of Exposure to Drugs of Abuse. *Annual Review of Physiology*. 2004;66(1):447-75.
71. Girardeau G, Inema I, Buzsáki G. Reactivations of emotional memory in the hippocampus–amygdala system during sleep. *Nature neuroscience*. 2017;20(11):1634-42.
72. Ribeiro Do Couto B, Aguilar MA, Manzanedo C, Rodríguez-Arias M, Armario A, Miñarro J. Social stress is as effective as physical stress in reinstating morphine-induced place preference in mice. *Psychopharmacology*. 2006;185(4):459-70.
73. Polter AM, Kauer JA. Stress and VTA synapses: implications for addiction and depression. *The European journal of neuroscience*. 2014;39(7):1179-88.
74. Roozendaal B, McGaugh JL. Memory modulation. *Behavioral neuroscience*. 2011;125(6):797-824.
75. McGaugh JL. Memory--a Century of Consolidation. *Science*. 2000;287(5451):248-51.
76. Liang KC, Juler RG, McGaugh JL. Modulating effects of posttraining epinephrine on memory: Involvement of the amygdala noradrenergic system. *Brain Research*. 1986;368(1):125-33.
77. Quirarte GL, Roozendaal B, McGaugh JL. Glucocorticoid enhancement of memory storage involves noradrenergic activation in the basolateral amygdala. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1997;94(25):14048-53.
78. Roozendaal B, Okuda S, Van der Zee EA, McGaugh JL. Glucocorticoid enhancement of memory requires arousal-induced noradrenergic activation in the basolateral amygdala. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2006;103(17):6741-6.
79. Roozendaal B, McGaugh JL. Basolateral Amygdala Lesions Block the Memory-enhancing Effect of Glucocorticoid Administration in the Dorsal Hippocampus of Rats. *European Journal of Neuroscience*. 1997;9(1):76-83.

80. McGaugh JL. THE AMYGDALA MODULATES THE CONSOLIDATION OF MEMORIES OF EMOTIONALLY AROUSING EXPERIENCES. *Annual Review of Neuroscience*. 2004;27(1):1-28.
81. McIntyre CK, Miyashita T, Setlow B, Marjon KD, Steward O, Guzowski JF, et al. Memory-influencing intra-basolateral amygdala drug infusions modulate expression of Arc protein in the hippocampus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005;102(30):10718-23.
82. Seeley WW, Menon V, Schatzberg AF, Keller J, Glover GH, Kenna H, et al. Dissociable intrinsic connectivity networks for salience processing and executive control. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2007;27(9):2349-56.
83. Hermans EJ, Battaglia FP, Atsak P, de Voogd LD, Fernández G, Roozendaal B. How the amygdala affects emotional memory by altering brain network properties. *Neurobiology of learning and memory*. 2014;112:2-16.
84. Ye X, Kapeller-Libermann D, Travaglia A, Inda MC, Alberini CM. Direct dorsal hippocampal–prelimbic cortex connections strengthen fear memories. *Nature neuroscience*. 2016;20:52.
85. Stoica L, Zhu PJ, Huang W, Zhou H, Kozma SC, Costa-Mattioli M. Selective pharmacogenetic inhibition of mammalian target of Rapamycin complex I (mTORC1) blocks long-term synaptic plasticity and memory storage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2011;108(9):3791-6.
86. Kutlu MG, Gould TJ. Effects of drugs of abuse on hippocampal plasticity and hippocampus-dependent learning and memory: contributions to development and maintenance of addiction. *Learning & memory*. 2016;23(10):515-33.
87. Du H, Deng W, Aimone JB, Ge M, Parylak S, Walch K, et al. Dopaminergic inputs in the dentate gyrus direct the choice of memory encoding. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2016;113(37):E5501-E10.
88. Drew LJ, Fusi S, Hen R. Adult neurogenesis in the mammalian hippocampus: why the dentate gyrus? *Learning & memory (Cold Spring Harbor, NY)*. 2013;20(12):710-29.
89. Moreno-Jiménez EP, Flor-García M, Terreros-Roncal J, Rábano A, Cafini F, Pallas-Bazarra N, et al. Adult hippocampal neurogenesis is abundant in neurologically healthy subjects and drops sharply in patients with Alzheimer's disease. *Nature Medicine*. 2019;25(4):554-60.
90. Barr JL, Unterwald EM. Activity-regulated gene expression in immature neurons in the dentate gyrus following re-exposure to a cocaine-paired environment. *Hippocampus*. 2015;25(3):354-62.
91. Takashima Y, Mandyam CD. The role of hippocampal adult neurogenesis in methamphetamine addiction. *Brain plasticity*. 2018;3(2):157-68.

92. van Huijstee AN, Mansvelder HD. Glutamatergic synaptic plasticity in the mesocorticolimbic system in addiction. *Frontiers in cellular neuroscience*. 2015;8(466).
93. Hoeffler CA, Klann E. mTOR signaling: at the crossroads of plasticity, memory and disease. *Trends Neurosci*. 2010;33(2):67-75.
94. Rich MT, Huang YH, Torregrossa MM. Plasticity at Thalamo-amygdala Synapses Regulates Cocaine-Cue Memory Formation and Extinction. *Cell reports*. 2019;26(4):1010-20.e5.
95. Wu Q, Reith ME, Kuhar MJ, Carroll FI, Garris PA. Preferential increases in nucleus accumbens dopamine after systemic cocaine administration are caused by unique characteristics of dopamine neurotransmission. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2001;21(16):6338-47.
96. Karila L, Zarmidini R, Petit A, Lafaye G, Lowenstein W, Reynaud M. Addiction à la cocaïne : données actuelles pour le clinicien. *La Presse Médicale*. 2014;43(1):9-17.
97. Blejer-Prieto H. Coca leaf and cocaine addiction--some historical notes. *Can Med Assoc J*. 1965;93(13):700-4.
98. Bijlsma L, Botero-Coy AM, Rincón RJ, Peñuela GA, Hernández F. Estimation of illicit drug use in the main cities of Colombia by means of urban wastewater analysis. *Science of The Total Environment*. 2016;565:984-93.
99. Lewis Nelson MO, MD. Cocaine: Acute intoxication. In: Stephen J Traub MMB, MD, MPH, editor.: www.uptodate.com; 2020.
100. Dursteler KM, Berger EM, Strasser J, Caflisch C, Mutschler J, Herdener M, et al. Clinical potential of methylphenidate in the treatment of cocaine addiction: a review of the current evidence. *Substance abuse and rehabilitation*. 2015;6:61-74.
101. Jeffcoat AR, Perez-Reyes M, Hill JM, Sadler BM, Cook CE. Cocaine disposition in humans after intravenous injection, nasal insufflation (snorting), or smoking. *Drug Metabolism and Disposition*. 1989;17(2):153-9.
102. Lizasoain I, Moro MA, Lorenzo P. Cocaína: aspectos farmacológicos. 2002. 2002;14(1):8.
103. dela Pena I, Gevorkiana R, Shi WX. Psychostimulants affect dopamine transmission through both dopamine transporter-dependent and independent mechanisms. *European journal of pharmacology*. 2015;764:562-70.
104. Maisonneuve IM, Kreek MJ. Acute tolerance to the dopamine response induced by a binge pattern of cocaine administration in male rats: an in vivo microdialysis study. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 1994;268(2):916-21.
105. Shanti CM, Lucas CE. Cocaine and the critical care challenge. *Critical care medicine*. 2003;31(6):1851-9.

106. <https://www.murciasalud.es/toxiconet.php?iddoc=167201&idsec=4014>.
107. Lee KC, Ladizinski B, Federman DG. Complications Associated With Use of Levamisole-Contaminated Cocaine: An Emerging Public Health Challenge. *Mayo Clinic Proceedings*. 2012;87(6):581-6.
108. Buchanan JA, Heard K, Burbach C, Wilson ML, Dart R. Prevalence of Levamisole in Urine Toxicology Screens Positive for Cocaine in an Inner-City Hospital. *JAMA*. 2011;305(16):1657-8.
109. Gross RL, Brucker J, Bahce-Altuntas A, Abadi MA, Lipoff J, Kotlyar D, et al. A novel cutaneous vasculitis syndrome induced by levamisole-contaminated cocaine. *Clinical Rheumatology*. 2011;30(10):1385-92.
110. Khatri UG, Viner K, Perrone J. Lethal Fentanyl and Cocaine Intoxication. *New England Journal of Medicine*. 2018;379(18):1782-.
111. Irantzu González Llona ST, Miguel Ángel González - Torres, Moisés Gaviria Cocaine: A review of addiction and treatment. *Rev Asoc Esp Neuropsiq.* 2015;35 , ((127)):555-71.
112. Salazar-Juárez A, Barbosa-Méndez S, Jurado N, Antón B. Las enzimas involucradas en el metabolismo de la cocaína: Una nueva aproximación farmacológica para el tratamiento de la intoxicación por sobredosis de cocaína. *Salud mental*. 2016;39:311-20.
113. Zoncu R, Efeyan A, Sabatini DM. mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2011;12(1):21-35.
114. Mazei-Robison MS, Koo JW, Friedman AK, Lansink CS, Robison AJ, Vinish M, et al. Role for mTOR signaling and neuronal activity in morphine-induced adaptations in ventral tegmental area dopamine neurons. *Neuron*. 2011;72(6):977-90.
115. Neasta J, Barak S, Hamida SB, Ron D. mTOR complex 1: a key player in neuroadaptations induced by drugs of abuse. *Journal of neurochemistry*. 2014;130(2):172-84.
116. Hay N, Sonenberg N. Upstream and downstream of mTOR. *Genes & development*. 2004;18(16):1926-45.
117. Barak S, Liu F, Ben Hamida S, Yowell QV, Neasta J, Kharazia V, et al. Disruption of alcohol-related memories by mTORC1 inhibition prevents relapse. *Nature neuroscience*. 2013;16(8):1111-7.
118. Swiech L, Perycz M, Malik A, Jaworski J. Role of mTOR in physiology and pathology of the nervous system. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*. 2008;1784(1):116-32.

119. Gryz M, Lehner M, Wislowska-Stanek A, Plaznik A. Dopaminergic system activity under stress condition - seeking individual differences, preclinical studies. *Psychiatria polska*. 2018;52(3):459-70.
120. Rangel-Barajas C, Coronel I, Florán B. Dopamine Receptors and Neurodegeneration. *Aging Dis*. 2015;6(5):349-68.
121. Chien EYT, Liu W, Zhao Q, Katritch V, Han GW, Hanson MA, et al. Structure of the human dopamine D3 receptor in complex with a D2/D3 selective antagonist. *Science (New York, NY)*. 2010;330(6007):1091-5.
122. Pich EM, Collo G. Pharmacological targeting of dopamine D3 receptors: Possible clinical applications of selective drugs. *European Neuropsychopharmacology*. 2015;25(9):1437-47.
123. Cortés A, Moreno E, Rodríguez-Ruiz M, Canela EI, Casadó V. Targeting the dopamine D3 receptor: an overview of drug design strategies. *Expert Opinion on Drug Discovery*. 2016;11(7):641-64.
124. Maramai S, Gemma S, Brogi S, Campiani G, Butini S, Stark H, et al. Dopamine D3 Receptor Antagonists as Potential Therapeutics for the Treatment of Neurological Diseases. *Front Neurosci*. 2016;10:451-.
125. Seeman P. Atypical antipsychotics: mechanism of action. *Canadian journal of psychiatry Revue canadienne de psychiatrie*. 2002;47(1):27-38.
126. Prieto GA. Abnormalities of Dopamine D(3) Receptor Signaling in the Diseased Brain. *J Cent Nerv Syst Dis*. 2017;9:1179573517726335-.
127. Salles M-J, Hervé D, Rivet J-M, Longueville S, Millan MJ, Girault JA, et al. Transient and rapid activation of Akt/GSK-3 β and mTORC1 signaling by D3 dopamine receptor stimulation in dorsal striatum and nucleus accumbens. *Journal of neurochemistry*. 2013;125(4):532-44.
128. Collo G, Bono F, Cavalleri L, Plebani L, Merlo Pich E, Millan MJ, et al. Pre-synaptic dopamine D3 receptor mediates cocaine-induced structural plasticity in mesencephalic dopaminergic neurons via ERK and Akt pathways. *Journal of neurochemistry*. 2012;120(5):765-78.
129. Song R, Zhang H-Y, Peng X-Q, Su R-B, Yang R-F, Li J, et al. Dopamine D(3) receptor deletion or blockade attenuates cocaine-induced conditioned place preference in mice. *Neuropharmacology*. 2013;72:82-7.
130. Payer D, Balasubramaniam G, Boileau I. What is the role of the D3 receptor in addiction? A mini review of PET studies with [(11)C]-(+)-PHNO. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2014;52:4-8.
131. Marino RA, Levy R. Differential effects of D1 and D2 dopamine agonists on memory, motivation, learning and response time in non-human primates. *European Journal of Neuroscience*. 2019;49(2):199-214.

132. Collo G, Zanetti S, Missale C, Spano P. Dopamine D3 receptor-preferring agonists increase dendrite arborization of mesencephalic dopaminergic neurons via extracellular signal-regulated kinase phosphorylation. *European Journal of Neuroscience*. 2008;28(7):1231-40.
133. Collo G, Bono F, Cavalleri L, Plebani L, Mitola S, Merlo Pich E, et al. Nicotine-Induced Structural Plasticity in Mesencephalic Dopaminergic Neurons Is Mediated by Dopamine D3 Receptors and Akt-mTORC1 Signaling. *Molecular Pharmacology*. 2013;83(6):1176-89.
134. Millan MJ, Gobert A, Newman-Tancredi A, Lejeune F, Cussac D, Rivet J-M, et al. S33084, a Novel, Potent, Selective, and Competitive Antagonist at Dopamine D₃-Receptors: I. Receptorial, Electrophysiological and Neurochemical Profile Compared with GR218,231 and L741,626. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2000;293(3):1048-62.
135. Sokoloff P, Le Foll B. The dopamine D3 receptor, a quarter century later. *The European journal of neuroscience*. 2017;45(1):2-19.
136. Maggio R, Scarselli M, Capannolo M, Millan MJ. Novel dimensions of D3 receptor function: Focus on heterodimerisation, transactivation and allosteric modulation. *European Neuropsychopharmacology*. 2015;25(9):1470-9.
137. Agnati LF, Guidolin D, Cervetto C, Borroto-Escuela DO, Fuxe K. Role of iso-receptors in receptor-receptor interactions with a focus on dopamine iso-receptor complexes. *Reviews in the neurosciences*. 2016;27(1):1-25.
138. Newman AH, Beuming T, Banala AK, Donthamsetti P, Pongetti K, LaBounty A, et al. Molecular determinants of selectivity and efficacy at the dopamine D3 receptor. *J Med Chem*. 2012;55(15):6689-99.
139. Beaulieu J-M, Gainetdinov RR. The Physiology, Signaling, and Pharmacology of Dopamine Receptors. *Pharmacological reviews*. 2011;63(1):182-217.
140. Xi Z-X, Gilbert J, Campos AC, Kline N, Ashby CR, Jr., Hagan JJ, et al. Blockade of mesolimbic dopamine D3 receptors inhibits stress-induced reinstatement of cocaine-seeking in rats. *Psychopharmacology*. 2004;176(1):57-65.
141. Rubira ER. MEDICAMENTOS. Un viaje a lo largo de la evolución histórica del descubrimiento de fármacos. In: USC eSdCSdPelCd, editor. 1ª ed. Santiago de Compostela2008.
142. Butini S, Nikolic K, Kassel S, Brückmann H, Filipic S, Agbaba D, et al. Polypharmacology of dopamine receptor ligands. *Progress in Neurobiology*. 2016;142:68-103.
143. Lober S, Hubner H, Tschammer N, Gmeiner P. Recent advances in the search for D3- and D4-selective drugs: probes, models and candidates. *Trends in pharmacological sciences*. 2011;32(3):148-57.

144. Thanos PK, Katana JM, Ashby CR, Michaelides M, Gardner EL, Heidbreder CA, et al. The selective dopamine D3 receptor antagonist SB-277011-A attenuates ethanol consumption in ethanol preferring (P) and non-preferring (NP) rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 2005;81(1):190-7.
145. Rodriguez-Arias M, Minarro J, Aguilar MA, Pinazo J, Simon VM. Effects of risperidone and SCH 23390 on isolation-induced aggression in male mice. *European neuropsychopharmacology : the journal of the European College of Neuropsychopharmacology*. 1998;8(2):95-103.
146. Ribeiro Do Couto B, Aguilar MA, Lluch J, Rodriguez-Arias M, Minarro J. Social experiences affect reinstatement of cocaine-induced place preference in mice. *Psychopharmacology (Berl)*. 2009;207(3):485-98.
147. Farrell MR, Schoch H, Mahler SV. Modeling cocaine relapse in rodents: Behavioral considerations and circuit mechanisms. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2018;87(Pt A):33-47.
148. Valverde O, Smadja C, Roques BP, Maldonado R. The attenuation of morphine-conditioned place preference following chronic mild stress is reversed by a CCKB receptor antagonist. *Psychopharmacology (Berl)*. 1997;131(1):79-85.
149. Roger Sánchez C, García Pardo MP, Aguilar Calpe MA. Condicionamiento de preferencia de lugar: un modelo animal para evaluar las propiedades motivacionales de las drogas. *Escritos de Psicología (Internet)*. 2016;9:53-62.
150. Maldonado C, Rodriguez-Arias M, Castillo A, Aguilar MA, Minarro J. Gamma-hydroxybutyric acid affects the acquisition and reinstatement of cocaine-induced conditioned place preference in mice. *Behavioural pharmacology*. 2006;17(2):119-31.
151. Maldonado C, Rodriguez-Arias M, Castillo A, Aguilar MA, Minarro J. Effect of memantine and CNQX in the acquisition, expression and reinstatement of cocaine-induced conditioned place preference. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2007;31(4):932-9.
152. Rodriguez-Arias M, Montagud-Romero S, Rubio-Araiz A, Aguilar MA, Martin-Garcia E, Cabrera R, et al. Effects of repeated social defeat on adolescent mice on cocaine-induced CPP and self-administration in adulthood: integrity of the blood-brain barrier. *Addiction biology*. 2017;22(1):129-41.
153. Miczek KA, Thompson ML, Shuster L. Opioid-like analgesia in defeated mice. *Science*. 1982;215(4539):1520-2.
154. Guerrero-Bautista R, Do Couto BR, Hidalgo JM, Carceles-Moreno FJ, Molina G, Laorden ML, et al. Modulation of stress- and cocaine prime-induced reinstatement of conditioned place preference after memory extinction through dopamine D3 receptor. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2019;92:308-20.

155. Rodríguez-Arias M, Castillo A, Daza-Losada M, Aguilar MA, Minarro J. Effects of extended cocaine conditioning in the reinstatement of place preference. *Physiology & behavior*. 2009;96(4-5):620-30.
156. Martin F, Mora L, Laorden M, Milanés M. Protein kinase C phosphorylates the cAMP response element binding protein in the hypothalamic paraventricular nucleus during morphine withdrawal. *British journal of pharmacology*. 2011;163(4):857-75.
157. George Paxinos KBJF. The mouse brain in stereotaxic coordinates. New York, USA: Academic Press, Elsevier; 2008 3rd ed.
158. Leng A, Feldon J, Ferger B. Long-term social isolation and medial prefrontal cortex: dopaminergic and cholinergic neurotransmission. *Pharmacol Biochem Behav*. 2004;77(2):371-9.
159. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry*. 1985;150(1):76-85.
160. Paxinos KBJFG. The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates. Third Edition ed. Elsevier, editor. USA2008.
161. Tzschentke TM. Measuring reward with the conditioned place preference (CPP) paradigm: update of the last decade. *Addiction biology*. 2007;12(3-4):227-462.
162. Borowsky B, Kuhn CM. Chronic cocaine administration sensitizes behavioral but not neuroendocrine responses. *Brain Research*. 1991;543(2):301-6.
163. Baumann MH, Gendron TM, Becketts KM, Henningfield JE, Gorelick DA, Rothman RB. Effects of intravenous cocaine on plasma cortisol and prolactin in human cocaine abusers. *Biological psychiatry*. 1995;38(11):751-5.
164. Beaulieu JM, Sotnikova TD, Marion S, Lefkowitz RJ, Gainetdinov RR, Caron MG. An Akt/beta-arrestin 2/PP2A signaling complex mediates dopaminergic neurotransmission and behavior. *Cell*. 2005;122(2):261-73.
165. Volkow ND, Wise RA, Baler R. The dopamine motive system: implications for drug and food addiction. *Nature Reviews Neuroscience*. 2017;18(12):741-52.
166. Arguello AA, Richardson BD, Hall JL, Wang R, Hodges MA, Mitchell MP, et al. Role of a Lateral Orbital Frontal Cortex-Basolateral Amygdala Circuit in Cue-Induced Cocaine-Seeking Behavior. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*. 2017;42(3):727-35.
167. Belin D, Belin-Rauscent A, Murray JE, Everitt BJ. Addiction: failure of control over maladaptive incentive habits. *Current Opinion in Neurobiology*. 2013;23(4):564-72.

168. Chen Y-Y, Zhang L-B, Li Y, Meng S-Q, Gong Y-M, Lu L, et al. Post-retrieval Extinction Prevents Reconsolidation of Methamphetamine Memory Traces and Subsequent Reinstatement of Methamphetamine Seeking. *Front Mol Neurosci*. 2019;12:157-.
169. Edelmann E, Lessmann V. Dopaminergic innervation and modulation of hippocampal networks. *Cell and Tissue Research*. 2018;373(3):711-27.
170. García-Pérez D, Ferenczi S, Kovács KJ, Laorden ML, Milanés MV, Núñez C. Glucocorticoid Homeostasis in the Dentate Gyrus Is Essential for Opiate Withdrawal-Associated Memories. *Molecular Neurobiology*. 2017;54(8):6523-41.
171. García-Pérez D, Milanés MV. Role of glucocorticoids on noradrenergic and dopaminergic neurotransmission within the basolateral amygdala and dentate gyrus during morphine withdrawal place aversion. *Addiction biology*. 2020;25(2):e12728.
172. Valero E, Gómez-Milanés I, Almela P, Ribeiro Do Couto B, Laorden ML, Milanés MV, et al. The involvement of CRF1 receptor within the basolateral amygdala and dentate gyrus in the naloxone-induced conditioned place aversion in morphine-dependent mice. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*. 2018;84:102-14.
173. Rosen LG, Rushlow WJ, Laviolette SR. Opiate exposure state controls dopamine D3 receptor and cdk5/calcineurin signaling in the basolateral amygdala during reward and withdrawal aversion memory formation. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*. 2017;79:59-66.
174. Mortensen OV, Amara SG. Dynamic regulation of the dopamine transporter. *European journal of pharmacology*. 2003;479(1):159-70.
175. Torres GE. The dopamine transporter proteome. *Journal of neurochemistry*. 2006;97(s1):3-10.
176. Wang X, Luo Y-x, He Y-y, Li F-q, Shi H-s, Xue L-f, et al. Nucleus accumbens core mammalian target of rapamycin signaling pathway is critical for cue-induced reinstatement of cocaine seeking in rats. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2010;30(38):12632-41.
177. Parsons RG, Gafford GM, Helmstetter FJ. Translational control via the mammalian target of rapamycin pathway is critical for the formation and stability of long-term fear memory in amygdala neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2006;26(50):12977-83.
178. Stoica L, Zhu PJ, Huang W, Zhou H, Kozma SC, Costa-Mattioli M. Selective pharmacogenetic inhibition of mammalian target of Rapamycin complex I (mTORC1) blocks long-term synaptic plasticity and memory storage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2011;108(9):3791-6.
179. Goodman J, Packard MG. Memory Systems and the Addicted Brain. *Frontiers in psychiatry*. 2016;7:24.

180. Sharp BM. Basolateral amygdala and stress-induced hyperexcitability affect motivated behaviors and addiction. *Transl Psychiatry*. 2017;7(8):e1194-e.
181. Amaral DG, Scharfman HE, Lavenex P. The dentate gyrus: fundamental neuroanatomical organization (dentate gyrus for dummies). In: Scharfman HE, editor. *Progress in Brain Research*. 163: Elsevier; 2007. p. 3-790.
182. Pitchers KK, Phillips KB, Jones JL, Robinson TE, Sarter M. Diverse Roads to Relapse: A Discriminative Cue Signaling Cocaine Availability Is More Effective in Renewing Cocaine Seeking in Goal Trackers Than Sign Trackers and Depends on Basal Forebrain Cholinergic Activity. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2017;37(30):7198-208.
183. Berton O, McClung CA, DiLeone RJ, Krishnan V, Renthal W, Russo SJ, et al. Essential Role of BDNF in the Mesolimbic Dopamine Pathway in Social Defeat Stress. *Science*. 2006;311(5762):864-8.
184. Tidey JW, Miczek KA. Social defeat stress selectively alters mesocorticolimbic dopamine release: an in vivo microdialysis study. *Brain Research*. 1996;721(1):140-9.
185. Ashby CR, Jr., Rice OV, Heidbreder CA, Gardner EL. The selective dopamine D(3) receptor antagonist SB-277011A attenuates drug- or food-deprivation reactivation of expression of conditioned place preference for cocaine in male Sprague-Dawley rats. *Synapse*. 2015;69(6):336-44.
186. Gilbert JG, Newman AH, Gardner EL, Ashby CR, Jr., Heidbreder CA, Pak AC, et al. Acute administration of SB-277011A, NGB 2904, or BP 897 inhibits cocaine cue-induced reinstatement of drug-seeking behavior in rats: role of dopamine D3 receptors. *Synapse (New York, NY)*. 2005;57(1):17-28.
187. Heidbreder CA, Andreoli M, Marcon C, Hutcheson DM, Gardner EL, Ashby Jr CR. PRECLINICAL STUDY: Evidence for the role of dopamine D3 receptors in oral operant alcohol self-administration and reinstatement of alcohol-seeking behavior in mice. *Addiction biology*. 2007;12(1):35-50.
188. Vorel SR, Ashby CR, Jr., Paul M, Liu X, Hayes R, Hagan JJ, et al. Dopamine D3 receptor antagonism inhibits cocaine-seeking and cocaine-enhanced brain reward in rats. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2002;22(21):9595-603.
189. Diaz J, Pilon C, Le Foll B, Gros C, Triller A, Schwartz JC, et al. Dopamine D3 receptors expressed by all mesencephalic dopamine neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2000;20(23):8677-84.
190. Stanwood GD, Artymyshyn RP, Kung M-P, Kung HF, Lucki I, McGonigle P. Quantitative Autoradiographic Mapping of Rat Brain Dopamine D3 Binding with [¹²⁵I]7-OH-PIPAT: Evidence for the Presence of D3 Receptors on Dopaminergic and Nondopaminergic Cell Bodies and Terminals. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2000;295(3):1223-31.

191. Goddard B, Leri F. Reinstatement of conditioned reinforcing properties of cocaine-conditioned stimuli. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 2006;83(4):540-6.
192. Higley AE, Spiller K, Grundt P, Newman AH, Kiefer SW, Xi Z-X, et al. PG01037, a novel dopamine D3 receptor antagonist, inhibits the effects of methamphetamine in rats. *Journal of psychopharmacology (Oxford, England)*. 2011;25(2):263-73.
193. Xi Z-X, Gilbert JG, Pak AC, Ashby CR, Jr., Heidbreder CA, Gardner EL. Selective dopamine D3 receptor antagonism by SB-277011A attenuates cocaine reinforcement as assessed by progressive-ratio and variable-cost-variable-payoff fixed-ratio cocaine self-administration in rats. *The European journal of neuroscience*. 2005;21(12):3427-38.
194. Berro LF, Santos R, Hollais AW, Wuo-Silva R, Fukushiro DF, Mári-Kawamoto E, et al. Acute total sleep deprivation potentiates cocaine-induced hyperlocomotion in mice. *Neuroscience Letters*. 2014;579:130-3.
195. Le Foll B, Francès H, Diaz J, Schwartz J-C, Sokoloff P. Role of the dopamine D3 receptor in reactivity to cocaine-associated cues in mice. *European Journal of Neuroscience*. 2002;15(12):2016-26.
196. Nakajima S, Gerretsen P, Takeuchi H, Caravaggio F, Chow T, Le Foll B, et al. The potential role of dopamine D3 receptor neurotransmission in cognition. *European Neuropsychopharmacology*. 2013;23(8):799-813.
197. Gross G, Wicke K, Drescher KU. Dopamine D3 receptor antagonism—still a therapeutic option for the treatment of schizophrenia. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*. 2013;386(2):155-66.
198. Heidbreder C. Novel pharmacotherapeutic targets for the management of drug addiction. *European journal of pharmacology*. 2005;526(1):101-12.
199. Reavill C, Taylor SG, Wood MD, Ashmeade T, Austin NE, Avenell KY, et al. Pharmacological Actions of a Novel, High-Affinity, and Selective Human Dopamine D₃ Receptor Antagonist, SB-277011-A. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2000;294(3):1154-65.
200. Shinohara F, Asaoka Y, Kamii H, Minami M, Kaneda K. Stress augments the rewarding memory of cocaine via the activation of brainstem-reward circuitry. *Addiction biology*. 2019;24(3):509-21.
201. Kalivas PW, McFarland K. Brain circuitry and the reinstatement of cocaine-seeking behavior. *Psychopharmacology*. 2003;168(1):44-56.
202. Conrad KL, Ford K, Marinelli M, Wolf ME. Dopamine receptor expression and distribution dynamically change in the rat nucleus accumbens after withdrawal from cocaine self-administration. *Neuroscience*. 2010;169(1):182-94.

203. Neisewander JL, Fuchs RA, Tran-Nguyen LTL, Weber SM, Coffey GP, Joyce JN. Increases in Dopamine D3 Receptor Binding in Rats Receiving a Cocaine Challenge at Various Time Points after Cocaine Self-Administration: Implications for Cocaine-Seeking Behavior. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*. 2004;29(8):1479-87.
204. Xi ZX, Li X, Li J, Peng XQ, Song R, Gaal J, et al. Blockade of dopamine D3 receptors in the nucleus accumbens and central amygdala inhibits incubation of cocaine craving in rats. *Addiction biology*. 2013;18(4):665-77.
205. Xi Z-X, Newman AH, Gilbert JG, Pak AC, Peng X-Q, Ashby CR, et al. The Novel Dopamine D3 Receptor Antagonist NGB 2904 Inhibits Cocaine's Rewarding Effects and Cocaine-Induced Reinstatement of Drug-Seeking Behavior in Rats. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*. 2006;31(7):1393-405.
206. Ritz M, Lamb R, Goldberg, Kuhar M. Cocaine receptors on dopamine transporters are related to self-administration of cocaine. *Science*. 1987;237(4819):1219-23.
207. McFarland K, Davidge SB, Lapish CC, Kalivas PW. Limbic and motor circuitry underlying footshock-induced reinstatement of cocaine-seeking behavior. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2004;24(7):1551-60.
208. Koob GF, Buck CL, Cohen A, Edwards S, Park PE, Schlosburg JE, et al. Addiction as a stress surfeit disorder. *Neuropharmacology*. 2014;76 Pt B(0 0):370-82.
209. Volkow ND, Baler RD, Goldstein RZ. Addiction: pulling at the neural threads of social behaviors. *Neuron*. 2011;69(4):599-602.
210. Barrot M, Abrous DN, Marinelli M, Rougé-Pont F, Le Moal M, Piazza PV. Influence of glucocorticoids on dopaminergic transmission in the rat dorsolateral striatum. *European Journal of Neuroscience*. 2001;13(4):812-8.
211. George O, Koob GF. Individual differences in prefrontal cortex function and the transition from drug use to drug dependence. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. 2010;35(2):232-47.
212. Erb S, Shaham Y, Stewart J. The role of corticotropin-releasing factor and corticosterone in stress- and cocaine-induced relapse to cocaine seeking in rats. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 1998;18(14):5529-36.
213. Mantsch JR, Goeders NE. Ketoconazole Does Not Block Cocaine Discrimination or the Cocaine-Induced Reinstatement of Cocaine-Seeking Behavior. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 1999;64(1):65-73.

214. Barik J, Marti F, Morel C, Fernandez SP, Lanteri C, Godeheu G, et al. Chronic Stress Triggers Social Aversion via Glucocorticoid Receptor in Dopaminergic Neurons. *Science*. 2013;339(6117):332-5.
215. Wise RA. Neurobiology of addiction. *Current Opinion in Neurobiology*. 1996;6(2):243-51.
216. Day JJ, Carelli RM. The nucleus accumbens and Pavlovian reward learning. *The Neuroscientist : a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry*. 2007;13(2):148-59.
217. McGinnis MM, Siciliano CA, Jones SR. Dopamine D3 autoreceptor inhibition enhances cocaine potency at the dopamine transporter. *Journal of neurochemistry*. 2016;138(6):821-9.
218. Siciliano CA, Fordahl SC, Jones SR. Cocaine Self-Administration Produces Long-Lasting Alterations in Dopamine Transporter Responses to Cocaine. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2016;36(30):7807-16.
219. Sinha R, Fuse T, Aubin LR, O'Malley SS. Psychological stress, drug-related cues and cocaine craving. *Psychopharmacology*. 2000;152(2):140-8.
220. Wemm SE, Sinha R. Drug-induced stress responses and addiction risk and relapse. *Neurobiology of stress*. 2019;10:100148-.
221. Kristensen AS, Andersen J, Jørgensen TN, Sørensen L, Eriksen J, Loland CJ, et al. SLC6 Neurotransmitter Transporters: Structure, Function, and Regulation. *Pharmacological reviews*. 2011;63(3):585-640.
222. Urban NBL, Martinez D. Neurobiology of Addiction: Insight from Neurochemical Imaging. *Psychiatric Clinics of North America*. 2012;35(2):521-41.
223. Schmitt KC, Reith MEA. Regulation of the dopamine transporter. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2010;1187(1):316-40.
224. Daws LC, Callaghan PD, Morón JA, Kahlig KM, Shippenberg TS, Javitch JA, et al. Cocaine Increases Dopamine Uptake and Cell Surface Expression of Dopamine Transporters. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2002;290(5):1545-50.
225. Gorentla BK, Vaughan RA. Differential effects of dopamine and psychoactive drugs on dopamine transporter phosphorylation and regulation. *Neuropharmacology*. 2005;49(6):759-68.
226. Twining RC, Wheeler DS, Ebben AL, Jacobsen AJ, Robble MA, Mantsch JR, et al. Aversive stimuli drive drug seeking in a state of low dopamine tone. *Biological psychiatry*. 2015;77(10):895-902.

227. Koob GF, Schulkin J. Addiction and stress: An allostatic view. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. 2019;106:245-62.
228. Volkow ND, Fowler JS, Wang GJ, Baler R, Telang F. Imaging dopamine's role in drug abuse and addiction. *Neuropharmacology*. 2009;56 Suppl 1(Suppl 1):3-8.
229. Martinez D, Narendran R, Foltin RW, Slifstein M, Hwang D-R, Broft A, et al. Amphetamine-Induced Dopamine Release: Markedly Blunted in Cocaine Dependence and Predictive of the Choice to Self-Administer Cocaine. *American Journal of Psychiatry*. 2007;164(4):622-9.
230. Quinn R. Comparing rat's to human's age: How old is my rat in people years? *Nutrition*. 2005;21(6):775-7.
231. Schwartz J-C, Diaz J, Bordet R, Griffon N, Perachon S, Pilon C, et al. Functional implications of multiple dopamine receptor subtypes: the D1/D3 receptor coexistence. Published on the World Wide Web on 24 November 1997.1. *Brain Research Reviews*. 1998;26(2):236-42.
232. Solinas M, Belujon P, Fernagut PO, Jaber M, Thiriet N. Dopamine and addiction: what have we learned from 40 years of research. *Journal of Neural Transmission*. 2019;126(4):481-516.
233. Khaled MATM, Pushparaj A, Di Ciano P, Diaz J, Le Foll B. Dopamine D3 receptors in the basolateral amygdala and the lateral habenula modulate cue-induced reinstatement of nicotine seeking. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*. 2014;39(13):3049-58.
234. Staley JK, Mash DC. Adaptive increase in D3 dopamine receptors in the brain reward circuits of human cocaine fatalities. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 1996;16(19):6100-6.
235. Spangler R, Goddard NL, Avena NM, Hoebel BG, Leibowitz SF. Elevated D3 dopamine receptor mRNA in dopaminergic and dopaminoceptive regions of the rat brain in response to morphine. *Molecular Brain Research*. 2003;111(1):74-83.
236. Sadat-Shirazi M-S, Zarrindast M-R, Daneshparvar H, Ziaie A, Fekri M, Abbasnezhad E, et al. Alteration of dopamine receptors subtypes in the brain of opioid abusers: A postmortem study in Iran. *Neuroscience Letters*. 2018;687:169-76.
237. Chen P-C, Lao C-L, Chen J-C. The D3 dopamine receptor inhibits dopamine release in PC-12/hD3 cells by autoreceptor signaling via PP-2B, CK1, and Cdk-5. *Journal of neurochemistry*. 2009;110(4):1180-90.
238. Grace AA. The tonic/phasic model of dopamine system regulation and its implications for understanding alcohol and psychostimulant craving. *Addiction*. 2000;95(8s2):119-28.

239. Leriche L, Bezard E, Gross C, Guillin O, Foll BL, Diaz J, et al. The Dopamine D3 Receptor: A Therapeutic Target for the Treatment of Neuropsychiatric Disorders. *CNS & Neurological Disorders - Drug Targets*. 2006;5(1):25-43.
240. García-Pérez D, Sáez-Belmonte F, Laorden ML, Núñez C, Milanés MV. Morphine administration modulates expression of Argonaute 2 and dopamine-related transcription factors involved in midbrain dopaminergic neurons function. *British journal of pharmacology*. 2013;168(8):1889-901.
241. Nygard SK, Hourgquettes NJ, Sobczak GG, Carlezon WA, Bruchas MR. Stress-Induced Reinstatement of Nicotine Preference Requires Dynorphin/Kappa Opioid Activity in the Basolateral Amygdala. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2016;36(38):9937-48.
242. Izenwasser S. The role of the dopamine transporter in cocaine abuse. *Neurotoxicity Research*. 2004;6(5):379-83.
243. Zapata A, Kivell B, Han Y, Javitch JA, Bolan EA, Kuraguntla D, et al. Regulation of dopamine transporter function and cell surface expression by D3 dopamine receptors. *The Journal of biological chemistry*. 2007;282(49):35842-54.
244. Zapata A, Shippenberg TS. D3 receptor ligands modulate extracellular dopamine clearance in the nucleus accumbens. *Journal of neurochemistry*. 2002;81(5):1035-42.
245. Castro-Hernández J, Afonso-Oramas D, Cruz-Muros I, Salas-Hernández J, Barroso-Chinea P, Moratalla R, et al. Prolonged treatment with pramipexole promotes physical interaction of striatal dopamine D3 autoreceptors with dopamine transporters to reduce dopamine uptake. *Neurobiology of Disease*. 2015;74:325-35.
246. Holly EN, DeBold JF, Miczek KA. Increased mesocorticolimbic dopamine during acute and repeated social defeat stress: modulation by corticotropin releasing factor receptors in the ventral tegmental area. *Psychopharmacology (Berl)*. 2015;232(24):4469-79.
247. Tzeng WY, Chuang JY, Lin LC, Cherng CG, Lin KY, Chen LH, et al. Companions reverse stressor-induced decreases in neurogenesis and cocaine conditioning possibly by restoring BDNF and NGF levels in dentate gyrus. *Psychoneuroendocrinology*. 2013;38(3):425-37.
248. Ebrahimian F, Naghavi FS, Yazdi F, Sadeghzadeh F, Taslimi Z, Haghparast A. Differential roles of orexin receptors within the dentate gyrus in stress- and drug priming-induced reinstatement of conditioned place preference in rats. *Behavioral neuroscience*. 2016;130(1):91-102.
249. Pourhamzeh M, Mozafari R, Jamali S, Motamedi F, Ahadi R, Haghparast A. Involvement of orexin receptors within the hippocampal dentate gyrus in morphine-induced reinstatement in food-deprived rats. *Behavioural brain research*. 2019;375:112155.

250. Khakpour-Taleghani B, Reisi Z, Haghparast A. The Blockade of D1/D2-Like Dopamine Receptors within the Dentate Gyrus of Hippocampus Decreased the Reinstatement of Morphine-Extinguished Conditioned Place Preference in Rats. *Basic and clinical neuroscience*. 2015;6(2):73-82.
251. Norozpour Y, Zarrabian S, Rezaee L, Haghparast A. D1- and D2-like receptors in the dentate gyrus region of the hippocampus are involved in the reinstatement induced by a subthreshold dose of morphine and forced swim stress in extinguished morphine-CPP in rats. 2019;133(6):545-55.
252. Hainmueller T, Bartos M. Dentate gyrus circuits for encoding, retrieval and discrimination of episodic memories. 2020;21(3):153-68.
253. Neasta J, Barak S, Hamida SB, Ron D. mTOR complex 1: a key player in neuroadaptations induced by drugs of abuse. *Journal of neurochemistry*. 2014;130(2):172-84.
254. Costa-Mattioli M, Sossin WS, Klann E, Sonenberg N. Translational control of long-lasting synaptic plasticity and memory. *Neuron*. 2009;61(1):10-26.
255. Chiamulera C, di Chio M, Cavalleri L, Venniro M, Padovani L, Collo G. Ketamine effects on mammalian target of rapamycin signaling in the mouse limbic system depend on functional dopamine D3 receptors. *Neuroreport*. 2018;29(8):615-20.
256. Barroso-Chinea P, Luis-Ravelo D, Fumagallo-Reading F, Castro-Hernandez J, Salas-Hernandez J, Rodriguez-Nuñez J, et al. DRD3 (dopamine receptor D3) but not DRD2 activates autophagy through MTORC1 inhibition preserving protein synthesis. *Autophagy*. 2019:1-17.
257. Puighermanal E, Busquets-Garcia A, Gomis-González M, Marsicano G, Maldonado R, Ozaita A. Dissociation of the pharmacological effects of THC by mTOR blockade. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*. 2013;38(7):1334-43.
258. Puighermanal E, Marsicano G, Busquets-Garcia A, Lutz B, Maldonado R, Ozaita A. Cannabinoid modulation of hippocampal long-term memory is mediated by mTOR signaling. *Nature neuroscience*. 2009;12(9):1152-8.
259. Neasta J, Ben Hamida S, Yowell Q, Carnicella S, Ron D. Role for mammalian target of rapamycin complex 1 signaling in neuroadaptations underlying alcohol-related disorders. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010;107(46):20093-8.
260. Collo G, Bono F, Cavalleri L, Plebani L, Mitola S, Merlo Pich E, et al. Nicotine-induced structural plasticity in mesencephalic dopaminergic neurons is mediated by dopamine D3 receptors and Akt-mTORC1 signaling. *Mol Pharmacol*. 2013;83(6):1176-89.
261. Gonçalves J, Baptista S, Olesen MV, Fontes-Ribeiro C, Malva JO, Woldbye DP, et al. Methamphetamine-induced changes in the mice hippocampal neuropeptide Y

- system: implications for memory impairment. *Journal of neurochemistry*. 2012;123(6):1041-53.
262. Ben Hamida S, Laguesse S. Mammalian target of rapamycin complex 1 and its downstream effector collapsin response mediator protein-2 drive reinstatement of alcohol reward seeking. 2019;24(5):908-20.
263. Ucha M, Coria SM, Núñez AE, Santos-Toscano R, Roura-Martínez D, Fernández-Ruiz J, et al. Morphine self-administration alters the expression of translational machinery genes in the amygdala of male Lewis rats. *J Psychopharmacol*. 2019;33(7):882-93.
264. Cui Y, Zhang XQ, Cui Y, Xin WJ, Jing J, Liu XG. Activation of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-mammalian target of Rapamycin signaling pathway in the hippocampus is essential for the acquisition of morphine-induced place preference in rats. *Neuroscience*. 2010;171(1):134-43.
265. Dayas CV, Smith DW, Dunkley PR. An emerging role for the Mammalian target of rapamycin in "pathological" protein translation: relevance to cocaine addiction. *Frontiers in pharmacology*. 2012;3:13.
266. de Quervain D, Schwabe L, Roozendaal B. Stress, glucocorticoids and memory: implications for treating fear-related disorders. *Nature reviews Neuroscience*. 2017;18(1):7-19.
267. Li C, Zhang J, Xu H, Chang M, Lv C, Xue W, et al. Retigabine ameliorates acute stress-induced impairment of spatial memory retrieval through regulating USP2 signaling pathways in hippocampal CA1 area. *Neuropharmacology*. 2018;135:151-62.
268. Chandran A, Iyo AH, Jernigan CS, Legutko B, Austin MC, Karolewicz B. Reduced phosphorylation of the mTOR signaling pathway components in the amygdala of rats exposed to chronic stress. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2013;40:240-5.
269. Deli A, Schipany K, Rosner M, Höger H, Pollak A, Li L, et al. Blocking mTORC1 activity by rapamycin leads to impairment of spatial memory retrieval but not acquisition in C57BL/6J mice. *Behavioural brain research*. 2012;229(2):320-4.
270. Gafford GM, Parsons RG, Helmstetter FJ. Consolidation and reconsolidation of contextual fear memory requires mammalian target of rapamycin-dependent translation in the dorsal hippocampus. *Neuroscience*. 2011;182:98-104.
271. Al-Ali H, Ding Y, Slepak T, Wu W, Sun Y, Martinez Y, et al. The mTOR Substrate S6 Kinase 1 (S6K1) Is a Negative Regulator of Axon Regeneration and a Potential Drug Target for Central Nervous System Injury. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2017;37(30):7079-95.
272. Sun J, Liu Y, Tran J, O'Neal P, Baudry M, Bi X. mTORC1-S6K1 inhibition or mTORC2 activation improves hippocampal synaptic plasticity and learning in

Angelman syndrome mice. Cellular and molecular life sciences : CMLS.
2016;73(22):4303-14.