Universidad de la República Oriental del Uruguay

Facultad de Ciencias

Tesina de Graduación

EVALUACIÓN DE LA ANSIEDAD EN ANIMALES LUEGO DE LA ADMINISTRACIÓN REPETIDA DE LOS COMPONENTES ACTIVOS DE LA PASTA BASE DE COCAÍNA Y UN PERÍODO DE ABSTINENCIA. EFECTO DE CLOZAPINA.

José Pedro Prieto

Licenciatura en Ciencias Biológicas

Orientadora: **Dra. Cecilia Scorza**

Laboratorio de Biología Celular

Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable

AGRADECIMIENTOS

A Cecilia Scorza por darme la oportunidad de dedicarme a este tipo de cosas y motivarme a desarrollar mi vocación.

A todos los integrantes del Laboratorio de Biología Celular del IIBCE, María Noel Meikle, Ximena López-Hill, Jessika Urbanavicius, Martín Galvalisi, Paola Bianchimano, Analía Richeri, Gaby Martínez, Patricia Silveira y Mónica Brauer por todo lo enseñado y compartido, por toda su ayuda e increíble apoyo.

A Héctor Rodríguez, Martín Olivo y Carmen Pérez, por su buena disposición y cuidado de los animales.

A los amigos, por escucharme hablando de estos temas, y también por callarme cuando hablo de estos temas.

A la familia por su apoyo y aliento incondicional.

A Mariana, por estar presente todos los días, por apoyarme de mil formas distintas y por darle a todo un poco más de sentido.

Si se puede sacar algo en claro de este trabajo, es que soy una persona con mucha suerte por poder trabajar y contar con estas personas. Gracias.

ÍNDICE

Resumen.....1
1. Introducción.....2
1.1. Pasta Base de Cocaína: definición y etapas de consumo.....2
1.2. Antecedentes de trabajo.....3
Contenido químico y efecto farmacológico agudo de PBC.....3
Neurobiología de acción de drogas de abuso: circuito de recompensa.....5
Mecanismo de acción de cocaína y cafeína.....6
Tratamiento crónico y abstinencia en drogas de abuso.....7
1.3. Ansiedad en abstinencia y tratamiento anti-*craving*.....7
1.4. Hipótesis de trabajo.....9
1.5. Objetivo General.....9
1.6. Objetivos Específicos.....9
2. Materiales y Métodos.....10
2.1. Animales.....10
2.2. Drogas y dosis.....10
2.3. Modelos Experimentales.....10
2.4. Protocolo Experimental.....12
3. Resultados.....14
3.1. Determinación del efecto del tratamiento repetido de cocaína y cafeína y DOS DÍAS de abstinencia sobre la ansiedad en animales de experimentación.....14
3.2. Determinación del efecto del tratamiento repetido de cocaína y cafeína y SIETE DÍAS de abstinencia sobre la ansiedad en animales de experimentación.....17
3.3. Comparación del efecto del tratamiento repetido de cocaína y cafeína con dos y siete días de abstinencia sobre la ansiedad en animales de experimentación.....19
3.4. Evaluación de la Clozapina como bloqueante del aumento de la ansiedad inducido luego del tratamiento repetido de cocaína y cafeína y un periodo de abstinencia.....22
4. Discusión.....26
4.1. Determinación del efecto del tratamiento repetido de cocaína y cafeína y dos días de abstinencia sobre la ansiedad en animales de experimentación.....26
4.2. Determinación del efecto del tratamiento repetido de cocaína y cafeína y siete días de abstinencia sobre la ansiedad en animales de experimentación.....27

4.3. Comparación del efecto del tratamiento repetido de cocaína y cafeína con dos y siete días de abstinencia sobre la ansiedad en animales de experimentación.....28
4.4. Evaluación de la Clozapina como bloqueante del aumento de la ansiedad inducido luego del tratamiento repetido de cocaína y cafeína y un periodo de abstinencia.....29
5. Conclusiones.....31
6. Perspectivas.....31
7. Referencias.....32

RESUMEN

En humanos así como en animales de experimentación, el consumo o administración repetida de cocaína sumado a un período de abstinencia genera un aumento en la ansiedad representando un riesgo para el aumento de la búsqueda de droga (*craving)* y la consiguiente recaída en el consumo de la misma. A su vez, se ha demostrado que los antipsicóticos atípicos, entre ellos, Clozapina, reducen el *craving* a cocaína e inducen un efecto ansiolítico. Sin embargo, hasta el momento no se había estudiado la incidencia de la administración repetida de la droga de abuso Pasta Base de Cocaína (PBC) y su abstinencia sobre la ansiedad experimental. Evidencias pre-clínicas de nuestro laboratorio demostraron que los componentes activos de una muestra de PBC, la PBC 7, responsables del efecto estimulante inducido fueron la cocaína (base) y la cafeína (adulterante).

El trabajo de pasantía se basó en el estudio del efecto sobre la ansiedad experimental en ratas sometidas a un tratamiento repetido de la co-administración de los componentes activos de la muestra de PBC 7, cocaína y cafeína, con distintos tiempos de abstinencia. También se evaluó el potencial anti-*craving* de Clz. El modelo de Laberinto en Cruz Elevado se utilizó para evaluar la ansiedad experimental mientras que el modelo de Campo Abierto se utilizó para evaluar cambios en la actividad motora. Teniendo en cuenta la composición química de la PBC 7, se co-administró intraperitonealmente una solución combinada de cocaína y cafeína a las dosis de 5 y 2.5 mg/kg, respectivamente. Se evaluaron períodos de dos y siete días de abstinencia.

Los resultados mostraron que el tratamiento repetido de la co-administración de cocaína y cafeína y dos días de abstinencia generó un efecto ansiolítico en los animales, mientras que siete días de abstinencia tendió a revertir dicho efecto y parece inducir un efecto ansiogénico. Clozapina tendió a reducir el aumento de la ansiedad observado luego del tratamiento repetido con la droga y siete días de abstinencia. Estos resultados están de acuerdo a lo descrito para cocaína, y sugieren que largos períodos de abstinencia podrían colaborar en la recaída al consumo de PBC. Este trabajo aporta datos nuevos y relevantes en la caracterización de los efectos de la PBC sobre el Sistema Nervioso Central, así como información útil para la consideración de posibles terapias anti-*craving.*

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Pasta Base de Cocaína: definición y etapas de consumo

Desde hace varias décadas el consumo de PBC constituye un serio problema de salud pública en varios países de Latinoamérica (Jeri, 1984). Si bien existen registros de la presencia de PBC en Uruguay desde el año 2000, su consumo masivo se extiende a partir del año 2002, favorecido por la crisis económica y la ausencia de otras drogas como la cocaína y marihuana en el período 2002-2004 (Junta Nacional de Drogas, 2007). Su rápida instauración en el mercado de drogas generó un gran impacto en la salud pública, constituyendo un serio problema social y sanitario en nuestro país. Los actores involucrados en la asistencia a personas con consumos problemáticos de drogas se vieron enfrentados a una nueva situación de diagnóstico y a nuevos síntomas clínicos inducidos por la PBC.

La PBC se define como uno de los primeros productos intermedios en el proceso de extracción y purificación del alcaloide cocaína a partir de las hojas del arbusto *Eritroxilum coca,* hasta la obtención del clorhidrato de cocaína (CC) (Castaño, 2000; Meikle y cols., 2009). Es un polvo grisáceo/amarillento, de consistencia pastosa y olor penetrante. Su elaboración consiste en la disolución de hojas de coca machacadas en agua y el tratamiento de esta solución con kerosene o gasoil, ácido sulfúrico y amoníaco (Figura 1) (Castaño, 2000; Llosa, 1994).

Figura 1. Esquema del proceso de elaboración de Pasta Base de Cocaína y Clorhidrato de Cocaína

La PBC es una forma fumable de cocaína y una vez fumada, alcanza el Sistema Nervioso Central (SNC) en pocos segundos. Su consumo produce una etapa inicial de euforia e hiperexitabilidad, disminución de la fatiga, reducción del sueño e inhibición del apetito, seguida rápidamente por una etapa de disforia caracterizada por la angustia, ansiedad, indiferencia sexual y un deseo incontrolable de volver a consumir (*craving* o búsqueda). En la mayoría de los casos esto lleva a una etapa de consumo ininterrumpido para evitar el malestar de la etapa de disforia. A su vez, cuando la PBC se consume en forma crónica produce un perfil clínico característico de un

alto grado de dependencia con graves alteraciones fisiológicas y conductuales tales como anorexia, conductas antisociales, psicosis, alucinaciones y conductas altamente vinculadas con violencia y agresividad (Junta Nacional de Drogas, 2008; Pascale y cols., 2010; Pérez, 2003).

Existen evidencias que demuestran que la vía de administración es uno de los factores fundamentales que determina que el efecto psicoactivo de una droga de abuso sea rápido, intenso y con un alto poder adictivo (Castaño, 2000; Samaha y Robinson, 2005). En este sentido se piensa que el perfil clínico observado en los consumidores de PBC se explicaría principalmente por la vía de administración. Sin embargo, otras características propias de la droga, como su contenido químico, también deben considerarse.

1.2. Antecedentes de trabajo

El desconocimiento del mecanismo de acción de la PBC a nivel del SNC generó la necesidad de contar con información sobre la naturaleza de los efectos físicos y psíquicos inducidos por la droga. En este contexto, el Laboratorio de Biología Celular del Instituto Clemente Estable comienza una línea de investigación que tiene como objetivo general el estudio pre-clínico de los efectos neurobiológicos de la PBC, utilizando diferentes aproximaciones experimentales. El desarrollo de esta línea de investigación ha permitido la realización de aportes significativos a la caracterización de los efectos de la PBC en el SNC (López-Hill y cols., 2011; Meikle y cols., 2009). Este trabajo de pasantía se realizó en el marco de dicha línea de investigación.

Contenido químico y efecto farmacológico agudo de PBC

El análisis químico de siete muestras de PBC (PBC 1-7) provenientes de incautaciones policiales realizadas en Montevideo reflejó un contenido químico variable (López-Hill y cols., 2011; Moraes y cols., 2010). De acuerdo a lo esperado, la cocaína fue el alcaloide principal encontrado en las muestras de PBC. Su contenido varía entre un 20 y 70 % dependiendo de la incautación estudiada. Otros compuestos relacionados con el metabolismo de la cocaína (impurezas, definidas como sustancias presentes en la droga como resultado natural del proceso de elaboración) tales como la ecgonina, trans-cinamol ecgonina y cis-cinamoil ecgonina aparecen en muy baja proporción (0.1-4%).

Por otro lado, las drogas de abuso ilegales suelen venderse adulteradas, entendiéndose por adulterantes sustancias añadidas deliberadamente para aumentar el volumen (adulterantes inactivos) e imitar o potenciar el efecto de la droga (adulterantes activos) (Moraes y cols., 2010). La lidocaína y anfetamina constituyen adulterantes muy comunes en drogas ilegales

como la cocaína (Barat y Abdel-Rahman, 1998; Cole y cols., 2010; Fucci y De Giovanni, 1998), sin embargo no se detectó la presencia de ninguna de ellas en las muestras de PBC analizadas. El único adulterante activo reconocido hasta el momento fue la cafeína, variando su contenido entre 1 y 15 % (López-Hill y cols., 2011; Meikle y cols., 2009; Moraes y cols., 2010). La cafeína es muy utilizada como adulterante en distintas drogas de abuso ilícitas, principalmente por su carácter legal (lo que la hace fácil de adquirir), su bajo costo y acción estimulante (Cole y cols., 2010). De manera interesante, estudios pre-clínicos demostraron que la administración de cafeína aumenta la hiperactividad locomotora inducida por cocaína, y que la combinación de ambas drogas a bajas dosis es capaz de inducir condicionamiento de preferencia de lugar (modelo comportamental utilizado para evaluar el efecto reforzador de las drogas de abuso) (Bedingfield y cols., 1998; Misra y cols., 1986). Estas observaciones sugieren la existencia de un efecto aditivo entre la cocaína y cafeína.

Interesados en evaluar la influencia de la presencia de cafeína en el efecto estimulante inducido por PBC, se realizaron estudios conductuales con la muestra PBC 7. Dicha muestra demostró un contenido de cocaína y cafeína de 20 y 10 % respectivamente. El estudio de su efecto estimulante en animales de experimentación demostró que su administración sistémica aguda, inyectada a una dosis equivalente de cocaína base de 5 mg/kg, indujo un aumento significativo en la actividad locomotora comparado con el grupo control (López-Hill y cols., 2011). Esta hiperactividad locomotora fue aún mayor que la observada en animales inyectados con cocaína a la dosis de 5 mg/kg, indicando que además de la cocaína base, otros compuestos participaban del efecto estimulante de la PBC 7. Así, la co-administración de cocaína y cafeína, inyectados a las dosis equivalentes al contenido de las mismas en la PBC 7 (5 y 2.5 mg/kg, respectivamente), reprodujo el efecto hiperlocomotor observado por PBC 7 (López-Hill y cols., 2011). Estos resultados demostraron que el contenido en cocaína y cafeína fueron los principales responsables de la acción estimulante de PBC 7. Las impurezas presentes en esta muestra no parecen colaborar en el efecto comportamental observado.

Adicionalmente, estos resultados permitieron evidenciar que la co-administración de cocaína y cafeína a las dosis seleccionadas constituye un sustituto válido para estudiar otros aspectos comportamentales inducidos por PBC 7. Es importante aclarar que esta estrategia no puede ser utilizada para imitar la totalidad de las muestras de PBC a estudiar, ya que no todas poseen el mismo porcentaje de cocaína, no todas poseen cafeína como adulterante, y pueden contener otras sustancias psicoactivas (López-Hill y cols., 2011; Moraes y cols., 2010).

Neurobiología de acción de drogas de abuso: circuito de recompensa.

Las bases neurobiológicas del efecto reforzador de las drogas de abuso incluyen a las regiones y sistemas que integran el circuito motivacional o de recompensa (Kalivas y Volkow, 2005; Koob y Volkow, 2010). Este circuito participa en la mediación del efecto motivacional y reforzador de estímulos placenteros tales como la búsqueda de alimento o pareja sexual (Kalivas y Volkow, 2005). En particular, el sistema dopaminérgico (DAérgico) mesocorticolímbico (Figura 2), posee un papel clave en el efecto reforzador de las drogas de abuso. Este sistema está formado por neuronas dopaminérgicas cuyos somas están ubicados en el Área Tegmental Ventral (ATV) y sus axones se extienden hasta el Núcleo Accumbens (NAcc), la Corteza Prefrontal (CPF) y la Amígdala (Cleck y Blendy, 2008; Koob y Volkow, 2010). Todos los psicoestimulantes, como la cocaína, cafeína, anfetamina y opiáceos entre otros, luego de su administración aguda, aumentan la transmisión DAérgica en el NAcc (Carboni y cols., 1989; Koob y Le Moal, 2006; Robinson y Berridge, 1993).

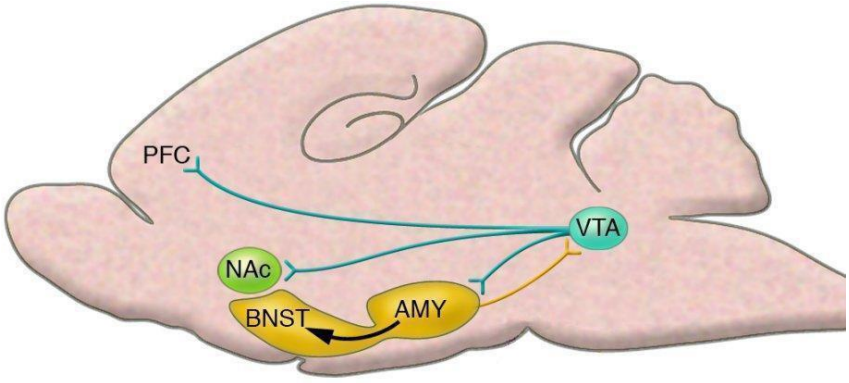

Figura 2. Esquema del circuito de recompensa y estrés/ansiedad en un corte sagital de cerebro de rata. El circuito DAérgico mesocorticolímbico (en azul) está compuesto por neuronas DAérgicas en el Área Tegmental Ventral (VTA) que proyectan hacia el Núcleo Accumbens (NAc), la Corteza Pre-Frontal (PFC) y la Amígdala (AMY). El circuito central del Factor Liberador de Corticotropina (amarillo) está compuesto por neuronas en la AMY que proyectan hacia el VTA y el Lecho del Núcleo de la Stria Terminalis (BNST), el cual forma parte de la AMY extendida. Tomado y modificado de Cleck y Blendy, 2008.

El NAcc recibe a su vez inervación excitatoria desde la CPF y la Amígdala (Kalivas y Volkow, 2005; Sesack y Grace, 2010). La activación cortical del NAcc se cree que está relacionada con la desinhibición de un plan motor apropiado y dirigido hacia la adquisición de recompensa (Sesack y Grace, 2010). Por otro lado, la Amígdala constituye una estructura crítica en la determinación del valor motivacional y afectivo de un estímulo asociado a un evento relevante

(Cleck y Blendy, 2008; Koob y Volkow, 2010). Su conexión con el NAcc puede estar relacionada con la saliencia o importancia motivacional otorgada a un evento asociado con la recompensa, como puede ser la presencia o ausencia de la droga (Cleck y Blendy, 2008; Kalivas y Volkow, 2005). A su vez, la Amígdala interactúa con el ATV mediante la liberación del factor liberador de corticotropina (CRF, por su sigla en inglés), polipéptido relacionado con el estrés y la ansiedad (Figura 2) (Cleck y Blendy, 2008).

Además de inervar el NAcc, la CPF y la Amígdala se encuentran interconectadas mediante proyecciones glutamatérgicas (Kalivas y Volkow, 2005). Por lo tanto, estas tres estructuras están integradas funcionalmente. Es así que el NAcc constituye una región privilegiada para actuar como interfaz integrativa entre la información motivacional de las regiones límbicas y el control motor de la CPF, y regular la salida comportamental dirigida a una meta.

Mecanismo de acción de cocaína y cafeína

La cocaína bloquea el transportador de monoaminas en las terminales sinápticas, lo que inhibe la recaptación de DA. Esto resulta en un aumento de la disponibilidad del neurotransmisor en la hendidura sináptica, lo que implica un aumento en la actividad DAérgica en las principales áreas del sistema DAérgico mesocorticolímbico (Fernández-Espejo, 2006; Koob y Le Moal, 2006; Lizasoain y cols., 2002). La cafeína en cambio, actúa bloqueando de forma competitiva los receptores de adenosina A_1 y A_{2A} (Fredholm y cols., 1999). La adenosina endógena constituye un regulador importante de la transmisión DAérgica. A nivel pre-sináptico, la unión de adenosina a su receptor inhibe la liberación de DA, mientras que a nivel post-sináptico la misma disminuye la neurotransmisión DAérgica mediante interacciones antagónicas entre los receptores de adenosina y DA (Fredholm y cols., 1999; Solinas y cols., 2002; Yacoubi y cols., 2000a). Por lo tanto, al bloquear los receptores de adenosina, la cafeína estimula la liberación de DA (evitando su inhibición) y potencia los efectos de la estimulación de los receptores de DA. Ambos mecanismos farmacológicos producen un mismo efecto neuroquímico y comportamental, explicando la acción aditiva entre cocaína y cafeína (Fisone y cols., 2004).

Como era de esperar, el efecto estimulante inducido por la administración aguda de PBC se correlacionó con un aumento en los niveles tisulares de DA en el NAcc (Meikle y cols., 2009), efecto que refleja un aumento en la actividad del sistema mesolímbico debido al mecanismo de acción de sus componentes principales (cocaína y cafeína).

Tratamiento crónico y abstinencia en drogas de abuso

En animales de experimentación, la administración repetida de una droga psicoestimulante sumado a un período de abstinencia, induce una potenciación del efecto hiperlocomotor cuando el animal es re-expuesto a la droga. Este fenómeno se denomina sensibilización comportamental e involucra cambios plásticos y duraderos en el SNC (Pierce y Kalivas, 1997). Los neurocircuitos involucrados en este proceso están localizados en las áreas que integran el circuito motivacional: CPF, NAcc, ATV y Amígdala, entre otras regiones (Kalivas y Volkow, 2005; Pierce y Kalivas, 1997). Los cambios producidos por la sensibilización en estas áreas involucran alteraciones de la morfología y densidad de dendritas y espinas dendríticas (Robinson y Kolb, 1999; Russo y cols., 2010), cambios en la densidad de receptores post-sinápticos (Pierce y Kalivas, 1997), aumento de la transmisión DAérgica mesolímbica (Fernández-Espejo, 2006; Pierce y Kalivas, 1997) y alteraciones en las proyecciones glutamatérgicas límbicas y corticales hacia el NAcc (Kalivas, 2004; Wolf, 2010).
En particular, se evidenció que el tratamiento repetido con una de las muestras de PBC analizadas (PBC 1) seguido de un período de abstinencia, indujo el fenómeno de sensibilización comportamental en ratas (Meikle y cols., datos no publicados, 2010).

La sensibilización comportamental está directamente relacionada a la expresión del estado de preocupación/anticipación, estado de búsqueda o *craving,* y al desarrollo de la adicción. (Robinson y Berridge, 1993). El *craving* ha sido propuesto como uno de los elementos claves en la recaída de individuos adictos (Koob y Volkow, 2010). Dentro del proceso de sensibilización, el tiempo de abstinencia constituye un factor determinante para la consolidación de los cambios neurales (Kalivas y Duffy, 1993; Pierce y Kalivas, 1997), así como también para la incubación del *craving* (Lu y cols., 2004).

1.3. Ansiedad en abstinencia y tratamiento anti-*craving*

La ansiedad es uno de los principales síntomas que aparecen durante el período de abstinencia luego del consumo de drogas psicoestimulantes, tanto en humanos como en animales de experimentación, representando un riesgo importante para el aumento del *craving* y la consiguiente recaída (Erb, 2009; Koob y Volkow, 2010; Santucci y Rosario, 2010). Esta relación se explica, en parte, por el rol central de la Amígdala en la génesis y expresión de la ansiedad (Kim y Gorman, 2005; Sandford y cols., 2000), y sus interconexiones tanto directas como indirectas con el NAcc, ATV y CPF, elementos del circuito mesocorticolímbico (Kalivas y

Volkow, 2005; Koob y Volkow, 2010). Luego de la administración repetida de la droga y un período de abstinencia, al desarrollar sensibilización comportamental, alteraciones en la Amígdala se consideran que subyacen a una desregulación motivacional por la búsqueda de la droga y al aumento de la ansiedad (Erb, 2009; Erb y cols., 2006; Fernández-Espejo, 2006; Goldstein y Volkow, 2002).

Estudios de auto-administración de cocaína en ratas demostraron la aparición del *craving* asociado a un aumento en la transmisión DAérgica en la Amígdala (que recibe aferencias desde el ATV) luego de un período de abstinencia (Tran-Nguyen y cols., 1998). De la misma forma, la abstinencia luego de un tratamiento repetido de drogas de abuso, incluida la cocaína, produce un aumento en la liberación del CRF desde la Amígdala (Figura 2), así como también un aumento en la capacidad de respuesta del SNC a dicho polipéptido (Erb y cols., 2006; Koob y Volkow, 2010). El CRF tiene un papel clave en la expresión de las conductas relacionadas con el estrés y la ansiedad, y se cree que su aumento es responsable del incremento perdurable de la ansiedad durante la abstinencia (Erb, 2009; Erb y cols., 2006).

Evidencias adicionales de la importancia de la amígdala en el estado emocional y de búsqueda del la droga durante la abstinencia provienen de estudios en humanos utilizando técnicas de imagenología molecular. Individuos con adicción a cocaína en abstinencia muestran un aumento en la actividad de la amígdala al ser expuestos a claves visuales relacionadas con la droga (Childress y cols., 1999). También se ha observado disminución del volumen total de la amígdala en individuos adictos a cocaína (Makris y cols., 2004).

Por otro lado, se ha evidenciado que el tratamiento con cocaína por ocho días consecutivos seguido de diez días de abstinencia genera un aumento de la ansiedad en animales de experimentación (Santucci y Rosario, 2010). Este efecto persiste en el tiempo, manteniendo altos niveles de ansiedad incluso luego de ocho semanas de abstinencia (Santucci y Madeira, 2008). El tratamiento crónico con cocaína también ha mostrado inducir un efecto ansiogénico luego de tiempos de abstinencia más cortos, de uno o dos días (Perrine y cols., 2008; Yang y cols., 1992). En el mismo sentido, se ha reportado que la administración crónica de altas dosis de cafeína induce un aumento de la ansiedad en roedores (Yacoubi y cols., 2000b). *Sin embargo, hasta el momento no se había estudiado el efecto de la administración repetida de PBC sobre la ansiedad experimental considerando distintos tiempos de abstinencia.*

Si bien hasta la fecha no existen fármacos específicos para el tratamiento de la dependencia a drogas de abuso, habitualmente se utilizan diversas estrategias farmacológicas como tratamiento sintomático. Se ha evidenciado que los antipsicóticos atípicos, utilizados como fármacos de primera línea en el tratamiento de la esquizofrenia, pueden reducir el *craving* a

cocaína (Brunette y cols., 2006; Drake y cols., 2000; Wobrock y Soyka, 2008). En particular, se observó que el tratamiento con el antipsicótico atípico Clozapina (Clz) bloquea el fenómeno de sensibilización comportamental, disminuye el aumento de DA en el NAcc inducido por cocaína, y es capaz de inducir un efecto ansiolítico (Broderick y cols., 2004; Bruhwyler y cols., 1990; Filip y cols., 2003; Park y cols., 2010). La Clz ejerce sus efectos principalmente mediante el bloqueo de los receptores serotoninérgicos $5HT_{2A}$ y los receptores dopaminérgicos del tipo D_2 (Kuroki y cols., 1999). *Sin embargo, hasta el momento no se había estudiado el efecto de Clz como posible terapia anti-craving luego de un tratamiento repetido de PBC.*

1.4. Hipótesis de trabajo

En base a lo expuesto, la hipótesis propone que el tratamiento repetido de la co-administración de los componentes principales de la PBC 7 (cocaína y cafeína) seguido de un período de abstinencia, induce un aumento en la ansiedad experimental en ratas. Este efecto comportamental depende del tiempo de abstinencia. En este contexto Clozapina evidencia una propiedad como agente anti-*craving.*

1.5. Objetivo General

El objetivo de esta pasantía se centró en el estudio del efecto comportamental sobre la ansiedad experimental del tratamiento repetido de la co-administración de los componentes principales de la PBC 7 (cocaína y cafeína) y distintos tiempos de abstinencia. A su vez, se evaluó la capacidad de Clz de bloquear la ansiedad experimental, como componente del *craving*, luego de un periodo de abstinencia.

1.6. Objetivos Específicos

1. Determinación del efecto del tratamiento repetido de cocaína y cafeína y dos días de abstinencia sobre la ansiedad en animales de experimentación, utilizando el Laberinto en Cruz Elevado (LCE).

2. Determinación del efecto del tratamiento repetido de cocaína y cafeína y siete días de abstinencia sobre la ansiedad en animales de experimentación en el LCE.

3. Evaluación de la Clozapina como bloqueante del aumento de la ansiedad inducido luego del tratamiento repetido de cocaína y cafeína y un periodo de abstinencia en el LCE.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Animales

Se utilizaron ratas macho, cepa Wistar, de 250 a 320 gr., criados en las instalaciones del Bioterio del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE). Los animales dispusieron de agua y comida *ad libitum* y fueron mantenidos bajo condiciones controladas (temperatura 22±2 ^{o}C, ciclo luz-oscuridad de 12hs.). Todos los procedimientos que se llevaron a cabo se encuentran bajo las normativas de protocolos aprobados por el Comité de Bioética del IIBCE y de acuerdo con la Ley Nacional Nº 18.611 de experimentación animal.

2.2. Drogas y dosis

Como se mencionó anteriormente se utilizó una solución combinada de Clorhidrato de Cocaína (CC) y Cafeína (Caf), co-administradas a las dosis equivalentes de sus respectivos contenidos en la PBC 7. Ambos componentes son los responsables del efecto estimulante de la PBC 7 (López-Hill y cols., 2011). Específicamente, la solución administrada corresponde a una dosis de 5 mg/kg de CC y 2.5 mg/kg de Caf. Ambas drogas se disolvieron en agua destilada.

Clozapina se utilizó a una dosis de 1 mg/kg. La misma se disolvió en HCl 2%, agua destilada y NaOH suficiente para lograr un nivel de pH óptimo para su administración sistémica (pH= 4.5-5.0).

CC y Caf se obtuvieron de Sigma-Aldrich, Clz se obtuvo de Celsius. El volumen de inyección fue de 1 ml/kg.

2.3. Modelos Experimentales

Conductas de ansiedad experimental

Laberinto en Cruz Elevado

El Laberinto en Cruz Elevado o *Elevated Plus-Maze* es un modelo ampliamente utilizado para evaluar el efecto de conductas de ansiedad experimental (Lister, 1990; Pellow y File, 1986). El LCE consiste en dos brazos abiertos (50 x 10 cm) cruzados en ángulo recto con dos brazos cerrados (50 x 10 x 40 cm), unidos por una plataforma central común (10 x 10 cm) y elevado 50 cm del suelo (Figura 3). Está hecho de madera, y el animal se coloca en la plataforma central enfrentado a un brazo cerrado.

En este modelo se confrontan la motivación del animal por la búsqueda y exploración del ambiente con la aversión que le produce la altura y espacio abierto de los brazos abiertos. Se registraron el número de entradas a los brazos abiertos y cerrados, y el tiempo de permanencia en ellos, como principales índices de ansiedad. De esta forma, las drogas que

inducen un efecto ansiolítico aumentan los parámetros registrados sobre los brazos abiertos, mientras que para un efecto ansiogénico se observa el efecto opuesto. Se consideró como criterio de entrada a los brazos la introducción de las cuatro patas del animal dentro del mismo.

Figura 3. Laberinto en Cruz Elevado o *Elevated Plus-Maze*

Además de las entradas y tiempo de permanencia en los brazos abiertos y cerrados, considerados parámetros clásicos del LCE, el análisis de comportamientos específicos desarrollados dentro del LCE ha probado ser de utilidad para fortalecer las observaciones realizadas a partir de los parámetros clásicos y mejorar la caracterización del perfil ansioso de los animales (Carobrez y Bertoglio, 2005; Rodgers y cols., 1997; Weiss y cols., 1998). En este sentido, se midieron por observación directa el número de *head dipping* (parámetro que cuantifica sobre el brazo abierto cuando el animal explora fuera del margen del brazo abierto y en dirección al suelo) y *risk assesment* (parámetro que se cuantifica sobre el brazo cerrado cuando el animal evalúa el riesgo estirándose hacia el brazo abierto sin abandonar el brazo cerrado). Ambas conductas son habituales en los animales control, sin embargo, las drogas ansiolíticas aumentan el número de *head dipping* y disminuyen el de *risk assesment,* mientras que las drogas ansiogénicas inducen lo opuesto.

Locomoción en el Campo Abierto y Laberinto en Cruz Elevado

Campo Abierto

El Campo Abierto (CA) u *Open Field* constituye un modelo comportamental extensamente utilizado para analizar el comportamiento de animales de experimentación en un ambiente novedoso. Este modelo se utilizó para cuantificar la actividad locomotora de los animales de experimentación previo a su colocación en el modelo de ansiedad, LCE. El registro de la actividad locomotora en el CA previo al LCE constituye una combinación óptima de modelos

comportamentales que refina la discriminación del efecto farmacológico (Schmitt y Hiemke, 1998b) y aumenta la exploración de los animales sobre el LCE (Pellow y File, 1986; Meikle y cols., datos no publicados, 2008).

El CA consiste en una caja de acrílico de 60 x 60 x 40 cm, dotada de un sistema de fotoceldas que permite registrar automáticamente la actividad locomotora de los animales a través del software *Motor Behaviour Monitor*.

Laberinto en Cruz Elevado

También se cuantificó la distancia recorrida en el LCE como índice de la actividad locomotora de los animales en el momento del test. Los experimentos fueron filmados mediante una cámara asociada al software de video-seguimiento y análisis de la actividad y patrón locomotor animal *Ethovision XT 7* (Noldus), el cual permitió registrar automáticamente los parámetros mencionados.

2.4. Protocolo Experimental

En la Figura 4 se observa un esquema del protocolo experimental utilizado. Se administró CC(5)+Caf(2.5) o vehículo (agua destilada) de forma sistémica intraperitoneal (i.p.) una vez por día durante cinco días. Los animales fueron inyectados en las instalaciones del Bioterio del IIBCE y colocados inmediatamente de nuevo en sus cajas. Luego de la última inyección los animales se mantuvieron en abstinencia por dos o siete días, según correspondiera. Un día antes de la realización del test comportamental los animales fueron trasladados al cuarto de experimentación del Laboratorio de Biología Celular para su aclimatación al mismo. En el cuarto de experimentación se mantuvieron en todo momento las mismas condiciones de temperatura y ciclo luz-oscuridad presentes en el Bioterio del IIBCE. Al día siguiente de culminada la abstinencia, a los animales se les administró vehículo o Clz 1 mg/kg de forma sistémica subcutánea (s.c.). 30 minutos después se los colocó en el modelo CA por 5 minutos. Terminado ese período, los animales fueron colocados inmediatamente en el LCE por 5 minutos, en los que se evaluó el efecto del tratamiento sobre la ansiedad experimental. Todos los animales fueron *naïve* para el CA y el LCE, y fueron utilizados una única vez. Antes de colocar al siguiente animal ambos modelos fueron limpiados con alcohol al 30 %.

2.5. Análisis Estadístico

El análisis estadístico de los datos se realizó mediante métodos paramétricos, test *t* de Student o ANOVA seguido del test de comparación múltiple de Newman Keuls según el caso. El nivel de significancia se fijó en $p<0.05$

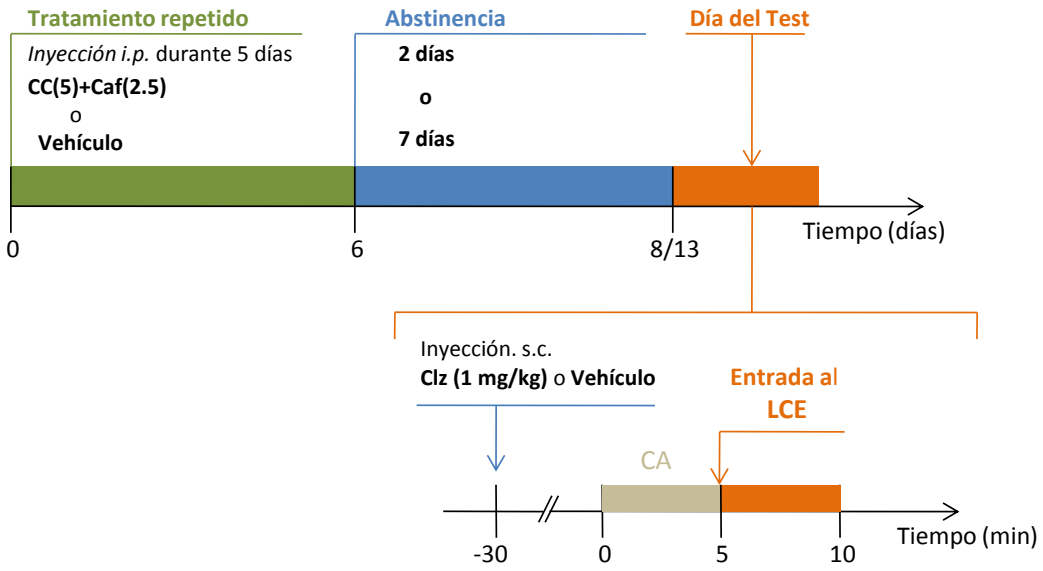

Figura 4. Esquema del protocolo experimental utilizado

3. RESULTADOS

3.1. Determinación del efecto del tratamiento repetido de cocaína y cafeína y DOS DÍAS de abstinencia sobre la ansiedad en animales de experimentación

Conductas de ansiedad experimental evaluadas en el Laberinto en Cruz Elevado

En la Figura 5 se observa que la abstinencia de dos días luego del tratamiento con CC(5)+Caf(2.5) indujo un aumento significativo en el porcentaje de entradas (Figura 5A) y un aumento, aunque no significativo, en el tiempo de permanencia (Figura 5B) en los brazos abiertos, indicando un claro efecto ansiolítico.

En la Figura 6 se muestra el efecto del protocolo experimental sobre el porcentaje de entradas y tiempo de permanencia en los brazos cerrados.

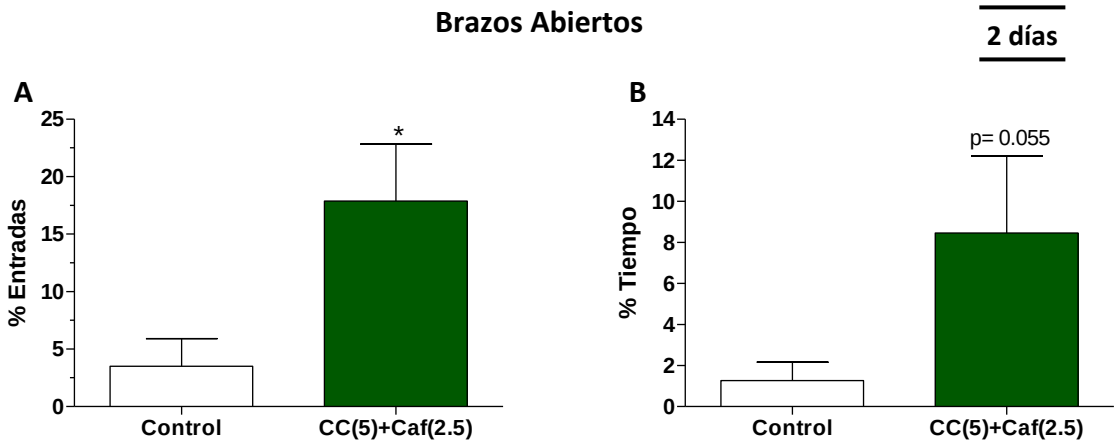

Figura 5. Efecto del tratamiento repetido de CC(5 mg/kg)+Caf(2.5 mg/kg) luego de dos días de abstinencia sobre la ansiedad experimental. Porcentaje de entradas (A) y tiempo de permanencia (B) en los brazos abiertos del LCE. Media ± EEM. *=vs Vehículo. Test *t*-Student. p<0.05. N=6-8

El aumento de las entradas a los brazos abiertos se corresponde con una disminución significativa de las entradas a los brazos cerrados (Figura 6A). Por otro lado, el aumento del tiempo de permanencia en los brazos abiertos no genera una disminución significativa del mismo en los brazos cerrados (Figura 6B).

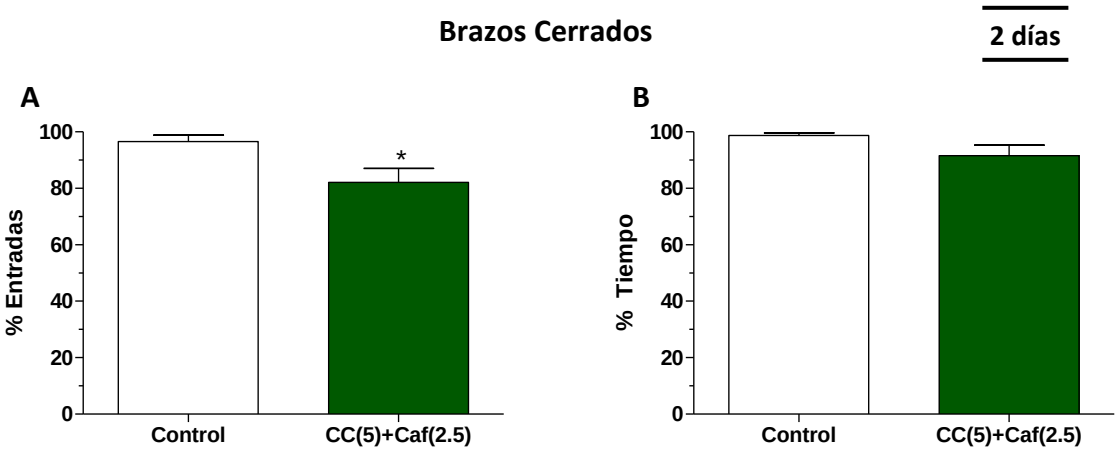

Figura 6. Efecto del tratamiento repetido de CC(5 mg/kg)+Caf(2.5 mg/kg) luego de dos días de abstinencia sobre la ansiedad experimental. Porcentaje de entradas (A) y tiempo de permanencia (B) en los brazos cerrados del LCE. Media ± EEM. *=vs Vehículo. Test *t*-Student. p<0.05. N=6-8

Simultáneamente al registro de los parámetros anteriores, se cuantificaron las conductas de *head dipping* y *risk assesment* (Tabla 1). Aunque con alta variabilidad, los animales tratados con CC+Caf y dos días de abstinencia tendendieron a realizar un mayor número de *head dipping* respecto a los animales tratados con vehículo, lo que se asocia con un efecto ansiolítico. Por otro lado, el número de *risk assesment* no se vio afectado por el tratamiento.

	Conductas cuantificadas	
Tratamiento	***Head Dipping***	***Risk Assesment***
Vehículo	0,75 ± 0,52	4,0 ± 1,2
CC(5)+Caf(2,5)	4,3 ± 2,3	3,5 ± 0,76

Tabla 1. Efecto del tratamiento repetido de CC(5 mg/kg)+Caf(2.5 mg/kg) luego de dos días de abstinencia sobre el número de *head dipping* y *risk assesment.* Media ± EEM. N=6-8

Locomoción en Campo Abierto y Laberinto en Cruz Elevado

En la Figura 7 se observa la actividad locomotora de los animales previo a su colocación en el LCE, luego de un tratamiento repetido de CC(5)+Caf(2.5) y dos días de abstinencia. El tratamiento repetido con la droga no alteró la actividad locomotora basal de los animales, presentando valores similares al grupo control.

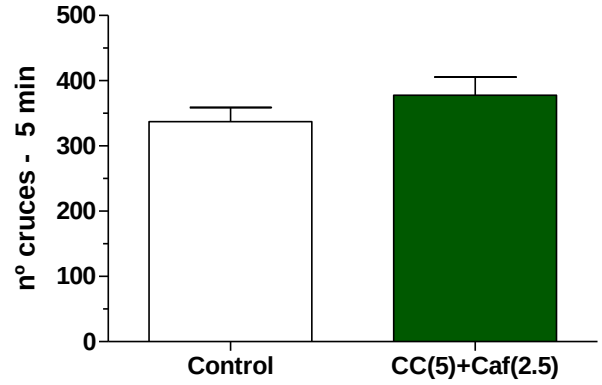

Figura 7. Efecto del tratamiento repetido de CC(5mg/kg)+Caf(2.5mg/kg) luego de dos días de abstinencia sobre la actividad locomotora de los animales, evaluada en el CA. Media ± EEM. N=6-8

Con el fin de lograr una discriminación precisa de las conductas relacionadas con la ansiedad y la locomoción, en un modelo donde interactúan ambos elementos (Rodgers y cols., 1997; Weiss y cols., 1998), además de cuantificar la actividad locomotora previa se analizó la misma sobre el modelo de LCE (Figura 8).

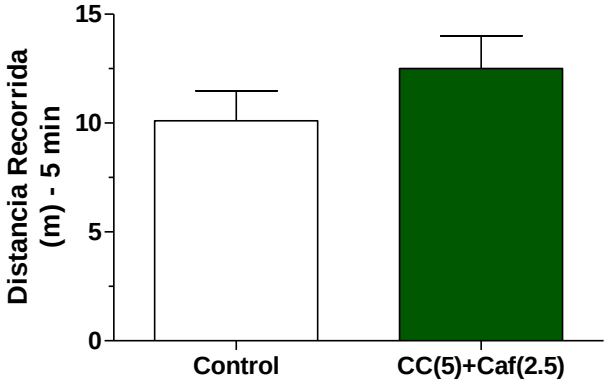

Figura 8. Efecto del tratamiento repetido de CC(5mg/kg)+Caf(2.5mg/kg) y dos días de abstinencia sobre la actividad locomotora de los animales, evaluada en el LCE. Media ± EEM. N=6-8

Cómo se observa en la Figura 8, no hubo diferencia significativa entre la distancia recorrida por el grupo CC(5)+Caf(2.5) y el grupo control. Sin embargo, se observa un leve aumento, aunque no significativo, en la actividad locomotora del grupo tratado con la droga, el cual podría deberse a la mayor exploración de los brazos abiertos que exhibe el grupo tratado.

3.2. Determinación del efecto del tratamiento repetido de cocaína y cafeína y SIETE DÍAS de abstinencia sobre la ansiedad en animales de experimentación

Conductas de ansiedad experimental evaluadas en el Laberinto en Cruz Elevado

En las Figuras 9 y 10 se observa el efecto del tratamiento repetido de CC+Caf y siete días de abstinencia sobre el porcentaje de entradas y tiempo de permanencia en los brazos abiertos y cerrados del LCE, respectivamente. Este protocolo parece inducir un efecto ansiogénico, indicado por una tendencia en la disminución en el porcentaje de entradas (Figura 9A) y tiempo de permanencia (Figura 9B) en los brazos abiertos con respecto al grupo control. Dicha diferencia no repercutió de forma apreciable en los parámetros registrados en los brazos cerrados (Figura 10)

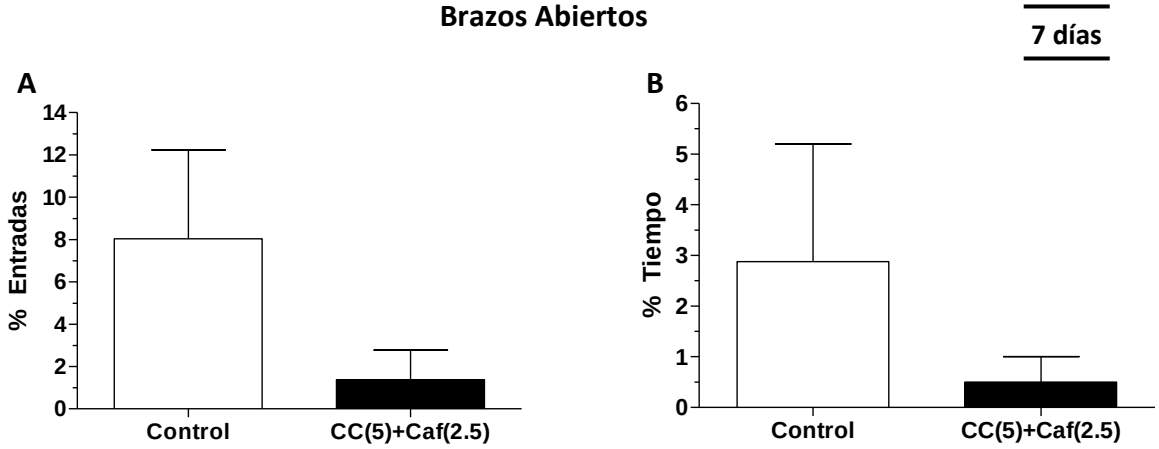

Figura 9. Efecto del tratamiento repetido de CC(5 mg/kg)+Caf(2.5 mg/kg) y siete días de abstinencia sobre la ansiedad experimental. Porcentaje de entradas (A) y tiempo de permanencia (B) en los brazos abiertos del LCE. Media ± EEM. N=6-8

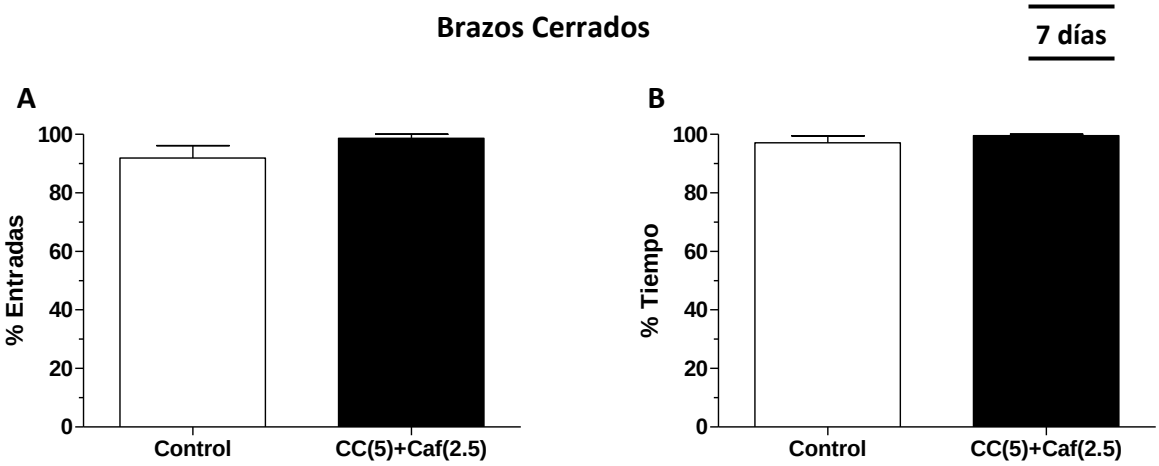

Figura 10. Efecto del tratamiento repetido de CC(5 mg/kg)+Caf(2.5 mg/kg) y siete días de abstinencia sobre la ansiedad experimental. Porcentaje de entradas (A) y tiempo de permanencia (B) en los brazos cerrados del LCE. Media ± EEM. N=6-8

En la Tabla 2 se observa el número de *head dipping* y *risk assesment.* Aunque con alta variabilidad, el grupo tratado con CC(5)+Caf(2.5) y siete días de abstinencia tendió a realizar un menor número *head dipping* en relación al grupo control. A su vez, el grupo tratado con la droga tendió a exhibir un mayor número de *risk assesment* que los animales tratados con vehículo. En conjunto, estas conductas sugieren un aumento de la ansiedad en el grupo tratado con CC(5)+Caf(2.5).

	Conductas cuantificadas	
Tratamiento	***Head Dipping***	***Risk Assesment***
Vehículo	1,8 ± 1,6	1,7 ± 0,5
CC(5)+Caf(2,5)	0,3 ± 0,3	3,5 ± 0,8

Tabla 2. Efecto del tratamiento repetido de CC(5 mg/kg)+Caf(2.5 mg/kg) luego de siete días de abstinencia sobre el número de *head dipping* y *risk assesment.* Media ± EEM. N=6-8

Locomoción en Campo Abierto y Laberinto en Cruz Elevado

En la Figura 11 se observa la actividad locomotora de los animales en el CA, previo a su colocación en el LCE, luego de un tratamiento repetido de CC(5)+Caf(2.5) y siete días de abstinencia. Ambos grupos experimentales presentaron la misma actividad locomotora, lo que indica que el tratamiento repetido de CC(5)+Caf(2.5), seguido de siete días de abstinencia, no alteró actividad basal de los animales.

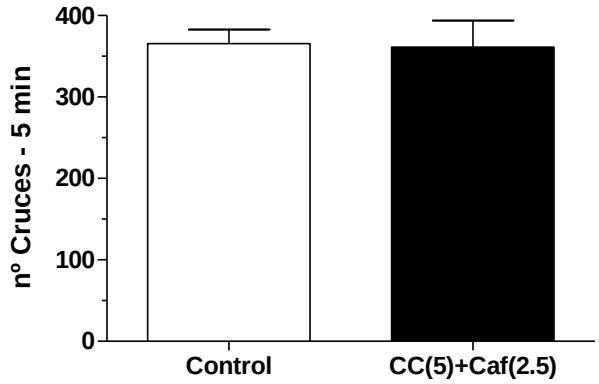

Figura 11. Efecto del tratamiento repetido de CC(5mg/kg)+Caf(2.5mg/kg) luego de siete días de abstinencia sobre la actividad locomotora de los animales, evaluada en el CA. Media ± EEM. N=6-8

La evaluación de la actividad locomotora de los animales en el LCE se muestra en la Figura 12. Ambos grupos experimentales presentaron la misma distancia recorrida en los cinco minutos del test, por lo que las diferencias observadas entre ellos en el LCE no se deben a un efecto locomotor.

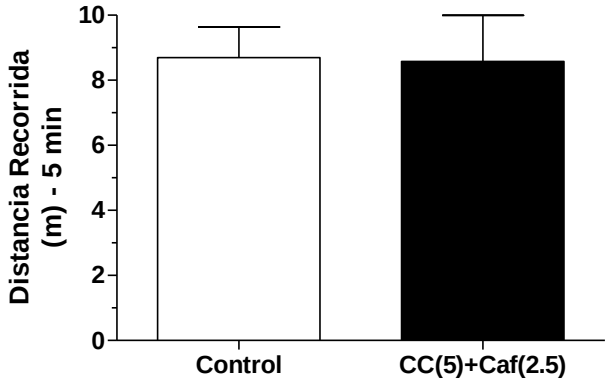

Figura 12. Efecto del tratamiento repetido de CC(5mg/kg)+Caf(2.5mg/kg) y siete días de abstinencia sobre la actividad locomotora de los animales, evaluada en el LCE. Media ± EEM. N=6-8

3.3. Comparación del efecto del tratamiento repetido de cocaína y cafeína con dos y siete días de abstinencia sobre la ansiedad en animales de experimentación

Con el fin de evaluar el efecto y la importancia de la abstinencia, se realizó una comparación de la ansiedad experimental entre los grupos sometidos a un tratamiento repetido de CC(5)+Caf(2.5) seguido de dos y siete días de abstinencia.

Dado que los animales controles tratados con vehículo más dos y siete días de abstinencia no presentaron diferencias significativas en los parámetros registrados, en esta comparación se tomó el valor medio de ambos grupos combinados como valor control de referencia.

Conductas de ansiedad experimental evaluadas en el Laberinto en Cruz Elevado

En la Figura 13 se observa el efecto de 2 y 7 días de abstinencia sobre el porcentaje de entradas (Figura 13A) y tiempo de permanencia (Figura 13B) en los brazos abiertos del grupo tratado con CC(5)+Caf(2.5). El grupo con siete días de abstinencia presentó un porcentaje de entradas a los brazos abiertos significativamente menor al del grupo con dos días de abstinencia.

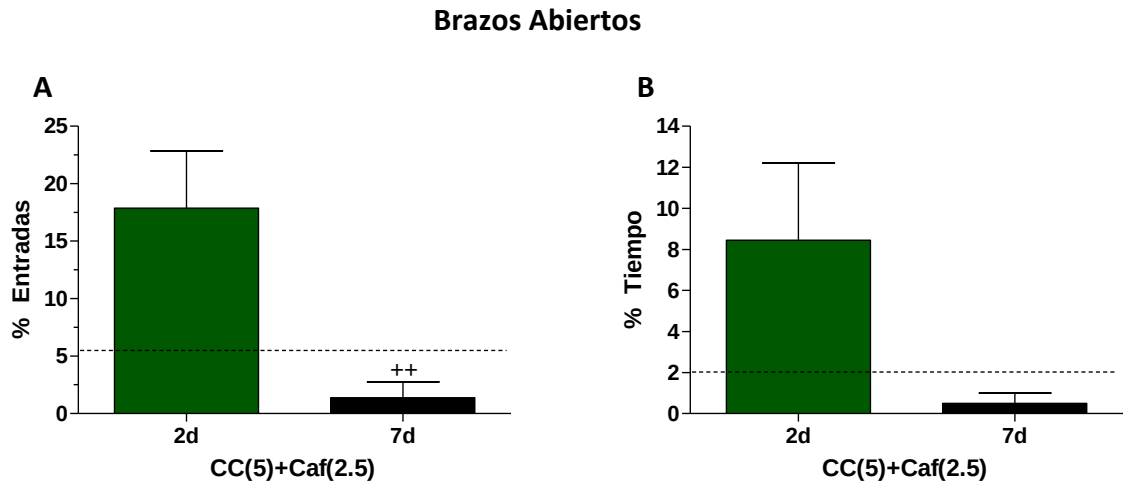

Figura 13. Efecto de 2 o 7 días de abstinencia sobre la ansiedad experimental del grupo tratado con CC(5)+Caf(2.5). Porcentaje de entradas (A) y tiempo de permanencia (B) en los brazos abiertos del LCE. Media ± EEM. El valor control está representado por la línea punteada. +=vs 2d. Test *t*-Student. ++=p<0.01

A su vez, el grupo 7d tuvo un menor, aunque no significativo, tiempo de permanencia en los brazos abiertos en relación al grupo 2d. Estos resultados implicaron un cambio en el perfil ansioso de los animales generado por un mayor tiempo de abstinencia. Mientras que dos días de abstinencia luego del tratamiento con CC(5)+Caf(2.5) inducen un efecto ansiolítico, siete días tienden a inducir lo opuesto.

En la Figura 14 se muestra el efecto de la abstinencia sobre los parámetros registrados en los brazos cerrados.

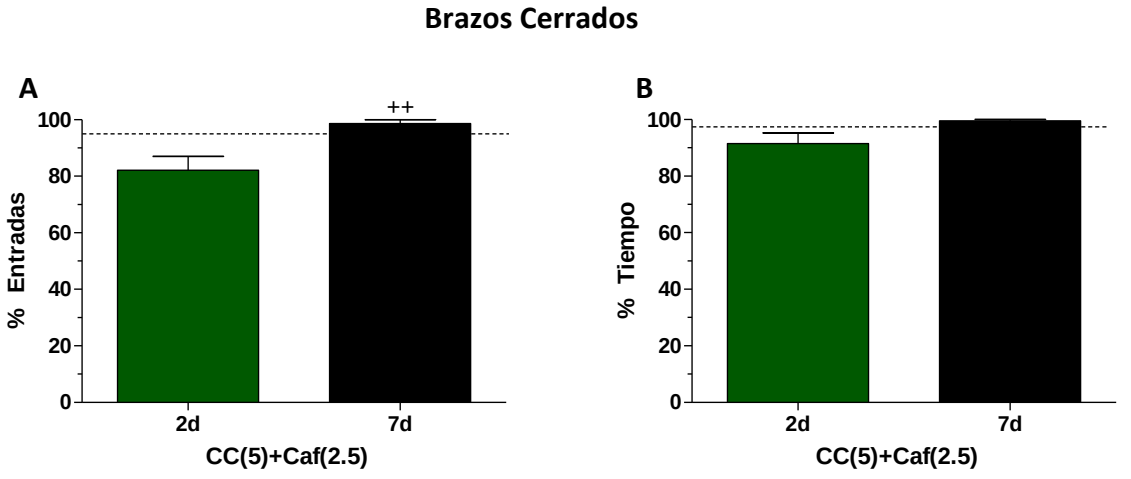

Figura 14. Efecto de 2 o 7 días de abstinencia sobre la ansiedad experimental del grupo tratado con CC(5)+Caf(2.5). Porcentaje de entradas (A) y tiempo de permanencia (B) en los brazos cerrados del LCE. Media ± EEM. El valor control está representado por la línea punteada. +=vs 2d. Test *t*-Student. ++=p<0.01

El aumento de la abstinencia generó un aumento significativo en el porcentaje de entradas a los brazos cerrados (Figura 14A) en relación al grupo 2d, lo que acompaña la menor exploración de los brazos abiertos. El grupo 7d también tendió a pasar más tiempo en los brazos cerrados que los animales con dos días de abstinencia (Figura 14B).
La comparación de las conductas *head dipping* y *risk assesment* se muestra en la Tabla 3.

	Conductas cuantificadas	
Tratamiento	***Head Dipping***	***Risk Assesment***
Control	1,2 ± 0,8	2,8 ± 0,7
2d	4,3 ± 2,3	3,5 ± 0,76
7d	0,3 ± 0,3	3,5 ± 0,8

Tabla 3. Efecto de 2 (2d) o 7 (7d) días de abstinencia sobre el número de h*ead dipping* y *risk assesment* de los animales tratados con CC(5mg/kg)+Caf(2.5mg/kg). Media ± EEM. N=6-8

Los animales del grupo 7d presentaron una tendencia a realizar un menor número de *head dipping* que los del grupo 2d, lo que está en correspondencia con la diferencia entre ambos grupos en las entradas a los brazos abiertos, ya que el *head dipping* es un parámetro conductual que se registra únicamente sobre los brazos mencionados. Por otro lado, no se apreciaron diferencias en la conducta de *risk assesment* entre los grupos.

Locomoción en Campo Abierto y Laberinto en Cruz Elevado

En la Figura 15 se muestra la actividad locomotora de los animales previo a su colocación en el LCE, luego de un tratamiento repetido de CC(5)+Caf(2.5) y dos (2d) y siete (7d) días de abstinencia. Ninguno de los protocolos alteró la actividad locomotora basal de los animales.
En la figura 16 se observa la distancia recorrida en el LCE por las animales tratados con CC(5)+Caf(2.5) y 2 o 7 días en abstinencia. Los animales del grupo 7d presentaron una tendencia a una menor actividad locomotora en relación a los animales del grupo 2d. Esta diferencia puede deberse a que el grupo 2d presenta una mayor exploración de los brazos abiertos, y por lo tanto del LCE en su conjunto.

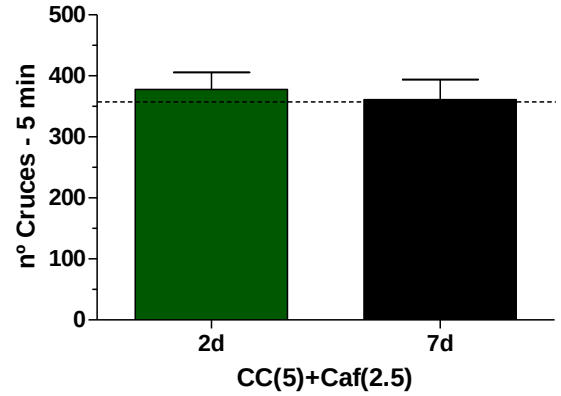

Figura 15 Efecto de 2 (2d) o 7 (7d) días de abstinencia sobre la actividad locomotora de los animales del grupo tratado con CC(5mg/kg)+Caf(2.5mg/kg), evaluada en el CA. El valor control está representado por la línea punteada. Media ± EEM. N=6-8

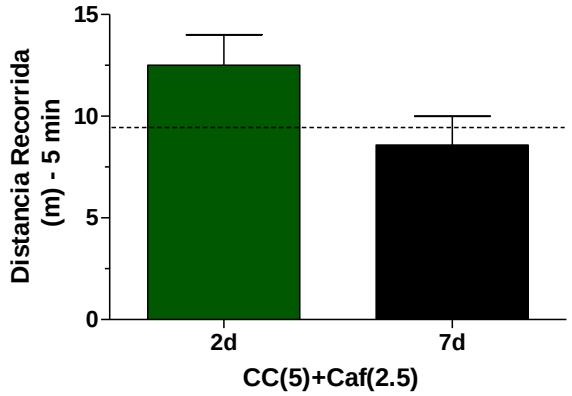

Figura 16. Efecto de 2 (2d) o 7 (7d) días de abstinencia sobre la actividad locomotora de los animales del grupo tratado con CC(5mg/kg)+Caf(2.5mg/kg), en el LCE. El valor control está representado por la línea punteada. Media ± EEM. N=6-8

3.4. Evaluación de la Clozapina como bloqueante del aumento de la ansiedad inducido luego del tratamiento repetido de cocaína y cafeína y un periodo de abstinencia

Dado que el tratamiento repetido con CC(5)+Caf(2.5) seguido de siete días de abstinencia fue el protocolo que tendió a aumentar la ansiedad en los animales, éste se utilizó para evaluar la capacidad de Clz de bloquear esta tendencia. Se administró Clz (1 mg/kg) o Vehículo (Veh) 30 minutos antes de la evaluación de los animales en los modelos comportamentales.

Conductas de ansiedad experimental evaluadas en el Laberinto en Cruz Elevado

En la Figura 17 se observa el efecto de Clz luego del pre-tratamiento con CC(5)+Caf(2.5) y siete días de abstinencia sobre los parámetros registrados en los brazos abiertos.

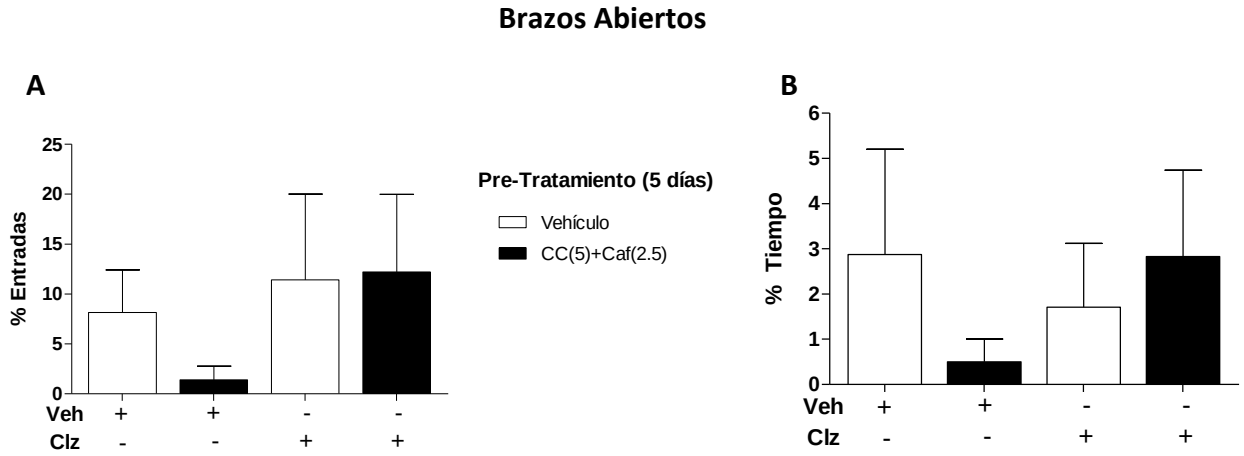

Figura 17. Efecto de la administración de Clz (1 mg/kg) luego del pre-tratamiento con CC(5)+Caf(2.5) y siete días de abstinencia sobre la ansiedad experimental. Porcentaje de entradas (A) y tiempo de permanencia (B) a los brazos abiertos del LCE. Media ± EEM. N=6-8

El tratamiento con Clz, aunque con alta variabilidad, indujo una tendencia al aumento en el porcentaje de entradas (Figura 17A) y tiempo de permanencia (Figura 17B) en los brazos abiertos en el grupo pre-tratado con CC(5)+Caf(2.5), alcanzando valores similares al grupo control. Este resultado sugiere una reversión del perfil ansioso observado en los animales pre-tratados con CC(5)+Caf(2.5) e inyectados con vehículo.

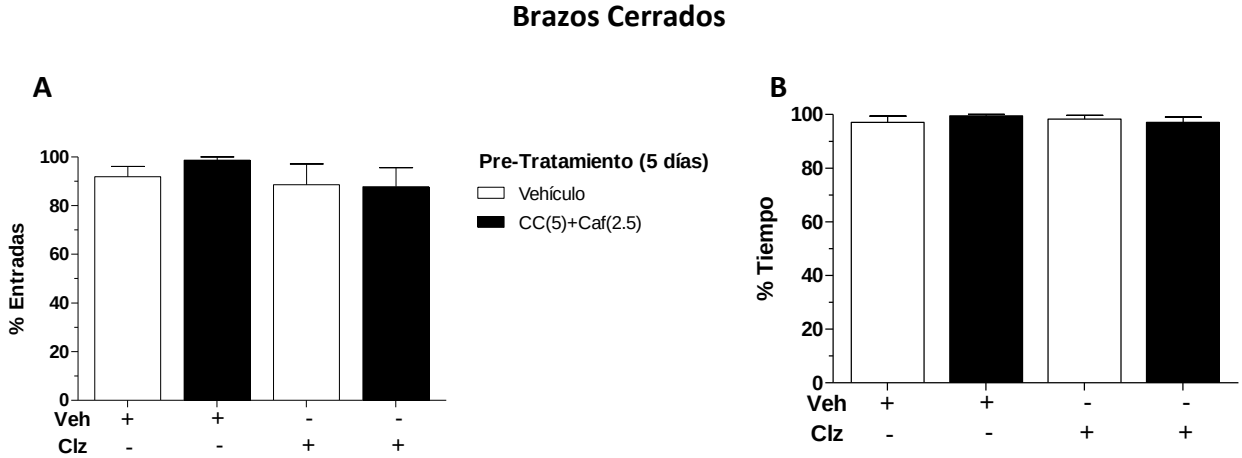

Figura 18. Efecto de la administración de Clz (1 mg/kg) luego del pre-tratamiento con CC(5)+Caf(2.5) y siete días de abstinencia sobre la ansiedad experimental. Porcentaje de entradas (A) y tiempo de permanencia (B) a los brazos cerrados del LCE. Media ± EEM. N=6-8

Por otro lado, la administración de Clz no generó diferencias en los parámetros registrados en los brazos cerrados (Figura 18).

En la Tabla 4 se observa el número de *head dipping* y *risk assesment.*

		Conductas cuantificadas	
Pre-tratamiento	***Tratamiento***	***Head Dipping***	***Risk Assesment***
Vehículo	Vehículo	1,8 ± 1,6	1,7 ± 0,5
CC(5)+Caf(2,5)	Vehículo	0,3 ± 0,3	3,5 ± 0,8
Vehículo	Clozapina	0,7 ± 0,6	0,57 ± 0,3
CC(5)+Caf(2,5)	Clozapina	1,5 ± 1,1	0,8 ± 0,47 /

Tabla 4. Efecto de la administración de Clz (1 mg/kg) luego del pre-tratamiento con CC(5)+Caf(2.5) y siete días de abstinencia sobre el número de *head dipping* y *risk assesment*. Media ± EEM. /= vs CC(5)+Caf(2.5) – Vehículo. ANOVA de una vía- Newman Keuls. /= $p<0.05$; N=6-8

La administración de Clz tendió a aumentar el número de *head dipping* de los animales pre-tratados con CC(5)+Caf(2.5) en relación a los pre-tratados con la droga e inyectados con vehículo, alcanzando un valor similar al grupo control (pre-tratado y tratado con vehículo). A su vez, el tratamiento con Clz generó una disminución significativa de la conducta *risk assesment* comparado con el grupo CC(5)+Caf(2.5) – Vehículo. Ambas conductas señalan un menor nivel de ansiedad del grupo CC(5)+Caf(2.5) – Clz.

Locomoción en Campo Abierto y Laberinto en Cruz Elevado

En la Figura 19 se observa la actividad locomotora en el CA de los animales tratados con Clz, luego de un pre-tratamiento con CC(5)+Caf(2.5) y siete días de abstinencia. La administración de Clz generó una disminución significativa de la actividad locomotora de los animales, independientemente del pre-tratamiento recibido.

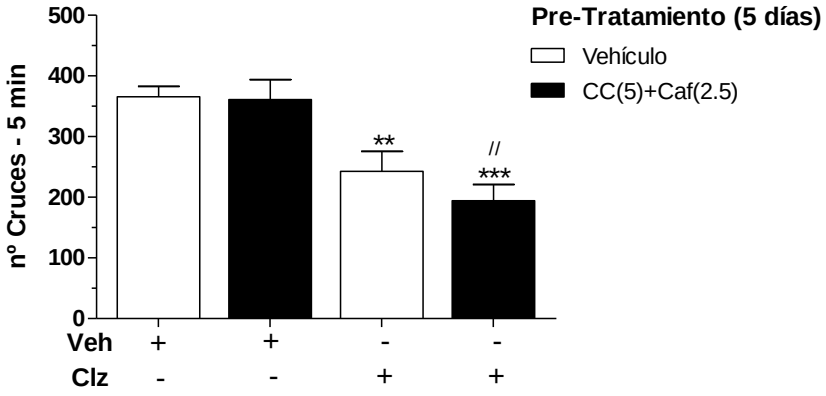

Figura 19. Efecto de la administración de Clz (1 mg/kg) luego del pre-tratamiento con CC(5)+Caf(2.5) y siete días de abstinencia sobre la actividad locomotora de los animales evaluada en el CA. Media ± EEM. *= vs Veh-Veh; /= vs CC(5)+Caf(2.5)-Veh. ANOVA de una vía- Newman Keuls. **, //= p<0.01. ***= p<0.001. N=6-8

En la Figura 20 se observa la distancia recorrida en el LCE luego de la administración de Clz a los animales pre-tratados con CC(5)+Caf(2.5) y siete días de abstinencia. La Clz tendió a disminuir la actividad locomotora de los animales en relación a los inyectados con vehículo.

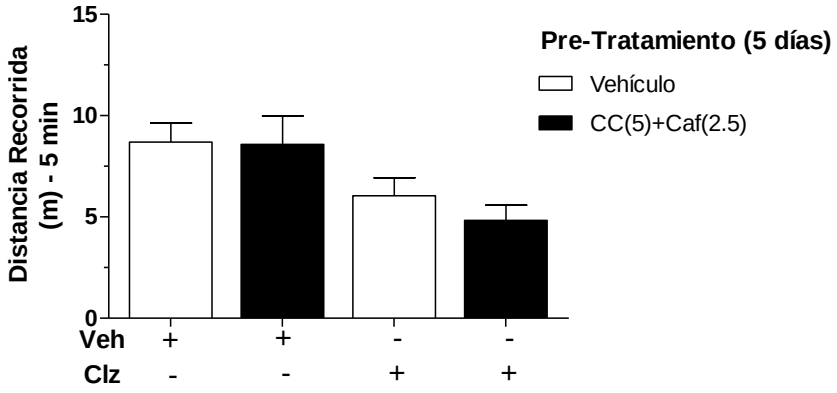

Figura 20. Efecto de la administración de Clz (1 mg/kg) luego del pre-tratamiento con CC(5)+Caf(2.5) y siete días de abstinencia sobre la actividad locomotora de los animales en el LCE. Media ± EEM. N=6-8

4. DISCUSIÓN

El presente trabajo se centró en el estudio del efecto del tratamiento repetido de los componentes activos de una muestra de PBC (cocaína y cafeína) y distintos tiempos de abstinencia sobre la ansiedad experimental, y el potencial efecto anti-*craving* de la Clz.

4.1. Determinación del efecto del tratamiento repetido de cocaína y cafeína y dos días de abstinencia sobre la ansiedad en animales de experimentación

Existen varios reportes pre-clínicos en la literatura indicando un efecto ansiogénico de la abstinencia luego de un tratamiento repetido con cocaína (Perrine y cols., 2008; Rogerio y Takahashi, 1992; Santucci y Madeira, 2008; Yang y cols., 1992). Sin embargo, existen otros reportes de ausencia de efecto luego del tratamiento crónico con cocaína y un tiempo de abstinencia corto (Sarnyai y cols., 1995). En el presente trabajo se observó que el tratamiento repetido con CC(5)+Caf(2.5) y dos días de abstinencia generó un efecto ansiolítico en los animales de experimentación, en relación al grupo control (Figuras 5 y 6). Es importante tener en cuenta que en este trabajo se administró una solución combinada de cocaína y cafeína, por lo que la abstinencia a este tratamiento podría explicar los efectos distintos a los observados luego de la administración únicamente de cocaína y tiempos de abstinencia cortos.

El LCE es un modelo comportamental en el cual alteraciones en la locomoción del animal pueden repercutir en la exploración del modelo, generando falsos positivos. Por lo tanto es importante considerar la actividad locomotora de los animales, en especial cuando se trabaja con una droga psicoestimualnte que induce hiperlocomoción. Es decir, un aumento en la locomoción puede generar un aumento en el número de entradas y tiempo de permanencia en los brazos abiertos, sin que ello tenga relación con la ansiedad. Con este fin se analizó la actividad locomotora de los animales previo a su colocación en el LCE (basal), y durante el mismo. La actividad locomotora basal de los animales tratados con CC(5)+Caf(2.5), evaluada el día del test en el CA, demostró ser igual a la del grupo control (Figura 7). Lo mismo ocurrió con la actividad en el LCE (Figura 8). Estos resultados permiten afirmar que el efecto ansiolítico observado en el LCE fue específico y no dependió de alteraciones en la locomoción.

El tratamiento con CC(5)+Caf(2.5) y dos días de abstinencia tendió a generar un aumento en el número de *head dipping* y no tuvo un efecto apreciable sobre los *risk assesment*, en relación al control. Los *head dipping* se expresan en los brazos abiertos y son considerados como una conducta de exploración del espacio en los brazos abiertos, lo que indica un bajo nivel de ansiedad. Por otro lado, los *risk assesment* implican la evaluación del riesgo que supone

abandonar los brazos cerrados (Carobrez y Bertoglio, 2005; Rodgers y cols., 1997). Esto significa que a pesar de que los animales controles y los tratados realizaron niveles similares de evaluación del riesgo de abandonar los brazos cerrados, los animales tratados tuvieron un aumento en las entradas a los brazos abiertos y realizaron mayor número de conductas de exploración en los mismos, en concordancia con el efecto ansiolítico ya mencionado.

4.2. Determinación del efecto del tratamiento repetido de cocaína y cafeína y siete días de abstinencia sobre la ansiedad en animales de experimentación

El tratamiento repetido con CC(5)+Caf(2.5) y siete días de abstinencia tendió a inducir un efecto ansiogénico en los animales de experimentación, en relación al grupo control (Figuras 9 y 10). Esto coincide con lo reportado en la literatura científica pre-clínica sobre los efectos de la abstinencia luego de un tratamiento con drogas psicoestimulantes (Erb, 2009; Cleck y Blendy, 2008; Perrine y cols., 2008; Rogerio y Takahashi, 1992; Yang y cols., 1992).

Nuevamente, se evaluó la actividad de los animales para asegurar que el efecto observado no se debió a una alteración en la locomoción de los mismos. Ambos grupos experimentales presentaron niveles similares de actividad locomotora, tanto en el CA como en el LCE (Figuras 11 y 12). Esto permite descartar que el efecto ansiogénico observado en el LCE se deba a una disminución en la locomoción.

El análisis del número de entradas y tiempo de permanencia en los brazos cerrados contribuye a la caracterización del perfil ansioso de los animales de experimentación. Sin embargo, a pesar del efecto ansiogénico evidenciado por dichos parámetros en los brazos abiertos, no se observaron diferencias apreciables en los en los parámetros registrados en los brazos cerrados. Es probable que esto se deba al bajo número de entradas y tiempo de permanencia en los brazos abiertos en relación a las entradas y tiempo totales, lo que hace que las diferencias de los parámetros en los brazos cerrados sean difíciles de apreciar.

Aún así, el análisis de las conductas realizadas sobre el LCE permite confirmar el perfil ansioso de los grupos experimentales. Los animales tratados tendieron a realizar un mayor número de *risk assesment* que los animales controles, lo que se asocia con un mayor nivel de ansiedad, ya que los animales realizaron más evaluaciones de riesgo. Asimismo, el grupo tratado tendió a realizar un menor número de *head dipping*, lo que se corresponde con el menor número de entradas a los brazos abiertos, confirmando el efecto ansiogénico del tratamiento con CC(5)+Caf(2.5) y siete días de abstinencia.

Es importante resaltar que, si bien hay un efecto marcado en la ansiedad de los animales, no se ha podido obtener significancia estadística en las comparaciones entre los grupos. Mediante

ensayos preliminares se pudo comprobar que el protocolo experimental que incluye la aplicación repetida de inyecciones sistémicas i.p. aumenta *per se* la ansiedad de los animales (datos obtenidos por Prieto, 2011). En estos ensayos se incluyó un grupo experimental que no recibió ninguna inyección durante los cinco días del tratamiento repetido, siendo inyectado por primera y única vez el día del test de forma s.c., con vehículo (grupo control absoluto). Dicho grupo presentó un mayor porcentaje de entradas y tiempo de permanencia en los brazos abiertos comparado con un grupo tratado con vehículo. Este resultado indicó que la inyección repetida (efecto "pinchazo") generó un aumento en la ansiedad en los animales. Esto redujo considerablemente el porcentaje de entradas a los brazos abiertos de los animales tratados con vehículo, lo que dificultó la obtención de significancia estadística cuando comparamos los animales tratados y con siete días de abstinencia. Para sortear esta dificultad, existen estrategias como la manipulación previa de los animales ("*handling"*) o la selección de animales según su nivel basal de ansiedad (Doremus-Fitzwater y cols., 2009; Rogerio y Takahashi, 1992; Schmitt y Hiemke, 1998a). Será necesario considerar el uso de alguno de estos métodos para la realización de futuros experimentos.

4.3. Comparación del efecto del tratamiento repetido de cocaína y cafeína con dos y siete días de abstinencia sobre la ansiedad en animales de experimentación

Se realizó una comparación entre los grupos tratados con CC(5)+Caf(2.5) con dos y siete días de abstinencia, con el fin de evaluar la importancia y el efecto de la abstinencia sobre la ansiedad experimental.

Los animales tratados y evaluados a los siete días de abstinencia tuvieron un perfil ansioso claramente distinto a los animales con el mismo tratamiento evaluados luego de dos días de abstinencia. Es así que el aumento del período de abstinencia generó un efecto ansiogénico (Figuras 13 y 14). El efecto de la abstinencia se reflejó también en el número de *head dipping*, siendo menor en el grupo 7d que en el 2d. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Sarnyai, 1995. En dicho trabajo, si bien los autores evidencian la ausencia de efecto de la administración de cocaína y tiempos cortos de abstinencia, estos describen un efecto ansiogénico al considerar tiempos de abstinencia mayores (Sarnyai y cols., 1995).

Los distintos tiempos de abstinencia no alteraron la actividad locomotora basal de los animales, evaluada en el CA (Figura 15). Por otro lado, el grupo 7d presentó una tendencia a una menor distancia recorrida en el LCE que el grupo 2d. Es probable que esto se deba a la diferencia en el perfil ansioso de ambos grupos y no a una alteración motora. Altos niveles de ansiedad puede generar una disminución de la actividad locomotora en el LCE, como

consecuencia de la falta de exploración de los brazos abiertos y un menor número de cruces entre brazos cerrados (Weiss y cols., 1998). Además, en caso de existir una alteración locomotora, la misma debió evidenciarse en el CA, previo al LCE, donde como ya se mencionó, no se encontraron diferencias.

Los resultados de esta comparación apoyan la idea descrita en varios trabajos de que la abstinencia, lejos de ser una fase pasiva caracterizada por la ausencia de droga, constituye un factor importante y activo del proceso adictivo, y es fundamental para la incubación y expresión de las manifestaciones del *craving* como el aumento de la ansiedad (Fernández-Espejo, 2006; Goldstein y Volkow, 2002; Lu y cols., 2004; Pierce y Kalivas, 1997).

4.4. Evaluación de la Clozapina como bloqueante del aumento de la ansiedad inducido luego del tratamiento repetido de cocaína y cafeína y un periodo de abstinencia

La administración de Clz, luego del tratamiento repetido con CC(5)+Caf(2.5) y siete días de abstinencia, aunque con alta variabilidad, tendió a evitar la aparición del efecto ansiogénico en los animales pre-tratados con CC(5)+Caf(2.5) (Figura 17).

Esta descrito en la literatura que la Clz puede generar alteraciones en la actividad de los animales, e incluso interferir la evaluación de la ansiedad en el LCE (Cao y Rodgers, 1997), lo que puede explicar la gran variabilidad observada. El análisis de la actividad locomotora en el CA como en el LCE mostró que la Clz generó una disminución de la actividad de los animales. Sin embargo, a pesar de dicha disminución Clz tendió a inducir un efecto ansiolítico. Esto resulta destacable puesto que una locomoción disminuida suele generar un falso efecto ansiogénico (Cao y Rodgers, 1997, Weiss y cols., 1998). Estas observaciones fortalecen la afirmación del efecto de la Clz como agente capaz de evitar el aumento de la ansiedad luego de un tratamiento repetido con CC(5)+Caf(2.5) y siete días de abstinencia.

La administración con Clz también generó una disminución significativa de los *risk assesment* en el grupo tratado en comparación con el grupo CC(5)+Caf(2.5) – Vehículo, lo que está en concordancia con un efecto ansiolítico. Si bien existe la posibilidad que esta diferencia se deba a la disminución de la actividad de los animales, no existen reportes de que la Clz anule estas conductas a las dosis utilizadas. Por otro lado la tendencia al efecto ansiolítico de la Clz se evidencia también en el aumento, aunque no significativo, de los *head dipping* del grupo pre-tratado con la droga en relación al grupo con el mismo pre-tratamiento e inyectados con vehículo.

Estos resultados apoyan la idea de que el antipsicótico Clz podría actuar como un agente anti-*craving* mediante la prevención del aumento de la ansiedad durante la fase de abstinencia. Sin

embargo, son necesarios futuros experimentos incluyendo manipulación de animales o la selección de los mismos, así como también la utilización de otros modelos comportamentales, para refinar y profundizar el estudio del rol de la Clz como posible terapia anti-*craving.*

5. CONCLUSIONES

Los resultados del trabajo de pasantía demuestran que el tratamiento repetido con los componentes activos de la PBC (cocaína y cafeína) y siete días de abstinencia tendió a generar un aumento de la ansiedad de los animales. La abstinencia es un factor fundamental para la incubación de un efecto ansiogénico, puesto que el tratamiento repetido con la droga y dos días de abstinencia no generó un aumento de la ansiedad. La administración de Clz (1 mg/kg) tendió a evitar el aumento de la ansiedad observado a los siete días de abstinencia luego del tratamiento con CC(5)+Caf(2.5).

6. PERSPECTIVAS

Experimentos adicionales y modificaciones en los protocolos utilizados permitirán profundizar en el efecto ansiogénico del tratamiento con CC+Caf y siete días de abstinencia, y en la evaluación de la Clz como agente anti-*craving.*

La manipulación previa de animales o su selección según su estado de activación basal, constituyen elementos a incorporar en experimentos próximos que permitirán disminuir la variabilidad y obtener resultados más robustos. A su vez, la utilización de otros modelos para la evaluación de la ansiedad, como por ejemplo el *Zero-Maze* o Laberinto en Cero, el cual permite la exploración ininterrumpida de los brazos, puede resultar de utilidad para eliminar posible ambigüedades del LCE (Shepherd y cols., 1994).

Por otro lado, la medición de los niveles de CRF liberado por la amígdala luego de los tratamientos realizados podrían aportar un correlato neuroquímico a las conductas observadas en el LCE.

8. REFERENCIAS

Barat, S.; Abdel-Rahman, M. (1998) Kinetics and rat locomotor activity following cocaine and lidocaine administration. *Journal of Applied Toxicology,* 18:227-232

Bedingfield, B.; King, D.; Holloway, F. (1998) Cocaine and caffeine: conditioned place preference, locomotor activity, and additivity. *Pharmacology Biochemistry and Behavior,* 61(3):291-296

Broderick, P.; Hopea, O.; Okonjia,C; Rahnia, D.; Zhoua, Y. (2004) Clozapine and cocaine effects on dopamine and serotonin release in nucleus accumbens during psychostimulant behavior and withdrawal. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry,* 28:157-171

Bruhwyler, J.; Chleide, E.; Liégeois, J.F.; Delarge, J.; Mercier, M. (1990) Anxiolytic potential of sulpiride, clozapine and derivatives in the open-field test. *Pharmacology Biochemistry & Behavior,* 36:57-61

Brunette, M.; Drake, R.; Xie, H.; McHugo, G.; Green, A. (2006) Clozapine use and relapses of substance use disorder among patients with co-occurring schizophrenia and substance use disorders. *Schizophrenia Bulletin,* 32(4):637-643

Cao, J.; Rodgers, R.J. (1997) Dopamine D4 receptor and anxiety: behavioural profiles of clozapine, L-745,870 and L-741,742 in the mouse plus-maze. *European Journal of Pharmacology,* 335:117–125

Carboni, E.; Imperato, A.; Perezzani, L.; Di Chiara, C. (1989) Amphetamine, cocaine, phencyclidine and nomifensine increase extracelular dopamine concentrations preferentially in the nucleus accumbens of freely moving rats. *Neuroscience,* 28(3):653-661

Carorez, A.; Bertoglio, L. (2005) Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: the elevated plus-maze model 20 years on. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews,* 29:1193-1205

Castaño, G.A. (2000) Cocaínas Fumables en Latinoamérica. *Adicciones,* 12(4):541-550

Childress, A.; Mozley, D.; McElgin, W.; Fitzgerald, J.; Reivich, M.; O'Brien, C. (1999) Limbic activation during cue-induced cocaine craving. *American Journal of Psychiatry,* 156(1):11-18

Cleck, J.; Blendy, J. (2008) Making a bad thing worse: adverse effects of stress on drug addiction. *Journal of Clinical Investigation*, 118(2):454-461

Cole, C.; Jones, L.; McVeigh, J.; Kicman, A.; Syed, Q.; Bellis, M. (2010) Adulterants in illicit drugs: a review of empirical evidence. *Drug Testing and Analysis,* 3:89-96

Doremus-Fitzwater, T.; Varlinskaya, E.; Spear, L. (2009) Effects of pretest manipulation on elevated plus-maze behavior in adolescent and adult male and female Sprague–Dawley rats. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior,* 92:413-423

Drake, R.; Xie, H.; McHugo, G.; Green, A. (2000) The effects of clozapine on alcohol and drug use disorders among patients with schizophrenia. *Schizophrenia Bulletin,* 26(2):441-449

Erb, S. (2009) Evaluation of the relationship between anxiety during withdrawal and stress-induced reinstatement of cocaine seeking. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 34(5):798-807

Erb, S.; Kayyali, H.; Romero, K. (2006) A study of lasting effects of cocaine pre-exposure on anxiety-like behaviors under baseline conditions and in response to central injections of corticotropin-releasing factor. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior,* 85:206-213

Fernández-Espejo, E. (2006) Neurobiología de la adicción a psicoestimulantes. *Revista de Neurología*, 43(3):147-154

Filip, M.; Papla, I.; Nowak, I.; *Przegaliñski*, E. (2003) Blocking impact of clozapine on cocaine locomotor and sensitizing efects in rats. *Polish Journal of Pharmacology*, 55:1225-1230

Fisone, G.; Borgkvist, A.; Usiello, A. (2004) Caffeine as a psychomotor stimulant: mechanism of action. *Cellular and Molecular Life Sciences,* 61:857–872

Fredholm, B.; Battig, K.; Holmén, J.; Nehlig, A.; Zvartau, E. (1999) Actions of caffeine in the brain with special reference to factors that contribute to its widespread use. *Pharmacological Reviews*, 51:83-133

Fucci, N.; De Giovanni, N. (1998) Adulterants encountered in the ilicit cocaine market. Forensic Science International 95(3):247-252

Goldstein, R.; Volkow, N. (2002) Drug addiction and its underlying neurobiological basis: neuroimaging evidence for the involvement of the frontal cortex. *American Journal of Psychiatry,* 159:1642-1652

Jeri, F.R. (1984) Coca-paste smoking in some Latin American countries: a severe and unabated form of addiction. *Bulletin on Narcotics,* 36(2):15-31

Junta Nacional de Drogas (2008) Drogas: más información menos riesgos

Junta Nacional de Drogas (2007) Pasta Base de Cocaína. Prácticas y gestión de riesgos en adolescentes uruguayos

Kalivas, P. (2004) Recent understanding in the mechanisms of addiction. *Current Psychiatry Reports,* 6:347-351

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

Kalivas, P.; Volkow, N. (2005) The neural basis of addiction: a pathology of motivation and choice. *American Journal of Psychiatry*, 162:1403-1413

Kim, J.; Gorman, J. (2005) The psychobiology of anxiety. *Clinical Neuroscience Research,* 4:335-347

Koob, G.; Le Moal, M. (2006) Neurobiology of Addiction. *Academic Press*

Koob, G.; Volkow, N. (2010) Neurocircuitry of addiction. *Neuropsychopharmacology reviews,* 35:217-238

Kurori, T.; Meltzer, H.; Ichikawa, J. (1999) Effects of antipsychotic drugs on extracellular dopamine levels in rat medial prefrontal cortex and nucleus Accumbens. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics,* 288:774-781

Lister, R. (1990) Ethologically based animal models of anxiety disorders. *Pharmacology & therapeutics,* 43(3):321-340

Lizasoain, I.; Moro, M.; Lorenzo, P. (2002) Cocaína, aspectos farmacológicos. *Adicciones,* 14(1) 57-64

Llosa, T. (1994) The standard low dose of oral cocaine used for treatment of cocaine dependence. *Substance Abuse,* 15(4):215-220

López-Hill, X., Prieto, J.P.; Meilkle, M.N.; Urbanavicius, J.; Prunell, G.; Abín-Carriquiry, A.; Umpierrez, E.; Scorza, MC. (2011) Coca-paste seized samples characterization: Chemical analysis, stimulating effect in rats and relevance of caffeine as a major adulterant. *Behavioural Brain Research,* 221:134-141

Lu, L.; Grimm, J.; Hope, B.; Shaham, Y. (2004) Incubation of cocaine craving after withdrawal: a review of pre-clinical data. *Neuropharmacology,* 47:214-226

Makris, N.; Gasic, G.; Seidman, L.; Goldstein, J.; Gastfriend, D.; Elman, I.; Albaugh, M.; Hodge, S., Ziegler, D.; Sheahan, F.; Caviness, V.; Tsuang, M.; Kennedy, D., Hyman, S., Rosen, B.; Breiter, H. (2004) Decreased absolute amygdala volume in cocaine addicts. *Neuron,* 44:729-740

Meikle, M.N., Urbanavicius, J., Prunell, G., Umpierrez, E., Abín-Carriquiry, A., Scorza, M.C. (2009) Primer estudio pre-clínico de la acción de la pasta base de cocaína en el sistema nervioso central. *Revista de Psiquiatría del Uruguay,* 73(1):25-36

Misra, L.; Narsimham, L.; Vadlamani, N.; Pontani, R. (1986) Effect of caffeine on cocaine locomotor stimulant activity in rats. *Pharmacology, Biochemistry and Behaviour,* 24:761-764

Moraes, M., Scorza, C., Abín-Carriquiry, J.A., Pascale, A., González, G., Umpiérrez,E. (2010) Consumo de pasta base de cocaína en Uruguay en el embarazo, su incidencia, características y repercusiones. *Archivos de Pediatría del Uruguay*, 81(2):100-104

Park, H.; Cui, F.; Hwang, J.; Kang, U. (2010) Effects of clozapine on behavioral sensitization induced by cocaine. *Psychiatry Research,* 175:165-170

Pascale, A.; Negrin, A.; Laborde, A. (2010) Pasta base de cocaína: experiencia del Centro de Información y Asesoramiento Toxicológico. *Adicciones*, 22(3):227-232

Pellow, S.; File, S. (1986) Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in an Elevated Plus-Maze: a novel test of anxiety in the rat. *Pharmacology, Biochemistry and Behaviour,* 24:525-529

Pérez, J. (2003) Clínica de la adicción a pasta base de cocaína. *Revista chilena de neuro-psiquiatría*, 41(1):55-63

Perrine, S.; Sheikh, I.; Nwaneshiudu, A.; Schroeder, J.; Unterwald, E. (2008) Withdrawal from chronic administration of cocaine decreases delta opioid receptor signaling and increases anxiety and depression-like behaviors in the rat. *Neuropharmacology,* 54:355-364

Pierce, C.; Kalivas, P. (1997) A circuitry model of the expression of behavioral sensitization to amphetamine-like psychostimulants. *Brain Research Reviews*, 25:192-216

Robinson, T.; Berridge, K. (1993) The neural basis of drug craving: an incentive-sensitization theory of addiction. *Brain Research Reviews,* 18:247-291

Robinson, T.; Kolb, B. (1999) Alterations in the morphology of dendrites and dendritic spines in the nucleus accumbens and prefrontal cortex following repeated treatment with amphetamine or cocaine. *European Journal of Neuroscience,* 11:1598-1604

Rodgers, R.; Cao, J.; Dalvi, A.; Holmes, A. (1997) Animal models of anxiety: an ethological perspective. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research,* 30:289-304

Rogerio, R.; Takahashi, R. (1992) Anxiogenic properties of cocaine in the rat evaluated with the elevated plus-maze. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 43:631-633

Russo, S.; Dietz, D.; Dumitriu, D.; Morrison, J.; Malenka, R.; Nestler, E. (2010) The addicted synapse: mechanisms of synaptic and structural plasticity in nucleus accumbens. *Trends in Neurosciences*, 33:267-276

Samaha, A.; Robinson, T. (2005) Why does the rapid delivery of drugs to the brain promote addiction? *TRENDS in Pharmacological Sciences*, 26(2):82-87

Sandford, J.; Argyropoulos, S.; Nutt, D. (2000) The psychobiology of anxiolytic drugs part 1: basic neurobiology. *Pharmacology and Therapeutics,* 88:197-212

Santucci, A.; Madeira, E. (2008) Anxiogenesis in adult rats treated chronically with cocaine during adolescence: effects of extended abstinence and 8-OH-DPAT treatment. *Brain Research Bulletin,* 76:402-411

Santucci, A.; Rosario, A. (2010) Anxiety-like responses in adolescent rats following a 10–11-day withdrawal period from repeated cocaine administration. *Brain Research Bulletin,* 81:441-444

Sarnyai, Z.; Bíró, E.; Gardi, J.; Vecsernyés, M.; Julesz, J.; Telegdy, G. (1995) Brain corticotropin-releasing factor mediates 'anxiety-like' behavior induced by cocaine withdrawal in rats. *Brain Research,* 675:89-97

Schmitt, U.; Hiemke, C. (1998a) Strain differences in open-field and elevated plus-maze behavior of rats without and with pretest handling. *Pharmacology Biochemistry and Behavior,* 59(4):807-811

Schmitt, U.; Hiemke, C. (1998b) Combination of open field and elevated plus-maze: a suitable test battery to asses strain as well as treatment differences in rat behavior. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 22:1197-1215

Sesack, S.; Grace, A. (2010) Cortico-basal ganglia reward network: microcircuitry. *Neuropsychopharmacology reviews,* 35:27-47

Shepherd, J.; Grewal, S.; Fletcher, A.; Bill, D.; Dourish, C. (1994) Behavioural and pharmacological characterisation of the elevated "zero-maze" as an animal model of anxiety. *Psychopharmacology,* 116:56-64

Solinas, M; Ferré, S.; You, Z.; Karcz-Kubicha, M.; Popoli, P.; Goldberg, S. (2002) Caffeine induces dopamine and glutamate release in the shell of the nucleus accumbens. *Journal of Neuroscience*, 22(15):6321-6324

Tran-Nguyen, L.; Fuchs, R.; Coffey, G.; Baker, D.; O'Dell, L.; Neisewander, J. (1998) Time-dependent changes in cocaine-seeking behavior and extracellular dopamine levels in the amygdala during cocaine withdrawal. *Neuropsychopharmacology*, 19(1):48-59

Weiss, S.; Wadsworth, G.; Fletcher, A.; Dourish, C. (1998) Utility of ethological analysis to overcome locomotor confounds in elevated maze models of anxiety. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews,* 23:265-271

Wobrock, T.; Soyka M. (2008) Pharmacotherapy of schizophrenia with comorbid substance use disorder. Reviewing the evidence and clinical recommendations. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry,* 32:1375-1385.

Wolf, M. (2010) The bermuda triangle of cocaine-induced neuroadaptations. *Trends in Neurosciences*, 33:391-398

Yacoubi, M.; Ledent, C.; Menard, J.; Parmentier, M:, Constentin, J.; Vaugeois, J. (2000a) The stimulant effects of caffeine on locomotor behaviour in mice are mediated through its blockade of adenosine A2A receptors. *British Journal of Pharmacology*, 129:1465-1473

Yacoubi, M.; Ledent, C.; Parmentier, M:, Constentin, J.; Vaugeois, J. (2000b) The anxiogenic-like effect of caffeine in two experimental procedures measuring anxiety in the mouse is not shared by selective A2A adenosine receptor antagonists. *Psychopharmacology,* 148:153–163

Yang, X.; Gorman, A.; Dunn, A.; Goeders, N. (1992) Anxiogenic effects of acute and chronic cocaine administration: neurochemical and behavioral studies. *Pharmacology, Biochemistry and Behaviour,* 41:643-650