

El modulador alostérico negativo de los mGluR5, MPEP, potencia la reinstauración de la preferencia condicionada inducida con *priming* de cocaína

The negative allosteric modulator of mGluR5, MPEP, potentiates the rewarding properties of cocaine in priming-induced reinstatement of CPP

CARMEN MANZANEDO*, ANA MATEOS-GARCÍA*, JOSÉ MIÑARRO*, M. CARMEN ARENAS*.

* Unidad de investigación Psicobiología de las Drogodependencias, Departamento de Psicobiología, Facultad de Psicología. Universitat de València, Valencia. España.

Resumen

La adicción a la cocaína es un trastorno crónico con un alto índice de recaídas; por tanto, es prioritario entender los mecanismos neurales implicados en la búsqueda de la droga durante la recaída para desarrollar farmacoterapias eficaces. El receptor metabotrópico 5 del glutamato (mGluR5) parece estar implicado en la reinstauración inducida por las claves asociadas a la cocaína. El objetivo principal de este estudio fue profundizar en el papel del receptor mGluR5 en la recaída en el consumo de cocaína, evaluando el efecto del MPEP, un modulador alostérico negativo del mGluR5, sobre la reinstauración inducida por un *priming* de cocaína en el paradigma del condicionamiento de la preferencia de lugar (CPL). Ratonos OF1 (48 machos y 48 hembras) fueron condicionados en el paradigma del CPL con cocaína (20 mg/kg) y expuestos a un programa de extinción. Cuando la extinción de la preferencia condicionada fue confirmada, se evaluó la eficacia del MPEP (30 mg/kg) para bloquear las sucesivas reinstauraciones mediante *priming* de cocaína en el CPL. La administración contingente de MPEP con la cocaína en el CPL incrementó la conducta de búsqueda de la droga y el número de reinstauraciones. Además, la administración solo de MPEP produjo reinstauración cruzada en el CPL inducido por cocaína. Por tanto, el MPEP no solo no previno, sino que incrementó las reinstauraciones de la preferencia condicionada inducida por *priming* de cocaína. Estos resultados pueden ayudar a entender el papel del mGluR5 en la recaída al consumo de cocaína.

Palabras clave: MPEP; Cocaína; CPL; Reinstauración; mGluR5.

Abstract

Cocaine addiction is a chronic disorder with high relapse rates; therefore, understanding the neuronal mechanisms underlying drug-seeking during relapse is a priority to develop targeted pharmacotherapy. The metabotropic glutamate receptor 5 (mGluR5) seems to be involved in the reinstatement induced by cocaine-associated cues. The main objective of the study was to evaluate the efficacy of MPEP, a negative allosteric modulator of mGluR5, in attenuating or potentiating the reinstatement induced by priming doses of cocaine in the CPP paradigm, ultimately to further knowledge regarding the role of the mGluR5 in relapse into cocaine abuse. OF1 mice (48 female and 48 male) were conditioned in the CPP paradigm with cocaine (20 mg/kg) and were exposed to an extinction program. We evaluated the efficacy of MPEP (30 mg/kg) in blocking the successive cocaine-priming reinstatements in the CPP when extinction of the conditioning preference was confirmed. MPEP did not block the reinstatement of priming cocaine-induced CPP, but increased the potential of cocaine for reinstating conditioning preference. The contingent administration of MPEP with cocaine increased the drug-seeking behaviour and the number of reinstatements with priming doses of cocaine. Moreover, MPEP produced cross reinstatement of cocaine-induced CPP. Rather than preventing the reinstatements of conditioned preference induced by priming doses of cocaine, MPEP increased them. These findings may help to understand the role of mGluR5 in the relapse into cocaine abuse.

Key Words: MPEP; Cocaine; CPP; Reinstatement; mGluR5.

Recibido: Marzo 2018; *Aceptado:* Diciembre 2018.

Enviar correspondencia a:

M. Carmen Arenas, Departamento de Psicobiología, Facultad de Psicología, Universitat de València, Avda. Blasco Ibáñez, 21, 46010 Valencia, Spain. Tel.: +34 96 386 4612; fax: +34 96 386 4668. E-mail: carmen.arenas@uv.es

La adicción a la cocaína es un trastorno con tasas de recaída altas (EMCDDA, 2016), y, a fecha de hoy, no hay ningún tratamiento aprobado para su tratamiento. Entender los mecanismos neuronales que subyacen la búsqueda de la droga durante la recaída es prioritario para desarrollar farmacología específica para la prevención (Georgiou et al., 2015; McReynolds, Peña, Blacktop y Mantsch, 2014).

Estudios preclínicos y clínicos sugieren que la transmisión glutamatérgica juega un papel importante en la búsqueda de la droga y en la recaída al abuso (véase revisiones de Cleva y Olive, 2012; Olive, 2009; Pomierny-Chamiólo et al., 2014). En particular, el receptor metabotrópico 5 del glutamato (mGluR5) está involucrado en la plasticidad sináptica (Brown et al., 2012; Schmidt y Pierce, 2010), y se ha sugerido que es necesario para la conducta de búsqueda de droga durante la recaída a la cocaína (Backstrom y Hyttia, 2006, 2007; Brown et al., 2012; Keck et al., 2014; Kumaresan et al., 2009; Schmidt, Kimmey, Arreola y Pierce, 2015). Recientemente, se han observado numerosas alteraciones en la densidad y la afinidad de los receptores mGlu5 en las estructuras cerebrales en ratas, en el estriado dorsal y la corteza del núcleo accumbens (NAcc), después de administrarles cocaína, cambios relacionados con las propiedades farmacológicas o motivacionales de la droga (Pomierny-Chamiólo, Miszkiel, Frankowska, Bystrowska y Filip, 2017). En particular, el MPEP (2-metil-6-(fenil etanol)-piridina), un modulador alostérico negativo de mGluR5 (Olive, 2009), es un ligando activo es un ligando activo que administrado a nivel sistémico provoca un potente y selectivo antagonismo, no competitivo, de los mGluR5 (Gasparini et al., 1999; Pomierny-Chamiólo et al., 2014), y que ha mostrado ser eficaz para reducir el consumo, el refuerzo y la recaída a la cocaína. (Li et al., 2018). Una revisión sistemática reciente concluyó que el MPEP reduce la autoadministración de cocaína, como muestra de su potencial terapéutica para el tratamiento de trastornos adictivos (Mihov y Hasler, 2016). La inyección sistemática de MPEP atenuó la reinstauración inducida tanto por *priming* como por claves de cocaína (Backstrom y Hyttia, 2006; Kumaresan et al., 2009), nicotina (Bespalov et al., 2005) y alcohol (Backstrom, Bachteler, Koch, Hyttia y Spanagel, 2004) en ratas con el modelo de autoadministración. No están claros los mecanismos que subyacen esta reducción en la autoadministración de drogas. Tratamiento con MPEP aumentó el potencial de drogas –como la ketamina, heroína, nicotina y cocaína– para inducir condicionamiento de la preferencia de lugar (CPL) en ratas (Rutten, Van der Kam, De Vry, Bruckmann y Tzschentke, 2011; Van der Kam, De Vry y Tzschentke, 2009a). Por ello, se ha sugerido que el MPEP reduce la autoadministración de drogas al aumentar los efectos de recompensa de las mismas (Van der Kam et al., 2009a; Van der Kam, De Vry y Tzschentke, 2009b). De manera específica, se probó el efecto de MPEP en la adquisición de CPL inducido por varias dosis de co-

caína, y resultó que la administración de MPEP, antes de la droga, redujo la dosis mínima necesaria para inducir un CPL estadísticamente significativo a la mitad de su valor (Rutten et al., 2011). No obstante, y hasta la fecha, no se ha sometido a prueba los efectos de MPEP en la reinstauración del CPL mediante *priming* de cocaína. En la evaluación de la recaída a las drogas, se utilizan principalmente dos modelos de reinstauración. Uno basado en la autoadministración operante y otro en el condicionamiento clásico, en la cual la preferencia por un entorno emparejado con una droga también se puede extinguir y posteriormente reinstaurar mediante inyecciones de *priming* de las drogas (Manzanedo, Aguilar, Rodríguez-Arias y Miñarro 2001a). Aunque el CPL evalúa la recompensa de las drogas de manera diferente, los resultados aportan información complementaria a la aportada por el paradigma de la autoadministración (Aguilar, Rodríguez-Arias y Miñarro, 2009; Sanchis-Segura y Spanagel, 2006; Tzschentke, 2007).

Por estas razones, este estudio tuvo como fin evaluar la eficacia de MPEP, un modulador alostérico negativo de mGluR5, para atenuar o potenciar la recompensa inducida por dosis de *priming* de cocaína en el paradigma del CPL, con el objetivo final de ampliar el conocimiento del papel de mGluR5 en la recaída al consumo de cocaína.

Materiales y método

Sujetos

Usamos 48 hembras y 48 machos de ratones OF1 (Charles River, Francia). Los animales llegaron al laboratorio en el día posnatal (DPN) 42, y fueron alojados en grupos de cuatro en jaulas de plástico (28 cm de longitud × 28 cm de anchura × 14,5 cm altura) en las siguientes condiciones: temperatura constante (21 ± 2 °C), humedad relativa de 60%, ciclo de luz de 12h no-invertida (luces encendidas desde las 8h hasta las 20h), y con disponibilidad *ad libitum* de comida y agua (exceptuando los periodos de pruebas comportamentales). Los procedimientos que involucran a ratones y sus cuidados fueron implementados en conformidad con legislaciones y reglamentos nacionales, regionales y locales, en cumplimiento de la Directiva 2010/63/UE del Parlamento Europeo y el Consejo de 22 de septiembre de 2010 relativa a la protección de animales utilizados para fines científicos. El Comité de uso y cuidados de animales de la Universidad de Valencia aprobó este estudio (2015/VSC/PEA/00103).

Drogas

Clorhidrato de cocaína (Laboratorios Alcaliber S. A. Madrid, España) en dosis de 20 mg/kg (adquisición de CPL) y en dosis de 10, 5, 2,5, 1,25 o 0,625 mg/kg (prueba de reinstauración), y MPEP (Research Biochemicals International, Natick, EE.UU.) en dosis de 30, 15, 7,5, 3,25 o 1,625 mg/kg (prueba de reinstauración) fueron diluidos en suero fisiológico (0,9% NaCl) y administrados mediante inyección

intraperitoneal en un volumen de 0,01 ml/g (Manzanedo, Aguilar, Miñarro y Rodríguez-Arias, 2011). Los grupos de control fueron inyectados con suero fisiológico.

Aparatos

Las ocho cajas idénticas de metacrilato usadas para la prueba de preferencia de lugar (CPL) tenían dos compartimentos de tamaño idéntico (30,7 cm longitud × 631,5 cm anchura × 634,5 cm altura) separados por una zona central gris (13,8 cm longitud × 631,5 cm anchura × 634,5 cm altura). Los compartimentos tenían paredes de colores diferentes (negro o blanco) y texturas de suelo diferentes (rejilla estrecha en el compartimento negro y rejilla ancha en el compartimento blanco). Cuatro haces de luz infrarroja en cada compartimento de la caja y seis en la zona central permitían registrar la posición del animal y sus cruces entre los compartimentos. Los equipos fueron controlados por dos ordenadores IBM con software MONPRE 2Z (CIBERTEC, SA, España).

Procedimientos y diseño experimental

La reinstauración de la preferencia de lugar condicionada por drogas descrita en Aguilar et al. (2009) fue el modelo de animal que usamos para medir la recaída. La versión del modelo de reinstauración del CPL consta de tres fases, la adquisición, la extinción y la reinstauración de la preferencia mediante *priming* con drogas (Blanco-Gandía, Aguilar, Miñarro y Rodríguez-Arias, 2018).

Adquisición del CPL: El procedimiento, sin sesgos en cuanto a preferencia espontánea inicial, fue seguido como descrito anteriormente (Manzanedo, Aguilar, Rodríguez-Arias y Miñarro, 2001b). En resumen, tras un periodo de adaptación mínimo de 5 días (a partir de DPN 47), los animales fueron manipulados brevemente en cada uno de los 3 días previos al inicio del CPL, compuesto de tres fases. En la primera fase de Pre-condicionamiento (Pre-C), se permitió a los animales acceso a ambos compartimentos de los aparatos durante 15 minutos (900 segundos) por día durante 3 días consecutivos. El día 3, registramos los tiempos que cada animal pasó en cada compartimento durante 900 segundos. Un total de 4 ratones machos mostró una aversión fuerte no condicionada (menos del 33% de la duración de la sesión) o preferencia (más de 67%) por uno de los compartimentos y, por tanto, fueron excluidos del estudio. En cada grupo, la mitad de los animales recibió la droga o vehículo en un compartimento y la otra mitad en el otro compartimento. Establecimos cuatro grupos para condicionamiento: dos con cocaína (Coc-hembras n = 37 y Coc-machos n = 33) y dos con suero fisiológico (grupos de control: Sal-hembras n = 11 y Sal-machos n = 11). Después de asignar los compartimentos, un análisis de varianza mostró que no había diferencia significativa entre el tiempo pasado en los compartimentos emparejados vs. no emparejados con la administración de la droga durante la fase Pre-C [$F(1,90) =$

2,103; $p < ,150$]. En una segunda fase (Condicionamiento), los animales fueron condicionados con cocaína o suero fisiológico mediante cuatro emparejamientos con el compartimento respectivo, en dos emparejamientos diarios. Se les inyectó a los animales 20 mg/kg de cocaína (grupo experimental) o suero fisiológico (grupo de control) e, inmediatamente después, fueron confinados al compartimento emparejado con la droga durante 30 minutos. Posteriormente, tras un intervalo de 4h, se les inyectó suero fisiológico inmediatamente antes de ser confinados en los compartimentos emparejados con vehículo durante 30 minutos. La zona central quedaba inaccesible durante el condicionamiento mediante la bajada de puertas de guillotinas. Durante la tercera fase de post-condicionamiento (Post-C), quitamos las puertas de guillotina que separaban los dos compartimentos y registramos el tiempo empleado por los ratones no tratados en cada compartimento durante 900 segundos. La diferencia, en segundos, entre el tiempo empleado en el compartimento emparejado con droga durante la prueba Post-C y el tiempo empleado en el mismo compartimento durante la prueba Pre-C se considera una medida del grado de condicionamiento inducido por la droga. Si la diferencia es positiva, entonces la droga ha inducido una preferencia por el compartimento emparejado con droga, mientras que lo opuesto indica el desarrollo de una aversión.

Extinción de CPL (Extinc): Después de la prueba Post-C, dos veces por semana, los ratones tuvieron una sesión de extinción, que consistía en dejar a los animales en el aparato (sin separar los compartimentos con las puertas de guillotina) durante un periodo de 15 minutos hasta que el tiempo empleado en el compartimento emparejado con droga por cada grupo de animales fuese similar al registrado durante la sesión Pre-C. La extinción del CPL siempre se confirmaba en una sesión subsecuente realizada 24h después de la última sesión de extinción. Por tanto, todos los animales de cada grupo tuvieron el mismo número de sesiones de extinción, con independencia de sus puntuaciones individuales, dado que el criterio de extinción era una ausencia de diferencias significativas respecto de los valores Pre-C del grupo. Los grupos de control fueron sometidos al mismo protocolo de extinción y número de sesiones. Se consideró ocurrida la extinción del condicionamiento cuando no hubo diferencia significativa en el tiempo empleado en el lugar asociado con la administración de cocaína, en comparación con el Pre-C, pero sí hubo diferencias con el Post-C.

Reinstauración de CPL (Reinst): Los efectos de la dosis de *priming* de cocaína, MPEP, o cocaína + MPEP fueron evaluados 24 horas después de confirmar la extinción. Las pruebas de reinstauración fueron igual a las realizadas en el Post-C (ambulacion libre durante 15 minutos), exceptuando que los animales fueron sometidos al test 30 minutos tras la administración de MPEP y/o 15 minutos tras la administración de cocaína, según el tratamiento corres-

pondiente. Se consideró que la reinstauración de la preferencia inducida por la cocaína se había producido cuando el tiempo que cada animal empleó en el compartimento emparejado con cocaína era significativamente más alto en la prueba Reinst, en comparación con las fases Pre-C y Extinc. Al lograr reinstaurar la preferencia, tras un proceso subsiguiente de extinción, se realizó una prueba nueva de reinstauración con dosis progresivamente más bajas de la droga (la mitad de la dosis usada en el *priming* previo).

Cuando se confirmó la extinción de los grupos condicionados con cocaína después de 21 sesiones para las hembras o 19 sesiones para los machos, los ratones fueron agrupados en seis grupos (tres hembras y tres machos) según el tratamiento que iban a recibir durante la prueba de reinstauración de la preferencia condicionada. Además, los grupos de control (condicionados con suero fisiológico) recibieron cocaína 10 mg/kg en la prueba de reinstauración. Por tanto, se establecieron los siguientes grupos experimentales: Sal-Coc (hembras $n = 11$ y machos $n = 11$), Coc-Coc (hembras $n = 12$ y machos $n = 11$), Coc-MPEP ($n = 12$ hembras y $n = 11$ machos), y Coc-Coc+MPEP (hembras $n = 13$ y machos $n = 11$). Las dosis de las drogas usadas para *priming* fueron: cocaína 10 y/o MPEP 30 (Reinst 1); cocaína 5 y/o MPEP 15 (Reinst 2); cocaína 2,5 y/o MPEP 7,5 (Reinst 3); cocaína 1,25 y/o MPEP 3,25 (Reinst 4); cocaína 0,625 y/o MPEP 1,625 (Reinst 5).

Análisis estadístico

Analizamos el tiempo empleado en los compartimentos emparejados con drogas durante el condicionamiento pre- y post- mediante un análisis de varianza (ANOVA) con dos variables entre –sexo, con dos niveles (hembra o macho) y condicionamiento, con dos niveles (suero fisiológico o cocaína 20 mg/kg)– y un variable dentro –días, con dos niveles (Pre-C, Post-C)–. Para evaluar el efecto del tratamiento que los animales recibieron en la prueba de reinstauración, realizamos un ANOVA con dos variables entre –sexo, con dos niveles (hembra o macho) y tratamiento, con tres niveles (cocaína 10 mg/kg, cocaína 10 mg/kg más MPEP 30 mg/kg, y MPEP 30 mg/kg)– y un variable entre –días, con cuatro niveles (Pre-C, Post-C, Extinct1 y Reinst1)–. Usamos la prueba *t* de Student con muestras emparejadas para determinar la extinción de la preferencia condicionada en cada grupo y la reinstauración mediante una dosis de droga de *priming*. Realizamos la prueba de Bonferroni para comparaciones post hoc de las ANOVA. Usamos el Paquete Estadístico para Ciencias Sociales (SPSS) 20.0 para Windows (Systat Software Inc., Chicago, IL, EE.UU.) para todos los análisis.

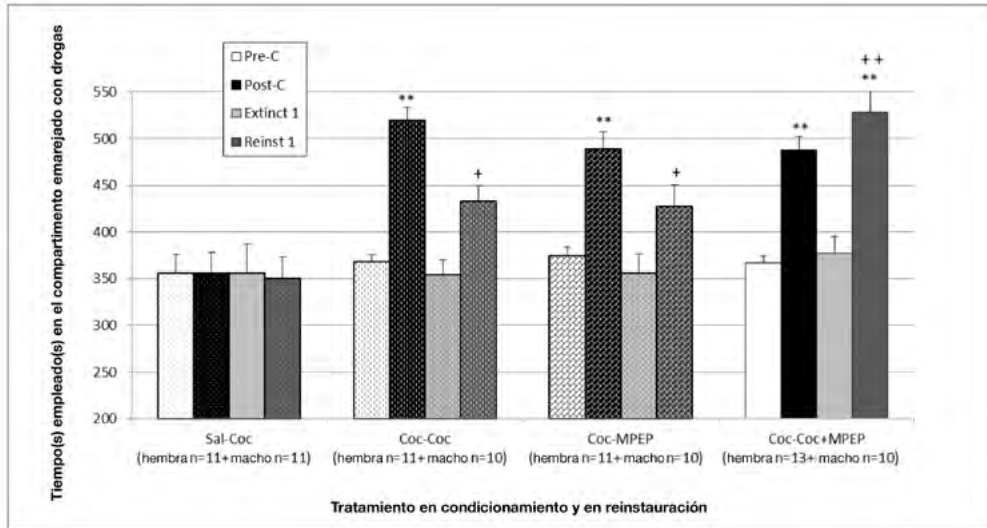
Resultados

El ANOVA para evaluar las diferencias de sexo en el efecto reforzante condicionado de la cocaína reveló un efecto principal de días [$F(1,88) = 31,395$; $p < ,0001$], un

efecto de la interacción días*condicionamiento [$F(1,88) = 31,009$; $p < ,0001$] y un efecto significativo de la interacción días*condicionamiento*sexo [$F(1,88) = 3,792$; $p < ,05$]. Los animales (ambos hembras y machos) que recibieron cocaína mostraron un CPL ($p < ,0001$), que no fue observado en los que recibieron suero fisiológico. Además, los ratones machos permanecieron más tiempo en el compartimento asociado con cocaína, en comparación con los ratones hembras ($p < ,022$).

El ANOVA para evaluar el efecto del tratamiento sobre la prueba de reinstauración mostró un efecto significativo de la variable días [$F(1,79) = 4,742$; $p < ,03$] y la interacción días*tratamiento [$F(3,79) = 3,668$; $p < ,01$], fusionando a machos y hembras juntos en los mismos grupos (Figura 1), no observando diferencias significativas de la variable sexo o de sus interacciones. La distribución de los grupos para tratamiento en Reinst-1 fue homogénea, dada la ausencia de diferencias significativas entre los grupos condicionados con cocaína 20 mg/kg en las pruebas Pre-C, Post-C y Extinct-1. Como esperábamos, los grupos condicionados con suero fisiológico (grupos de control) no mostraron una preferencia condicionada por algún compartimento después de la administración de cocaína 10 mg/kg en la prueba Reinst-1. Sin embargo, el *priming* de cocaína en la prueba Reinst-1 aumentó de forma significativa el tiempo empleado por los animales en el compartimento emparejado con droga en el grupo Coc-Coc, comparado con la prueba Extinct-1 ($p < ,01$), y en el grupo tratado con MPEP 30 mg/kg, en comparación con las pruebas Extinct-1 y Pre-C (Coc-Coc+MPEP, $ps < ,0001$). Es más, la administración de solo MPEP también reinstauró el CPL, dado que aumentó el tiempo empleado por los animales en el compartimento emparejado con droga, en comparación con la prueba Extinct-1 (Coc-MPEP, $p < ,01$) (Figura 1).

La Figura 2 muestra los resultados de las extinciones sucesivas y las pruebas de reinstauración en los grupos condicionados con cocaína, separados por sexo, dadas las diferencias entre hembras y machos en las reinstauraciones. Una vez extinguida la preferencia después de Reinst-1 en cada grupo (prueba Extinct-2), un *priming* de cocaína 5 mg/kg reinstauró CPL en machos Coc-Coc [Extinct-2 vs. Reinst-2: $t(8) = -2,561$; $p < ,034$], pero no en hembras. Los machos de este grupo no lograron la reinstauración de la preferencia de nuevo con una dosis de 2,5 mg/kg. Tras sus extinciones correspondientes, las hembras del grupo Coc-MPEP mostraron preferencia con solo un *priming* de MPEP 15 mg/kg [Extinct-2 vs. Reinst-2: $t(11) = -3,363$; $p < ,006$]; no fue el caso con los ratones machos. La administración de MPEP 7,5 mg/kg no reinstauró la preferencia en hembras de nuevo (Reinst-3). Tras sus extinciones correspondientes, los grupos Coc-Coc+MPEP mostraron preferencia con un *priming* de cocaína 5 mg/kg más MPEP 15 mg/kg [Extinct-2 vs. Reinst-2: hembras $t(11) = -3,965$; $p < ,002$; y machos $t(8) = -2,460$; $p < ,039$], con *priming* de cocaína



Nota. **p < ,001 vs. Pre-C. + p < ,05 ++ p < ,001 vs. Extinct 1.

Figura 1. Efecto de MPEP en la reinstauración de CPL inducido por cocaína. Las barras Coc-MPEP representan el tiempo medio (±SEM) empleado en el compartimento emparejado con droga antes de las sesiones de condicionamiento (blanco), después de las sesiones de condicionamiento (negro), cuando hubo extinción (punteado) y después de *priming* con cocaína, MPEP o cocaína más MPEP (gris).

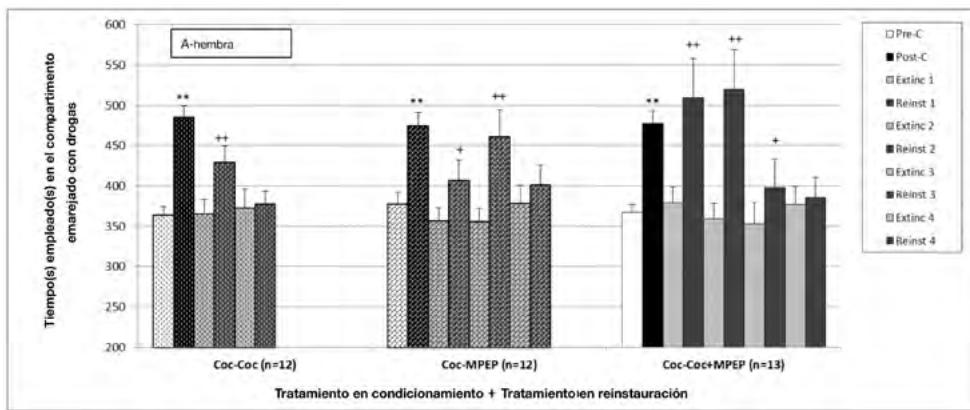


Figura 2A.

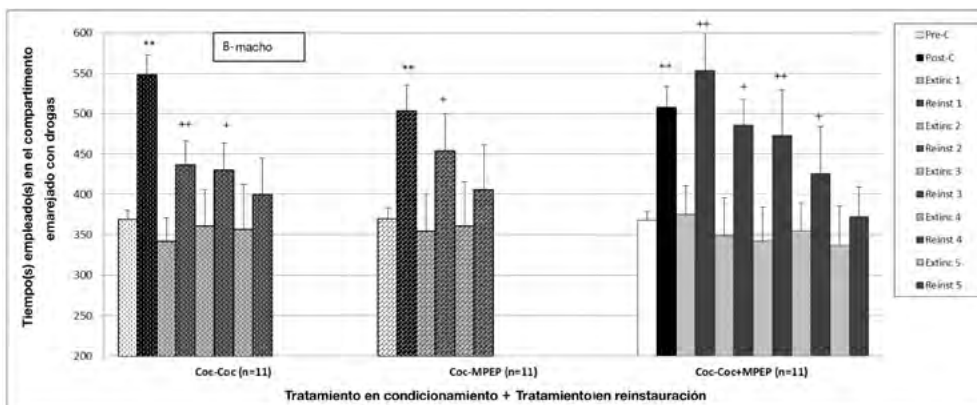


Figura 2B.

Nota. **p < ,001 vs. Pre-C. +p < ,05 and ++p < ,01 vs. Extinc. previo
 Dosis en mg/kg en cada reinstauración: Reinst 1: cocaína 10 y/o MPEP 30; Reinst 2: cocaína 5 y/o MPEP 15; Reinst 3: cocaína 2.5 y/o MPEP 7.5; Reinst 4: cocaína 1.25 y/o MPEP 3.75; Reinst 5: cocaína 0.625 y/o MPEP 1,875

Figura 2. Efectos de *priming* con cocaína, Cocaína más MPEP o MPEP por sí mismo en la reinstauración de CPL inducido por cocaína en ratones hembras (A) y machos (B). Las barras representan el tiempo medio (±SEM) empleado en el compartimento emparejado con droga antes de las sesiones de condicionamiento (blanco), después de las sesiones de condicionamiento (negro), cuando hubo extinción (punteado) y cada reinstauración (gris).

2,5 mg/kg más MPEP 7,5 mg/kg [Extinct-3 vs. Reinst-3: hembras $t(11) = 0,851$; $p < ,001$; y machos $t(8) = -3,004$; $p < ,017$], y con *priming* de cocaína 1,25 mg/kg más MPEP 3,25 mg/kg solo en ratones machos [Extinct-4 vs. Reinst-4: $t(8) = -3,177$; $p < ,013$]. La administración de cocaína 0,625 mg/kg más MPEP 1,875 mg/kg no reinstauró la preferencia en machos de nuevo (Reinst-5).

El número de sesiones requeridas para lograr la extinción de la preferencia condicionada antes de cada reinstauración fue, en el caso de las hembras: grupo Coc-Coc, 7 sesiones; grupo Coc-MPEP, 2 y 5 sesiones; grupo Coc-Coc+MPEP, 2, 2, y 2 sesiones; y en el caso de los machos: grupo Coc-Coc, 4 y 3 sesiones; grupo Coc-MPEP, 10 sesiones; grupo Coc-Coc+MPEP, 3, 3, 5 y 2 sesiones.

Discusión

Que sepamos, esta es la primera vez que se evalúan los efectos de MPEP, un modulador alostérico negativo de mGluR5, en la reinstauración del CPL inducido por cocaína en ratones hembras y machos. Nuestros resultados muestran que el MPEP no bloqueó la reinstauración del CPL inducido mediante *priming* de cocaína, pero sí aumentó la potencia de la cocaína para reinstaurar la preferencia de condicionamiento. La administración de MPEP junto con una dosis de *priming* de cocaína produjo un mayor número de reinstauraciones que la administración de una única dosis de *priming* de cocaína, dado que el MPEP causó dosis de cocaína inefectivas para inducir la reinstauración de la preferencia condicionada. Es más, el MPEP también produjo una reinstauración cruzada con el CPL inducido por cocaína en ambos machos y hembras.

En este trabajo, la administración de una dosis de *priming* de cocaína 10 mg/kg reinstauró, como esperábamos, la preferencia condicionada, en línea con estudios anteriores (Bracci et al., 2013; Rodríguez-Arias, Castillo, Daza-Losada, Aguilar y Miñarro, 2009; Titomanlio et al., 2013). No obstante, El MPEP, no solo no inhibió la reinstauración del CPL inducido por una dosis de *priming* de cocaína, sino que causó reinstauración en la conducta de búsqueda de droga con dosis de *priming* mucho más bajas de cocaína (2,5 mg/kg), lo que no causó la reinstauración de la preferencia condicionada cuando la cocaína se administraba sola. Por tanto, la administración de MPEP antes de cocaína ha mostrado un aumento de los efectos de la dosis de *priming* de cocaína. Estos resultados son coherentes con otros estudios (Rutten et al., 2011; Van der Kam et al., 2009a; 2009b) que propusieron que MPEP no bloqueaba los efectos de refuerzo de las drogas sometidas a prueba en el paradigma de CPL, sino que potenciaba sus propiedades de recompensa. MPEP potenció la adquisición de CPL inducido por drogas adictivas con mecanismos de acción diferentes, tales como ketamina, heroína (Van der Kam et al., 2009a), nicotina y cocaína (Rutten et al., 2011); demo-

stró la extinción del CPL inducido por la ketamina y reinstauró el CPL inducido por ambos ketamina y heroína en ratas (Van der Kam et al., 2009a).

Es más, los resultados de este estudio muestran que MPEP, por sí mismo, induce la reinstauración de la preferencia extinguida del CPL inducido por cocaína con dosis de 30, 15 y 7,5 mg/kg, lo que indica una reinstauración cruzada. Dicho efecto de MPEP en la reinstauración de la preferencia condicionada también fue observado en el CPL inducido por ambos ketamina y heroína en ratas (Van der Kam et al., 2009a). Estudios anteriores han reportado la ausencia del efecto de recompensa de 30 mg/kg MPEP en ratones, dado que la administración mediante inyección intraperitoneal de MPEP no indujo un desarrollo del CPL de por sí (Herzig, Capuani, Kovar y Schmidt, 2005; Popik y Wrobel, 2002). No obstante, nuestros resultados revelan una reinstauración cruzada con esta dosis de MPEP después del condicionamiento con cocaína, incluso con dosis menores. De manera similar, otro estudio mostró que la administración mediante inyección intraperitoneal de MPEP (3 y 10 mg/kg) indujo el CPL (Van der Kam et al., 2009b), lo que indica que el MPEP presenta propiedades de recompensa de por sí, como confirman nuestros resultados. Se ha mostrado que la administración de MPEP aumenta los niveles de dopamina (DA) en el córtex prefrontal medial y en el núcleo accumbens (Chau, Soderpalm y Ericson, 2011; Homayoun, Stefani, Adams, Tamagan y Moghaddam, 2004). El MPEP podría estimular el sistema de DA al activar los receptores de glicina (Chau et al., 2011) o al inhibir la actividad de la monoamino oxidasa A (MAO-A) (Schmidt y Pierce, 2010). Estas acciones sobre el sistema de DA podrían explicar por qué el MPEP aumenta los efectos de la cocaína y también produce una reinstauración cruzada, como se ha observado en este estudio.

Además, los resultados de este estudio han mostrado diferencias de sexo en el CPL inducido por cocaína. Ratones machos mostraron una preferencia condicionada inducida por la cocaína (20 mg/kg) más alta que las hembras, dado que pasaron significativamente más tiempo en el compartimento emparejado con droga en la prueba Post-C. Esta diferencia de sexo en el paradigma CPL, que no había sido observado en estudios anteriores (Bobzean, Dennis, Addison y Perrotti, 2010; Hilderbrand y Lasek, 2014; Mateos-García et al., 2015), puede deberse al número elevado de sujetos usados por grupo ($n > 30$). No obstante, esta preferencia más alta en los machos también se observó en el número más elevado de reinstauración en la preferencia condicionada con dosis de cocaína menores. Estos resultados parecen acordes con otros resultados que mostraron que los machos necesitan más tiempo para extinguir el CPL inducido por cocaína que sus contrapartes hembras (Hilderbrand y Lasek, 2014). El estudio de las diferencias por sexo es un campo emergente (Bobzean, Dennis y Perrotti, 2014), y estas diferencias se han observado en cada fase del proceso de adicción. Tienen robustez y fiabi-

lidad, se han observado en especies diferentes, tales como roedores y humanos, pero dependen de muchos factores (Carroll y Lynch, 2016). En general, es más probable que las diferencias por sexo se observen bajo algunas condiciones determinadas, tales como menor dosis de la droga o, en este caso, con un número elevado de sujetos evaluados (Hilderbrand y Lasek, 2014).

Se ha sugerido una acción potencialmente terapéutica de los moduladores alostéricos negativos, como MPEP (Mihov y Hasler, 2016), porque esta droga reduce la autoadministración de cocaína en dosis que no impiden la autoadministración de alimentación. De manera específica, el MPEP atenuó, de forma significativa, la reinstauración de la búsqueda de cocaína en el paradigma de autoadministración tanto cuando estaba inducido por claves asociadas con la droga (Backstrom y Hyytia, 2006; Li et al., 2018) como por una inyección de *priming* con cocaína (Kumaresan et al., 2009; Lee, Platt, Rowlett, Adewale y Spealman, 2005; Li et al., 2018), sin afectar los refuerzos naturales, tales como la comida o la sacarosa (Herzig et al., 2005). Parece ser que su acción sobre él subyacen estos resultados, porque la administración de MPEP directamente al NAcc atenuó la reinstauración de la búsqueda de droga inducida por *priming* de cocaína (Schmidt et al., 2015). Es conocido el papel del sistema glutamatérgico en la reinstauración de la conducta de búsqueda de drogas cuando fue inducida por *priming* de cocaína. La estimulación de las neuronas piramidales glutamatérgicas desde el córtex prefrontal medial hasta el NAcc parece promover la reinstauración de la búsqueda de droga cuando fue inducida por *priming* de cocaína (Schmidt y Pierce, 2010). De manera específica, los receptores mGlu5 presentes en el NAcc han sido implicados en los efectos de recompensa de la cocaína (Pomierny-Chamiólo et al., 2014; 2017; Li et al., 2018). Recientemente, se ha mostrado que la reducción de la autoadministración de cocaína inducida por MPEP está asociada con el aumento del glutamato extracelular en el NAcc mediante un mecanismo retrógrado de los receptores eCB-CB1. Por tanto, se especula que un mecanismo presináptico glutamato/CB1 puede ser la causa de los efectos terapéuticos anti-cocaína de los antagonistas mGluR5 en modelos de recaída a las drogas con animales (Li et al., 2018). No obstante, el uso de MPEP como tratamiento para la adicción parece ser no recomendable, posiblemente debidos a su acción como antagonista de los receptores NMDA y como inhibidor de la monoamino oxidasa A (Schmidt y Pierce, 2010). Es más, estudios que usan el paradigma CPL parecen demostrar la falta de eficiencia de MPEP para disminuir la conducta de búsqueda de droga, a la vez de aumentar los efectos de recompensa de las drogas, como sugieren nuestros resultados con cocaína. Esto también parece apoyar la hipótesis, anteriormente propuesta por Van der Kam et al. (2009a; 2009b), que el MPEP reduce la autoadministración de drogas adictivas por su acción reforzante.

En conclusión, nuestros resultados han mostrado que no solo el MPEP no solo no reduce los efectos asociativos de cocaína con claves del entorno en el CPL, sino que, en realidad, los aumenta. Este efecto de refuerzo no solo se limita a la cocaína, dado que parece afectar a otras drogas de abuso con mecanismos diferentes (Rutten et al., 2011), y también parece ser capaz de inducir el CPL de por sí (Van der Kam et al., 2009b). Por tanto, estos hallazgos no apoyan el uso de moduladores alostéricos negativos mGluR5, o al menos de MPEP, para el tratamiento contra la recaída a la cocaína.

Agradecimientos



Deseamos expresar nuestra gratitud a Guillermo Chuliá por editar este manuscrito. Este estudio ha recibido las siguientes ayudas a la investigación: Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO), Dirección General de Investigación, PSI2014-51847-R, PSICO2015-69649-R; Instituto de Salud Carlos III, Red de Trastornos Adictivos (RTA) RD16/0017/0007 y Unión Europea, Fondos FEDER “una manera de hacer Europa”.

Conflicto de intereses

Los autores declaran la inexistencia de conflicto de intereses.

Referencias

- Aguilar, M.A., Rodríguez-Arias, M. y Miñarro, J. (2009). Neurobiological mechanisms of the reinstatement of drug-conditioned place preference. *Brain Research Review*, 59, 253-277. doi:10.1016/j.brainresrev.2008.08.002.
- Backstrom, P. y Hyytia, P. (2006). Ionotropic and metabotropic glutamate receptor antagonism attenuates cue-induced cocaine seeking. *Neuropsychopharmacology*, 31, 778-786. doi:10.1038/sj.npp.1300845.
- Backstrom, P. y Hyytia, P. (2007). Involvement of AMPA/kainate, NMDA, and mGlu5 receptors in the nucleus accumbens core in cue-induced reinstatement of cocaine seeking in rats. *Psychopharmacology (Berl)*, 192, 571-580. doi:10.1007/s00213-007-0753-8.
- Backstrom, P., Bachteler, D., Koch, S., Hyytia, P. y Spanagel, R. (2004). mGluR5 antagonist MPEP reduces ethanol-seeking and relapse behavior. *Neuropsychopharmacology*, 29, 921-928. doi:10.1038/sj.npp.1300381.
- Bespalov, A. Y., Dravolina, O. A., Sukhanov, I., Zakharova, E., Blokhina, E., Zvartau, E., ... Markou, A. (2005). Metabotropic glutamate receptor (mGluR5) antagonist MPEP attenuated cue- and schedule-induced reinstatement of nicotine self-administration behavior in rats.

- Neuropharmacology*, 49, Suppl 1, 167-178. doi:10.1016/j.neuropharm.2005.06.007.
- Blanco-Gandía, M. C., Aguilar, M. A., Miñarro, J. y Rodríguez-Arias, M. (2018). Reinstatement of Drug-seeking in Mice Using the Conditioned Place Preference Paradigm. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, 136, 56983. doi: 10.3791/56983.
- Bobzean, S. A., Dennis, T. S., Addison, B. D. y Perrotti, L. I. (2010). Influence of sex on reinstatement of cocaine-conditioned place preference. *Brain Research Bulletin*, 83, 331-336. doi:10.1016/j.brainresbull.2010.09.003.
- Bobzean, S. A., Dennis, T. S. y Perrotti, L. I. (2014). Acute estradiol treatment affects the expression of cocaine-induced conditioned place preference in ovariectomized female rats. *Brain Research Bulletin*, 103, 49-53. doi:10.1016/j.brainresbull.2014.02.002.
- Bracci, A., Daza-Losada, M., Aguilar, M., De Feo, V., Miñarro, J. y Rodríguez-Arias, M. (2013). A methanol extract of *brugmansia arborea* affects the reinforcing and motor effects of morphine and cocaine in mice. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 482976. doi:10.1155/2013/482976.
- Brown, R. M., Mustafa, S., Ayoub, M. A., Dodd, P. R., Pflieger, K. D. y Lawrence, A. J. (2012). mGlu5 receptor functional interactions and addiction. *Frontiers in Pharmacology*, 3, 84, 1-9. doi:10.3389/fphar.2012.00084.
- Carroll, M. E. y Lynch, W. J. (2016). How to study sex differences in addiction using animal models. *Addiction Biology*, 21, 1007-1029. doi:10.1111/adb.12400.
- Chau, P., Soderpalm, B. y Ericson, M. (2011). The mGluR5 antagonist MPEP elevates accumbal dopamine and glycine levels; interaction with strychnine-sensitive glycine receptors. *Addiction Biology*, 16, 591-599. doi:10.1111/j.1369-1600.2011.00343.x.
- Cleva, R. M. y Olive, M. F. (2012). mGlu receptors and drug addiction. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Membrane Transport and Signaling*, 1, 281-295.
- EMCDDA. (2016). European Drug Report 2016: Trends and Developments. ISBN: 978-92-9168-890-6.
- Gasparini, F., Lingenhöhl, K., Stoehr, N., Flor, P. J., Heinrich, M., Vranesic, I., ... Kuhn, R. (1999). 2-Methyl-6-(phenylethynyl)-pyridine (MPEP), a potent, selective and systemically active mGlu5 receptor antagonist. *Neuropharmacology*, 38, 1493-1503. doi:10.1016/S0028-3908(99)00082-9.
- Georgiou, P., Zanos, P., Ehteramy, M., Hourani, S., Kitchen, I., Maldonado, R. y Bailey, A. (2015). Differential regulation of mGlu5 R and MOPr by priming- and cue-induced reinstatement of cocaine-seeking behaviour in mice. *Addiction Biology*, 20, 902-912. doi:10.1111/adb.12208.
- Herzig, V., Capuani, E. M., Kovar, K. A. y Schmidt, W. J. (2005). Effects of MPEP on expression of food, MDMA- or amphetamine-conditioned place preference in rats. *Addiction Biology*, 10, 243-249. doi: 10.1080/13556210500223272
- Homayoun, H., Stefani, M. R., Adams, B. W., Tamagan, G. D. y Moghaddam, B. (2004). Functional interaction between NMDA and mGLU5 receptors: Effects on working memory, instrumental learning, motor behaviors, and dopamine release. *Neuropsychopharmacology*, 29, 1259-1269. doi:10.1038/sj.npp.1300417.
- Hilderbrand, E. R. y Lasek, A. W. (2014). Sex differences in cocaine conditioned place preference in C57BL/6J mice. *Neuroreport*, 25, 105-109. doi:10.1097/WNR.0000000000000053.
- Keck, T. M., Zou, M. F., Bi, G. H., Zhang, H. Y., Wang, X. F., Yang, H. J., ... Newman, A. H. (2014). A novel mGluR5 antagonist, MFZ 10-7, inhibits cocaine-taking and cocaine-seeking behavior in rats. *Addiction Biology*, 19, 195-209. doi:10.1111/adb.12086.
- Kumaresan, V., Yuan, M., Yee, J., Famous, K. R., Anderson, S. M., Schmidt, H. D. y Pierce, R. C. (2009). Metabotropic glutamate receptor 5 (mGluR5) antagonists attenuate cocaine priming- and cue-induced reinstatement of cocaine seeking. *Behavioral Brain Research*, 202, 238-244. doi:10.1016/j.bbr.2009.03.039.
- Lee, B., Platt, D. M., Rowlett, J. K., Adewale, A. S. y Spealman, R. D. (2005). Attenuation of behavioral effects of cocaine by the Metabotropic Glutamate Receptor 5 Antagonist 2-Methyl-6-(phenylethynyl)-pyridine in squirrel monkeys: comparison with dizocilpine. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 312, 1232-1240. doi:10.1124/jpet.104.078733
- Li, X., Peng, X. Q., Jordan, C. J., Li, J., Bi, G. H., He, Y., ... Xi, Z. X. (2018). mGluR5 antagonism inhibits cocaine reinforcement and relapse by elevation of extracellular glutamate in the nucleus accumbens via a CB1 receptor mechanism. *Scientific Reports*, 8, 3686. doi:10.1038/s41598-018-22087-1.
- Manzanedo, C., Aguilar, M. A., Rodríguez-Arias, M. y Miñarro, J. (2001a). Conditioned place preference paradigm could be a model of relapse to opiates. *Neuroscience Research Communications*, 28, 23-29.
- Manzanedo, C., Aguilar, M. A., Rodríguez-Arias, M. y Miñarro, J. (2001b). Effects of dopamine with different blockade profiles on morphine-induced place preference in male mice. *Behavioral Brain Research*, 121, 189-197. doi:10.1016/S0166-4328(01)00164-4.
- Manzanedo, C., Aguilar, M. A., Miñarro, J. y Rodríguez-Arias, M. (2011). Effects of CNQX and MPEP on sensitization to the rewarding effects of morphine. *European Journal of Pharmacology*, 654, 42-46. doi:10.1016/j.ejphar.2010.11.037.
- Mateos-García, A., Manzanedo, C., Rodríguez-Arias, M., Aguilar, M. A., Reig-Sanchis, E., Navarro-Francés, C. I., ... Arenas, M. C. (2015). Sex differences in the long-lasting consequences of adolescent ethanol exposure for the

- rewarding effects of cocaine in mice. *Psychopharmacology (Berl)*, 232, 2995-3007. doi:10.1007/s00213-015-3937-7.
- McReynolds, J. R., Peña, D. F., Blacktop J. M. y Mantsch J. R. (2014). Neurobiological mechanisms underlying relapse to cocaine use: contributions of CRF and noradrenergic systems and regulation by glucocorticoids. *Stress*, 17:1, 22-38. doi:10.3109/10253890.2013.872617.
- Mihov, Y. y Hasler, G. (2016). Negative allosteric modulators of metabotropic glutamate receptors subtype 5 in addiction: a therapeutic window. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, 19, 1-11. doi:10.1093/ijnp/pyw002.
- Olive, M. F. (2009). Metabotropic glutamate receptor ligands as potential therapeutics for addiction. *Current Drug Abuse Reviews*, 2, 83-98. doi:10.2174/1874473710902010083.
- Pomierny-Chamiolo, L., Miszkiel, J., Frankowska, M., Bystrowska, B. y Filip M. (2017). Cocaine self-administration, extinction training and drug-induced relapse change metabotropic glutamate mGlu5 receptors expression: Evidence from radioligand binding and immunohistochemistry assays. *Brain Research*, 1655, 66-76. doi:10.1016/j.brainres.2016.11.014.
- Pomierny-Chamiolo, L., Rup, K., Pomierny, B., Niedzielska, E., Kalivas, P. W. y Filip, M. (2014). Metabotropic glutamatergic receptors and their ligands in drug addiction. *Pharmacology & Therapeutics*, 142, 281-305. doi:10.1016/j.pharmthera.2013.
- Popik, P. y Wrobel, M. (2002). Morphine conditioned reward is inhibited by MPEP, the mGluR5 antagonist. *Neuropharmacology*, 43, 1210-1217. doi:10.1016/S0028-3908(02)00309-X.
- Rodríguez-Arias, M., Castillo, A., Daza-Losada, M., Aguilar, M. A. y Miñarro, J. (2009). Effects of extended cocaine conditioning in the reinstatement of place preference. *Physiology & Behavior*, 96, 620-630. doi:10.1016/j.physbeh.2008.
- Rutten, K., Van der Kam, E. L., De Vry, J., Bruckmann, W. y Tzschentke, T. M. (2011). The mGluR5 antagonist 2-methyl-6-(phenylethynyl)-pyridine (MPEP) potentiates conditioned place preference induced by various addictive and non-addictive drugs in rats. *Addiction Biology*, 16, 108-115. doi:10.1111/j.1369-1600.2010.00235.x.
- Sanchis-Segura, C. y Spanagel, R. (2006). Behavioural assessment of drug reinforcement and addictive features in rodents: an overview. *Addiction Biology*, 11, 2-38. doi:10.1111/j.1369-1600.2006.00012.x.
- Schmidt, H. D. y Pierce, R. C. (2010). Cocaine-induced neuroadaptations in glutamate transmission: potential therapeutic targets for craving and addiction. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1187, 35-75. doi:10.1111/j.1749-6632.2009.05144.x.
- Schmidt, H. D., Kimmey, B. A., Arreola, A. C. y Pierce, R. C. (2015). Group I metabotropic glutamate receptor-mediated activation of PKC gamma in the nucleus accumbens core promotes the reinstatement of cocaine seeking. *Addiction Biology*, 20, 285-296. doi:10.1111/adb.12122.
- Titomanlio, F., Manzanedo, C., Rodríguez-Arias, M., Mattioli, L., Perfumi, M., Miñarro, J. y Aguilar, M. A. (2013). *Rhodiola rosea* impairs acquisition and expression of conditioned place preference induced by cocaine. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 697632. doi:10.1155/2013/697632.
- Tzschentke, T. M. (2007). Measuring reward with the conditioned place preference (CPP) paradigm: update of the last decade. *Addiction Biology*, 12, 227-462. DOI: 10.1111/j.1369-1600.2007.00070.x
- Van der Kam, E. L., De Vry, J. y Tzschentke, T. M. (2009a). 2-Methyl-6-(phenylethynyl)-pyridine (MPEP) potentiates ketamine and heroin reward as assessed by acquisition, extinction, and reinstatement of conditioned place preference in the rat. *European Journal of Pharmacology*, 606, 94-101. doi:10.1016/j.ejphar.2008.12.042.
- Van der Kam, E. L., De Vry, J. y Tzschentke, T. M. (2009b). The mGlu5 receptor antagonist 2-methyl-6-(phenylethynyl)pyridine (MPEP) supports intravenous self-administration and induces conditioned place preference in the rat. *European Journal of Pharmacology*, 607, 114-20. doi:10.1016/j.ejphar.2009.01.049.