



UNIVERSITAT POMPEU FABRA

Departament de Ciències Experimentals i de la Salut

Laboratori de Neurofarmacologia

TESIS DOCTORAL:

**Sistemas cannabinoide y purinérgico: posibles sustratos
neurobiológicos de la drogadicción**

Memoria presentada por

Guadalupe Soria Rodríguez

Para optar al grado de doctor

Barcelona 2006

Dipòsit legal: B.38441-2007
ISBN: 978-84-690-7827-3

Olga Valverde Granados, Profesora Titular de la Universitat Pompeu Fabra y Rafael Maldonado López, Catedrático de la Universitat Pompeu Fabra

CERTIFICAN:

Que la presente Tesis Doctoral titulada "Sistemas cannabinoide y purinérgico: posibles sustratos neurobiológicos de la drogadicción" presentada por Guadalupe Soria Rodríguez, Licenciada en Biología, para optar al grado de Doctor por la Universitat Pompeu Fabra, ha sido realizada bajo su dirección y reúne todos los requisitos necesarios para ser juzgada.

Y para que conste, y a efectos oportunos, firman el presente certificado a 9 de mayo de 2006.

Olga Valverde Granados

Rafael Maldonado López

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis está dedicada a todos los que habéis compartido este camino conmigo.

A Olga y a Rafael, por darme la oportunidad de realizar esta tesis y apoyarme durante este tiempo.

A mis compañeros de laboratorio, porque sois el mejor grupo con el que se puede trabajar.

A mis amigos de Sant cugat, a Noe, a Laia y a Nerea, gracias por vuestra fuerza.

A mis padres y a mis hermanas por todo su amor.

A Iñigo por estos años a mi lado.

*A mi padres, a mis
hermanas y a Íñigo*

ÍNDICE

ABREVIATURAS

INTRODUCCIÓN	1
1. ¿A qué llamamos adicción?	3
1.1. Uso, abuso y adicción	3
1.2. Hipótesis de la vulnerabilidad	5
1.3. Hipótesis de la automedicación	7
2. Sustratos neurobiológicos comunes de la adicción	9
2.1. Sistema dopaminérgico	9
2.2. Receptores de dopamina D2	11
2.3. Modulación del sistema dopaminérgico	14
3. Teorías de la adicción	17
3.1. Teoría del proceso oponente (Solomon y Corbit, 1974; Koob y cols., 1989)	17
3.2. Teoría motivacional de la adicción: neuroadaptación y alostasis (Koob y Le Moal, 1997)	18
3.3. Teoría de la sensibilización del incentivo (Robinson y Berridge, 1993)	20
4. Modelos animales de la adicción de drogas de abuso	23
4.1. Sensibilización de los efectos locomotores inducidos por las drogas	23
4.2. Condicionamiento espacial	24
4.3. Condicionamiento operante: autoadministración intravenosa	25
5.4.1 Adquisición	27
5.4.1 Mantenimiento	28
5.4.1 Razón progresiva	29
5.4.1 Extinción	30
5.4.1 Recaída	30
4.4. Autoestimulación intracraneal	32

4.5. Tolerancia a los efectos agudos producidos por las drogas	33
4.6. Síndrome de abstinencia físico	36
5. Sistema endocannabinoide	38
5.1. Cannabinoides endógenos	38
5.4.1 Biosíntesis y metabolismo de los endocannabinoides	38
5.2. Receptores cannabinoides	40
5.4.1 Ligandos exógenos de los receptores cannabinoides	42
5.4.1 Mecanismo de transducción de señales del receptor cannabinoide CB1	42
5.3. Funciones fisiológicas del sistema endocannabinoide	43
5.4.1 Los endocannabinoides como mensajeros retrógrados	45
5.4. Participación del sistema endocannabinoide en los circuitos de recompensa	46
5.4.1 Interacción entre los receptores cannabinoides y los receptores dopaminérgicos	47
5.4.1 Modulación endocannabinoide de la transmisión dopaminérgica	47
5.5. Participación del sistema endocannabinoide en las propiedades adictivas de diferentes drogas de abuso	49
5.4.1 Cannabinoides	49
5.4.1 Etanol	50
5.4.1 Opioides	51
5.4.1 Nicotina	53
5.4.1 Psicoestimulantes	54
6. Sistema purinérgico	55
6.1. Adenosina	56
5.4.1 Biosíntesis y metabolismo de la adenosina	57
6.2. Receptores de adenosina	58
5.4.1 Localización de los receptores de adenosina	59
6.3. Relevancia del receptor A2A en procesos de adicción	61
5.4.1 Interacción entre los receptores adenosina A2A y el sistema dopaminérgico	61

6.4. Interacción de los receptores A2A y las propiedades adictivas de las drogas de abuso	62
5.4.1 Etanol	63
5.4.1 Opioides	63
5.4.1 Psicoestimulantes	64
5.4.1 Cannabinoides	65
5.4.1 Nicotina	66
Hipótesis de trabajo	67
OBJETIVOS	69
Objetivos Generales	71
Objetivos específicos	71
RESULTADOS	73
Cocaína	75
Artículo 1: “Soria y cols., 2005. Lack of CB1 cannabinoid receptor impairs cocaine self-administration. <i>Neuropsychopharmacology</i> . 30(9): 1670-80”	79
Artículo 2: “Soria y cols., 2006. The Lack of A(2A) Adenosine Receptors Diminishes the Reinforcing Efficacy of Cocaine. <i>Neuropsychopharmacology</i> . 31(5): 978-987”	91
Δ^9-Tetrahidrocannabinol	103
Artículo 3: “Soria y cols., 2004. Adenosine A2A receptors are involved in physical dependence and place conditioning induced by THC. <i>European Journal of Neuroscience</i> . 20 (8): 2203-2213”	105
Nicotina	119
Artículo 4: “Castañé y cols., 2006. Attenuation of nicotine-induced rewarding effects in A2A knockout mice. <i>Neuropharmacology</i> (en prensa)”	121
Morfina	161

Artículo 5: "Castañé y cols., Behavioral and biochemical opioid responses related to its addictive properties are attenuated in adenosine A _{2A} receptor knockout mice. (En preparación)"	163
DISCUSIÓN	171
1. Participación del sistema endocannabinoide en las propiedades adictivas de la cocaína	174
2. Participación del sistema purinérgico en las propiedades adictivas de diferentes drogas de abuso: THC, cocaína, nicotina y morfina	180
3. Posibles mecanismos implicados en las acciones del sistema purinérgico en los procesos adictivos	187
CONCLUSIONES	193
REFERENCIAS	197
ANEXO	239
Artículo 6: Trigo y cols., 2006. "A reliable model of intravenous MDMA self-administration in naive mice. <i>Psychopharmacology</i> . 184(2):212-20"	241

ABREVIATURAS

5-HT	serotonina
Δ^8 -THC	Δ^8 -tetrahidrocannabinol
THC	Δ^9 -tetrahidrocannabinol
ADP	adenosina difosfato
AMPc	adenosina-5-aminofosfato cíclico
ATP	adenosina trifosfato
CHA	N-ciclohexiladenosina
CREB	proteína de unión a elementos de respuesta a AMPc
CRF	factor liberador de corticotropina
DA	dopamina
DARPP-32	fosfoproteína reguladora de la dopamina de peso molecular 32 KDa
DMPX	3,7-dimetil-1-propargilxantina
DSE	Supresión de la excitación inducida por despolarización
DSI	supresión inducida por despolarización
ERK	quinasa regulada por una señal extracelular
FAAH	hidrolasa de ácidos grasos
GABA	ácido γ -aminobutírico
Glu	glutamato
HPA	eje hipotálamo-hipofisario-adrenal
ICSS	autoestimulación intracraneal
LTD	depresión a largo plazo
LTP	potenciación a largo plazo
MAGL	lipasa de monoacilglicéridos
MAP	proteína activada por mitógenos
MDMA	3,4-metilendioximetanfetamina
mGlu	receptor metabotrópico del glutamato
mPFC	corteza prefrontal medial

mRNA	ARN mensajero
NAc	núcleo accumbens
nAChR	receptores nicotínicos de la acetilcolina
NE	norepinefrina
NECA	5'-N-etilcarboxiamida-adenosina
PFC	corteza prefrontal
PKA	proteína quinasa A
PKA	Proteína quinasa A
rimonabant	SR141716A
SNC	sistema nervioso central
VTA	área tegmental ventral

A decorative horizontal band at the bottom of the page features a repeating pattern of stylized, light gray floral and leaf motifs. The patterns include fan-like leaves, spirals, and various leaf shapes.

INTRODUCCIÓN

1 ¿A qué llamamos adicción?

Adicción: (Del lat. *Addictio*, *-onis*). 1.f. Hábito de quien se deja dominar por el uso de alguna o algunas drogas tóxicas, o por la afición desmedida a ciertos juegos. 2.f. desus. Asignación, entrega, adhesión. (Real Academia de la lengua Española).

1.1 Uso, abuso y adicción

Actualmente, el consumo de drogas es uno de los mayores problemas de salud pública que afectan a nuestra sociedad. De acuerdo con el Informe Mundial sobre Drogas de las Naciones Unidas para el 2004, 200 millones de personas (o el 5% de la población mundial con edades comprendidas entre 15 y 64 años) han consumido drogas ilícitas al menos una vez en los últimos 12 meses. Esta estimación no tiene en cuenta el número de personas que consumen de manera habitual alguna droga lícita (P.D.: según los criterios del DSMIV el 33% de la población que experimenta el consumo de tabaco desarrolla una adicción al mismo, mientras que en el caso del consumo de etanol el porcentaje de sujetos que desarrolla una adicción se sitúa en torno al 12%).

	Todas las drogas ilícitas	Cannabis	Estimulantes tipo anfetamina		Cocaína	Opiáceos	(De los cuales) Heroína
			Anfetamina	Éxtasis			
Personas (millones)	200	169.9	26.2	7.9	13.7	15.9	10.6
% población (edad entre 15 y 64)	5.0%	4.0%	0.6%	0.2%	0.3%	0.4%	0.23%

Tabla 1. Estimación de la prevalencia anual sobre el uso de drogas (2003/2004). UNODC, UE. La prevalencia anual es una medida del número/porcentaje de gente que ha consumido alguna droga ilícita por lo menos una vez en los últimos 12 meses antes de la evaluación.

A pesar del gran potencial adictivo de algunas drogas, no todas las personas que consumen o han consumido alguna droga se vuelven adictos (O'Brien y Anthony, 2005). Este hecho revela que el uso de una droga no tiene por qué llevar necesariamente a un proceso de adicción. Así, atendiendo a la frecuencia, podemos clasificar el tipo de consumo de drogas en (1) ocasional, controlado o consumo social, (2) abusivo o

perjudicial y (3) drogodependencia o adicción de la droga. En efecto, el proceso de adicción empieza con un consumo ocasional que produce un refuerzo positivo agudo. En ocasiones se produce un cambio en el patrón de consumo y éste se convierte en compulsivo, iniciándose el proceso de drogodependencia y más tarde, la falta de la droga origina la abstinencia. Con frecuencia, tras el periodo de abstinencia se produce una recaída y la entrada en el proceso adictivo (Fig. 1).

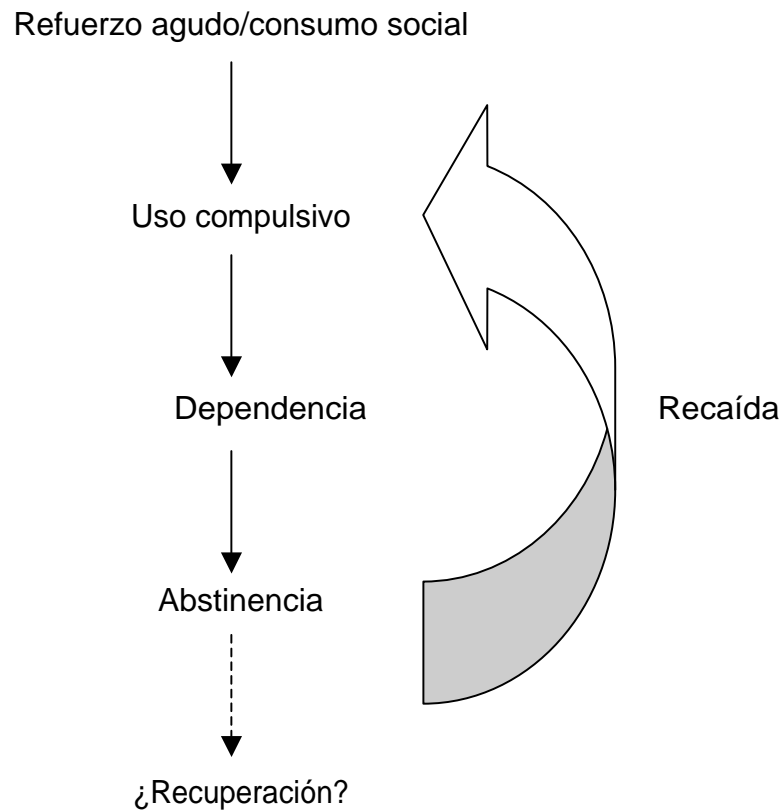


Figura 1. Estadios de la drogodependencia (Modificado de Koob y Le Moal, 2005)

La adicción, por tanto, es un trastorno crónico y recidivante de la conducta caracterizado por (1) la búsqueda y el consumo compulsivos de la droga, (2) pérdida de control para limitar el consumo, a pesar de las consecuencias negativas para el sujeto y (3) aparición de un estado emocional negativo (p.e.: disforia, irritabilidad, ansiedad) cuando el acceso a la droga está impedido (Koob y Le Moal, 1997). Actualmente, uno de los objetivos más importantes de este campo de investigación es identificar los mecanismos neurobiológicos responsables de la transición desde el consumo ocasional de la droga al proceso adictivo.

1.2 Hipótesis de la vulnerabilidad

La exposición crónica a las drogas de abuso es un requerimiento para el desarrollo de la adicción, y su expresión comprende complejas interacciones entre factores ambientales, genéticos y neurobiológicos (Volkow y Li, 2004). Está aceptado que la iniciación al abuso de drogas se asocia con factores sociales y ambientales, mientras que el paso del abuso a la adicción está más relacionado con factores genéticos y disfunciones neurobiológicas (Glantz y Pickens, 1992). Ciertos rasgos de la personalidad y del temperamento (p.e.: desinhibición, búsqueda de sensaciones nuevas, desórdenes de la conducta) se han identificado como factores de vulnerabilidad a padecer drogodependencias (Glantz y cols., 1999). El riesgo de adicción en individuos con problemas mentales es más alto que en la población general. Desde un punto de vista de comorbilidad psiquiátrica, las asociaciones más importantes se establecen con problemas de ansiedad, y alteraciones del humor, la personalidad y la conducta.

Otro factor que aporta vulnerabilidad a sufrir procesos adictivos está relacionado con hechos que acontecen durante la adolescencia. Así, el consumo de drogas durante la adolescencia aumenta significativamente la vulnerabilidad al desarrollo de la adicción en etapas adultas. Se ha hipotetizado que el inicio de la adicción empieza con el consumo de drogas lícitas: alcohol y tabaco, y que posteriormente y de un modo secuencial se inicia el consumo de las drogas ilícitas (Teoría de la puerta de entrada, Lindsay y Rainey, 1997). Aunque esta secuencia sería común en muchos adictos sólo un porcentaje pequeño de jóvenes progresa de una etapa a la otra hasta llegar al abuso de drogas ilegales.

Si embargo, los factores genéticos implicados en la vulnerabilidad al consumo de drogas es uno de los campos de investigación más estudiado en la actualidad. Los estudios de polimorfismos aportan información importante sobre la participación de un gen específico en la expresión de las diferencias en cuanto a la vulnerabilidad para sufrir drogodependencias, tales como los efectos farmacológicos agudos producidos por la droga, el desarrollo de tolerancia y abstinencia, la farmacocinética de la droga y la preferencia de una sustancia frente a otras. Además, el polimorfismo genético también puede favorecer la manifestación de trastornos psiquiátricos asociados frecuentemente a la adicción, por ejemplo la personalidad antisocial. El análisis y la interpretación de los resultados de estos estudios es complicada ya que se trata de un trastorno en el que están involucrados factores genéticos (poligénicos) y ambientales (Ugedo y Ruiz, 2000).

No podemos olvidar que podrían existir genes que protejan y otros que sensibilicen al proceso de adicción. En este sentido, estudios realizados en gemelos monocigóticos han permitido estimar que entre el 40% y el 60% de la vulnerabilidad al abuso de drogas es atribuible a factores genéticos (Uhl, 1999, Uhl y Grow, 2004). Variaciones alélicas entre

individuos podrían producir diferencias en el metabolismo de las drogas o su biodistribución, así como diferencias en las propiedades reforzantes de las drogas. Un ejemplo de factor de protección heredado es la variante alélica de la enzima acetilaldehído deshidrogenasa que confiere protección contra el alcoholismo en el 50% de la población japonesa (Yamashita y cols., 1990). Estudios en pacientes adictos a la cocaína han revelado una menor cantidad de receptores dopaminérgicos D2, en la corteza orbitofrontal y el giro cingular, que en individuos normales (Volkow y col, 1999). Estos datos sugieren que niveles bajos del receptor dopaminérgico D2 están relacionados con una mayor vulnerabilidad a la adicción de drogas de abuso. En paralelo, se ha encontrado un alelo del receptor D2, el Taq1A menor, que se ha asociado estrechamente al alcoholismo y al tabaquismo. En estudios con individuos alcohólicos y adictos a múltiples sustancias de abuso, el gen Taq1A aparece con más frecuencia en estos pacientes adictos que en los sujetos control, sugiriendo un papel etiológico del receptor D2 en el alcoholismo severo (Blum y cols., 1993). De manera similar, existen dos regiones polimórficas del gen codificante para el receptor opioide mu (A118G y C17T) que aparecen con alta frecuencia alélica en individuos adictos a opioides y a otras drogas como la cocaína y el alcohol (Berritini y cols., 1997; Bond y cols., 1998).

Los estudios con animales de varias especies (las ratas y los ratones son los más utilizados) nos permiten averiguar la predisposición al uso de drogas de una manera más rigurosa que en humanos. Aunque estos estudios no pueden aportar datos precisos concernientes al polimorfismo genético humano relevante en las drogodependencias, sí aportan, entre otros, datos relevantes acerca de cuáles son los parámetros de la conducta susceptibles de variación genética, qué factores ambientales pueden modificarla y que posibles variaciones genéticas pueden constituir un factor de riesgo o de protección para el desarrollo de ciertas conductas relacionadas con el consumo de drogas o en la sensibilidad a éstas (Crabbe y cols., 1994). La investigación en modelos genéticos en animales ofrece varias ventajas: (1) el experimentador controla el genotipo del animal de experimentación, (2) puede disponer de numerosos modelos de ratas y ratones con un genotipo estable y definido y (3) se pueden aplicar numerosas técnicas genéticas para inducir modificaciones. Así, se puede estudiar un gen y la observación del fenotipo que resulta al mutar dicho gen, o bien, partiendo de un fenotipo alterado se investiga el gen, o lo genes, responsable de ese fenotipo. Se han estudiado numerosos genes candidatos mediante su mutación en ratones y sus consecuencias en el comportamiento. De esta manera, se ha demostrado la importancia del receptor opioide mu en las acciones de la morfina (Iversen, 1996; Matthes y cols., 1996; Sora y cols., 1997), el transportador de la dopamina en los efectos de la cocaína y de la anfetamina (Giros y cols., 1996; Jones y cols., 1998), el receptor CB1 en los

efectos de los cannabinoides (Ledent y cols., 1999; Zimmer y cols., 1999). Otra muestra es el caso de los psicoestimulantes, ya que existen más de 40 genotipos diferentes de ratones mutantes que expresan respuestas alteradas a estos compuestos (Laakso y cols., 2002). A pesar de las ventajas descritas, la principal limitación de los modelos animales de la adicción es que sólo son simulaciones aproximadas de una situación compleja como son las drogodependencias en humanos (Ugedo y Ruiz, 2000).

1.3 Hipótesis de la automedicación

Diversas observaciones en psiquiatría sugieren que la adicción es una manifestación de la falta de capacidad para soportar los estados afectivos negativos. Las personas adictas experimentan estados de angustia, posiblemente asociados a otros trastornos psiquiátricos. Desde esta perspectiva, la drogadicción se considera como un intento de “automedicar” ese estado afectivo perturbado (Khantzian, 1985). Según la hipótesis de la automedicación, gran parte de los pacientes que desarrollan trastornos por abuso de drogas, lo hacen porque sufren de forma previa trastornos neurológicos asociados a procesos fisiológicos que, directa o indirectamente, les abocan al consumo de sustancias psicoactivas como forma de “autotratamiento”. Esta supuesta “automedicación” parece ser droga-específica. Así, los individuos tienen un uso preferencial por aquella droga que se ajusta más al trastorno que padecen. Se ha observado que los adictos a los opiáceos buscan específicamente superar ciertas defensas en contra de estados emocionales intensos y negativos tales como la rabia, la vergüenza y la soledad. La cocaína, entre sus efectos estimulantes, parece producir un mayor grado de autoestima, mayor tolerancia a la frustración y menores sentimientos de aburrimiento y vacío. En tal caso, cada tipo de droga serviría como antídoto ante estados de desánimo y actuaría como sustitutivo en un defecto de la estructura psicológica de tales individuos. La hipótesis de la “automedicación” explica el uso de la droga como alternativa ante problemas crónicos de la persona en cuatro áreas de su funcionamiento vital: vida afectiva, autoestima, relaciones y autocuidado. Las carencias funcionales de algunos de estos aspectos podrían explicar la posible vulnerabilidad de los individuos al efecto de determinadas drogas. En este sentido, la adicción de drogas se asocia a menudo al proceso denominado Patología Dual que es la concurrencia de una conducta de abuso de drogas y otro trastorno psicopatológico como la ansiedad, las crisis de pánico, la depresión, los trastornos de personalidad, la psicosis (Minkoff, 1989; Negrete, 2003). Las drogas podrían ofrecer un alivio farmacológico rápido frente a situaciones emocionales extremadamente intensas. Sin embargo, no todas las personas con problemas psicológicos o personales se inician en el mundo de la adicción. Esta hipótesis podría aplicarse a ciertos cuadros de drogadicción pero resulta difícil poder explicar el

complejo proceso de la adicción de drogas basándose de manera exclusiva en la teoría de la automedicación. Además, esta hipótesis no resuelve la gran paradoja de que la elección de una droga para medicar el estado motivacional defectuoso, a la larga, perpetúa el problema.

2 Sustrato neurobiológico común en la adicción de diferentes tipos de drogas

2.1 Sistema dopaminérgico

La investigación en adicción, con frecuencia, se ha focalizado en la función del sistema dopaminérgico mesolímbico cortical. Los primeros estudios se remontan a la década de los años 50, cuando Olds y Milner, utilizando la técnica de autoestimulación intracraneal (ICSS), comprobaron que los animales presionaban de forma repetida una palanca cuando los electrodos estaban ubicados en unas zonas determinadas de dicho sistema. La descarga eléctrica recibida, de alguna manera, les debía producir un efecto placentero, que convertía la conducta en repetitiva. La colocación de los electrodos en distintos lugares permitió elaborar un "mapa cerebral de las vías del refuerzo", en el que cobró especial protagonismo el haz prosencefálico medial y la vía dopaminérgica mesolímbica cortical. Asimismo, mediante la técnica de ICSS se ha observado un perfil de activación anticipado a la obtención del refuerzo en las neuronas dopaminérgicas (Richardson y Gratton, 1996; revisión en Kienast y Heinz, 2006). Debido a que las drogas de abuso estimulan la función dopaminérgica para producir efectos reforzantes, se ha postulado la "hipótesis dopaminérgica de la adicción" (Wise y Bozarth, 1987; Di Chiara e Imperato, 1988). Dicha hipótesis ha sido respaldada también por estudios electrofisiológicos que han demostrado como algunas neuronas dopaminérgicas se activan en respuesta a estímulos condicionados predictivos de un refuerzo (Hollerman y Schultz, 1998; Schultz, 2001).

El sistema dopaminérgico está integrado por 3 vías diferentes. (1) La vía dopaminérgica nigroestriatal que parte de la substantia negra y proyecta al cuerpo estriado (Koob y Le Moal, 2001), regula la actividad motora y coordina los diferentes grupos musculares en los programas motores. (2) La vía dopaminérgica mesolímbica cortical, se compone básicamente de proyecciones que van desde el área tegmental ventral (VTA) al núcleo accumbens (NAc), hipocampo, tubérculo olfatorio, amígdala, corteza prefrontal (PFC) y septum. Las proyecciones eferentes del NAc se dirigen hacia el pálido ventral y el VTA, formando así un bucle de control recíproco. Esta vía participa de los procesos reforzantes de las drogas de abuso y es conocida como el principal sistema de recompensa común a todas las drogas de abuso. (3) La vía tuberoinfundibular que cuenta con proyecciones desde el hipotálamo al infundíbulo y a la hipófisis anterior y controla la liberación de prolactina.

La dopamina ejerce su acción mediante la unión a 5 tipos diferentes de receptores dopaminérgicos. Son receptores de la superfamilia de receptores con siete dominios transmembranarios acoplados a proteínas G (metabotrópicos). Según características farmacológicas y de homología de secuencia, los receptores dopaminérgicos se pueden clasificar en dos grandes categorías: los receptores de tipo 1 (D1 y D5) y los receptores de tipo 2 (D2, D3 y D4) (Sibley y cols., 1993; Missale y cols., 1998). Los receptores D1 y D2 son muy abundantes en el cerebro de roedor, mientras que los receptores D3, D4 y D5 se encuentran menos representados en el cerebro de rata. Concretamente, se encuentran altas densidades de dichos receptores en regiones que reciben innervación dopaminérgica como el estriado dorsal, el tubérculo olfatorio y el NAc. De manera específica, los receptores D2 se encuentran altamente expresados en las neuronas estriatopálidas gabaérgicas espinosas de tamaño mediano (Gerfen, 1992). También se encuentran concentraciones muy altas del receptor D1 en la amígdala (Weiner y cols., 1991; Meador-Woodruff, 1994). El receptor D3 se localiza preferentemente en el NAc y las Islas de Calleja (Díaz y cols., 2000). El receptor D4 solamente se encuentra en estructuras límbicas, incluyendo el NAc, el hipocampo, la amígdala y la PFC (Svingos y cols., 2000), mientras que el recetor D5 se localiza en el hipocampo, el hipotálamo y algunos núcleos talámicos, y es muy escasa su presencia en estriado y neocórtex (Khan y cols., 2000). Esta distribución tan específica de los receptores dopaminérgicos en estructuras relacionadas de un modo directo con los procesos de placer, recompensa, memoria y aprendizaje, reflejan la importancia del sistema dopaminérgico en el complejo proceso adictivo.

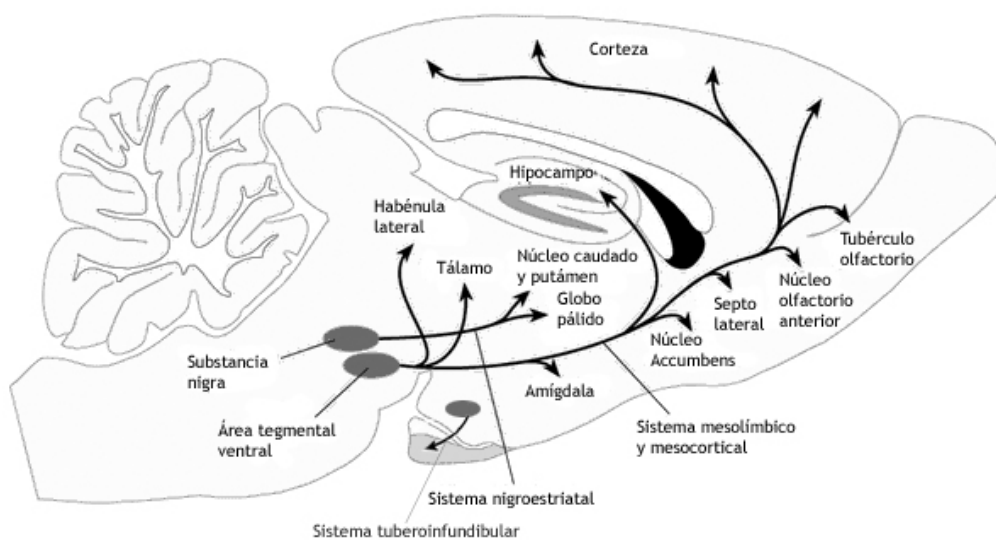


Figura 2. Esquema de las principales vías dopaminérgicas en un corte sagital de cerebro de rata.

2.2 Receptores de dopamina D2 y adicción de drogas de abuso

Los receptores de dopamina tipo 2 (D2, D3 y D4) se acoplan a proteínas G ($G_{\alpha}/G_{\beta\gamma}$) que inhiben la adenilato ciclasa (Sibley y cols., 1993). Como consecuencia aumenta la conductancia de los canales de K^+ y se bloquea el flujo de entrada de Ca^{2+} en la neurona (Jackson y Westind-Danielsson, 1994; Missale y cols., 1998).

La administración repetida de cocaína provoca una desensibilización de los autoreceptores D2 en el VTA, que resulta en una liberación de dopamina amplificada en el NAc (Nestler y cols., 1990; Striplin y Kalivas, 1992). Al mismo tiempo se ha encontrado una regulación a la baja de receptores D2 en estriado en monos con una historia previa de autoadministración de cocaína (Moore y cols., 1998).

Antagonistas D2-like atenúan la expresión de la sensibilización locomotora tras un tratamiento crónico de cocaína (Mattingly y cols., 1994, Le Foll y cols., 2002) y bloquean la preferencia de plaza inducida por cocaína, morfina y etanol (Matsuwaza y cols., 1999; Rezayof y cols., 2002; Nazarian y cols., 2004). En 1993, Caine y Koob demostraron que antagonistas D3 bloqueaban la autoadministración de cocaína en ratas. Más tarde, se comprobó que esta conducta estaba sobretodo modulada por el receptor D2 (Caine y cols., 2002). Por otro lado, la activación del receptor D2 con quinpirole reinstauró una conducta de búsqueda compulsiva de cocaína y heroína en ratas (De Vries y cols., 2002). De acuerdo con esto, en animales que habían adquirido una conducta de autoadministración y que posteriormente la habían extinguido, los antagonistas D2 fueron capaces de bloquear la recaída inducida por una inyección de cocaína (Schenk y Gittings, 2003), heroína (Shaham y Stewart, 1996) o por una exposición a etanol (Liu y Weiss, 2002), por el estímulo condicionado o por estrés (Gal y Gyertyan, 2006; Mc Farland y cols., 2004). Asimismo, los agonistas D2 facilitan la recaída de una conducta de búsqueda compulsiva de la droga (Khroyan y cols., 2000). Resulta interesante observar que los animales deficientes en el receptor D2 son incapaces de manifestar las propiedades placenteras de la morfina en un paradigma de condicionamiento espacial, mientras que presentan efectos de recompensa ante estímulos naturales como la comida (Maldonado y cols., 1997). Sin embargo, la tasa de autoadministración de cocaína fue significativamente más alta en los ratones D2 knockout que en los ratones wild-type cuando altas dosis de cocaína, pero no bajas, fueron evaluadas (Caine y cols., 2002). Estos resultados indican que los receptores D2 no serían esenciales para la manifestación de las propiedades reforzantes de la cocaína pero sí para la regulación que limita el consumo de altas dosis de una droga (Caine y cols., 2002). En animales de experimentación, una conducta de autoadministración prolongada con acceso a altas dosis de cocaína o heroína lleva a un consumo en escalada de la droga (Ahmed y Koob, 1998; Ahmed y cols., 2000). El fenómeno de

escalada ha sido propuesto como modelo de la transición entre el consumo de una droga y la drogadicción (Ahmed y Koob, 1998; Koob y Le Moal, 2001). En este sentido, es posible que una regulación a la baja de receptores D2 tras un consumo repetido de la droga, sea una de las causas que contribuyen en el fenómeno de escalada en el consumo de una droga, y como consecuencia en el proceso adictivo. En la misma línea, Rougé-Pont y cols., (2002) han demostrado que el receptor D2 controla la liberación de dopamina en condiciones de altos niveles de dopamina extracelular, como por ejemplo los inducidos por el tratamiento con drogas de abuso. El receptor D2 se expresa de manera alternativa en dos isoformas, la corta (D2S) y la larga (D2L). Utilizando ratones deficientes en una u otra isoformas del receptor D2 se ha comprobado que en particular, es la isoforma D2S la que regula el incremento de dopamina extracelular inducida por drogas de abuso como la cocaína y la morfina (Rougé-Pont y cols., 2002), indicando que la expresión desregulada de las diferente isoformas del receptor D2 estaría involucrada en la vulnerabilidad de un individuo al proceso adictivo.

Finalmente, estudios de neuroimagen, realizados tanto en humanos como en animales de experimentación, respaldan la implicación de los receptores D2 en la adicción de diversas drogas de abuso como la cocaína, la heroína, el alcohol y la metanfetamina (Goldstein y Volkow, 2002) (Fig. 3). Individuos adictos a estas sustancias han mostrado tener una reducción significativa en los niveles de receptores D2, sobretodo en estriado, corteza orbitofrontal y giro cingulado, respecto a los individuos control. Estos resultados indican que los individuos adictos a la cocaína también poseen una menor liberación de dopamina que los individuos sanos, hecho que sumado a la baja disponibilidad de receptores D2 podría resultar en una baja activación del sistema dopaminérgico por refuerzos fisiológicos, y así el consumo de cocaína ayudaría a compensar este déficit (Volkow y cols, 1999). Precisamente, Nora Volkow y su grupo de investigación han desarrollado una teoría predictiva de la adicción por la cual se establece una relación directa entre los niveles de receptores D2 en el estriado y la predisposición al abuso de droga. Individuos con bajos niveles de receptores D2 serían más propensos a desarrollar adicción mientras que altos niveles de D2 representarían una protección para este fenómeno (Volkow y cols., 2002).

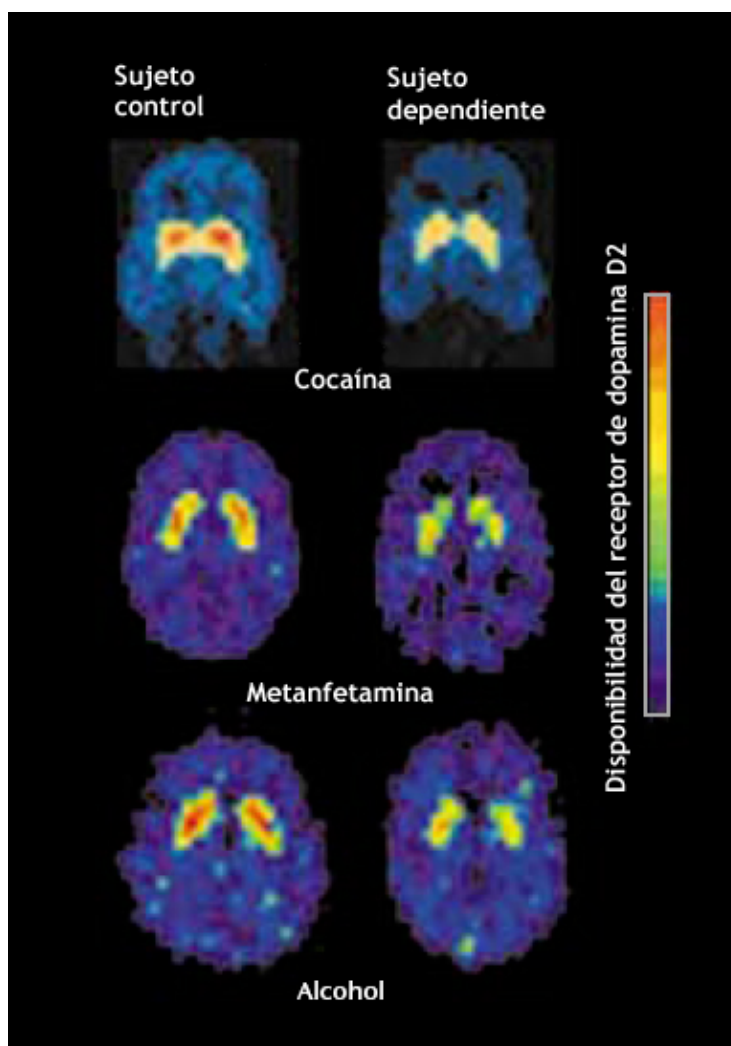


Figura 3. Disponibilidad reducida del receptor D2 en estriado en individuos dependientes de diferentes drogas de abuso (De Goldstein y Volkow, 2002). Tasa de distribución del $[^{11}\text{C}]$ -Raclopride en el estriado de pacientes adictos a cocaína, metanfetamina y alcohol en comparación con sujetos control.

Los receptores de dopamina D3 pertenecen a la subfamilia de receptores tipo 2 (Missale y cols., 1998) y también se han relacionado de un modo específico con las propiedades adictivas de drogas como la cocaína (Pilla y cols., 1999; Di Ciano y cols., 2003). Su localización postsináptica está restringida a áreas cerebrales como el NAc y la amígdala (Bouthenet y cols., 1991; Landwehmer y cols., 1993), donde actúan como autoreceptores. Antagonistas del receptor D3 (BP 897 y SB-277011-A) disminuyen la conducta de búsqueda compulsiva por cocaína inducida por el estímulo condicionado a la droga, en un protocolo de refuerzo de segundo orden (Pilla y cols., 1999; Di Ciano y cols., 2003). Estos datos sugieren que el receptor de dopamina D3 está implicado de manera crucial en la asociación entre el refuerzo y el estímulo condicionado.

2.3 Modulación del sistema dopaminérgico

El sistema dopaminérgico mesolímbico cortical ha sido el más estudiado en los fenómenos adictivos pero no es el único que participa en los procesos de placer y refuerzo. Otros sistemas de neurotransmisión en las estructuras límbicas y otras áreas cerebrales modulan la actividad dopaminérgica mediante proyecciones de diferente naturaleza. Así, por ejemplo, la corteza prefrontal medial (mPFC) envía proyecciones glutamatérgicas al NAc. El NAc contiene dos divisiones conocidas como “shell” (sistema límbico) y “core” (sistema motor). El NAc envía proyecciones de naturaleza gabaérgica al pálido ventral y al VTA/ sustancia negra. A su vez, el pálido ventral y el VTA envían eferentes gabaérgicas al tálamo dorsomedial. El circuito se cierra gracias a proyecciones glutamatérgicas desde el tálamo dorsomedial a la mPFC (Pierce y Kumaresan, 2006). Las neuronas dopaminérgicas cuyos cuerpos celulares se encuentran en el VTA realizan sinapsis con neuronas espinosas medianas de tipo gabaérgico que se encuentran tanto en el NAcc como en la PFC (Wise y Bozarth, 1984, 1985; Gardner, 2002).

Además de los sistemas glutamatérgico y gabaérgico, los sistemas colinérgico y serotoninérgico también tienen un papel relevante en la neurobiología de la adicción, porque modulan el sistema de recompensa (Kalivas y Mc Farland 2003; Laviolette y Van der Kooy, 2004). El papel del sistema opioide como sustrato neurobiológico común en los procesos de refuerzo asociados a la adicción ha supuesto sin duda un gran avance en el conocimiento de la adicción de drogas de abuso. Así, se ha demostrado que el receptor opioide mu participa no sólo en las propiedades placenteras y reforzantes de la morfina (Matthes y cols., 1996), sino también en las de otras drogas prototípicas como la nicotina (Berrendero y cols., 2002), los cannabinoides (Ghozland y cols., 2002), el etanol (Roberts y cols., 2000) y la cocaína (Becker y cols., 2002). Además también se ha comprobado una implicación de los receptores opioides kappa en las propiedades aversivas de la morfina (Spanagel y cols., 1994) y los cannabinoides (Zimmer y cols., 2001), así como del efecto aversivo asociado al síndrome de abstinencia de nicotina (Ise y cols., 2002).

Estudios recientes, también han demostrado que el sistema cannabinoide podría ser un sistema modulador común en la adicción de drogas de abuso (Maldonado y Rodríguez de Fonseca, 2002; Valverde y cols., 2005; Arnold, 2005; Gardner, 2005) (ver capítulo 5). Por otro lado el eje HPA está fuertemente relacionado con los procesos de respuesta al estrés. Así, el síndrome de abstinencia de diferentes tipos de drogas de abuso se relaciona con una elevación importante en los niveles extracelulares del factor liberador de corticotropina (CRF) en áreas del sistema mesolímbico y especialmente en la amígdala (Cummings y cols., 1983; Heinrichs y cols., 1995; Koob, 1996) Esta alteración de la función del CRF límbico parece mediar los síntomas relacionados con el

estrés y los efectos disfóricos que acompañan al síndrome de abstinencia y a los procesos de recaída. Cambios similares de los niveles extracelulares de CRF han sido descritos durante la abstinencia de drogas de abuso como en el caso de los cannabinoides (Rodríguez de Fonseca y cols., 1997), el etanol (Koob, 1999a) y los psicoestimulantes (Richter y Weiss, 1999).

Del mismo modo, existen otras estructuras cerebrales que tienen un papel importante en el desarrollo de la adicción. Es el caso de la amígdala extendida, complejo que comprende el Shell del NAc, el núcleo del lecho de la estría terminal y el núcleo central de la amígdala, y que ha sido sugerida como punto de integración de la mayoría de funciones del circuito de la recompensa (Leshner y Koob, 1999).

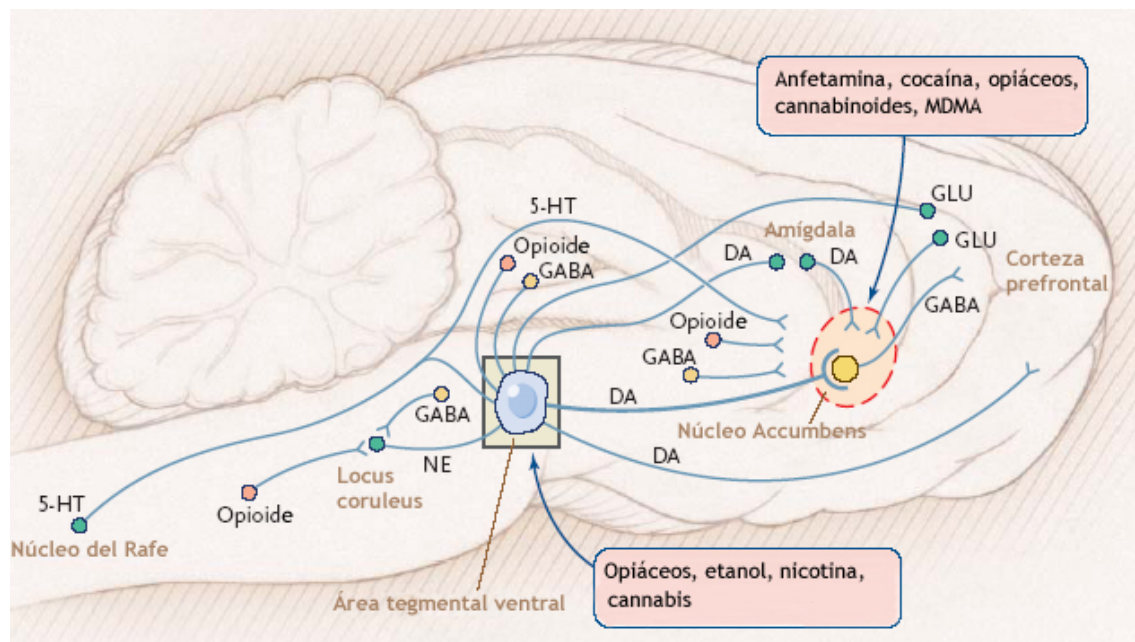


Figura 4. Sitios de acción de diferentes drogas de abuso. (Camí y Farré, 2003). El sistema dopaminérgico (DA) mesolímbico cortical que tiene como origen el VTA incluye las proyecciones desde los cuerpos neuronales que se sitúan en el VTA hacia el NAc, amígdala y PFC; las proyecciones glutamatérgicas (GLU) desde la PFC al NAc y al VTA. Las interneuronas de tipo opioide modulan la acción inhibitoria de las neuronas gabaérgicas en el VTA e influyen en la activación de neuronas noradrenérgicas (NE) del Locus coeruleus. Las proyecciones serotoninérgicas (5-HT) van desde el Núcleo del Rafe al VTA y al NAc. La figura muestra los sitios de acción propuestos para varias drogas dentro de estos circuitos.

Diversos estudios neuroquímicos han demostrado que las drogas de abuso aumentan los niveles extracelulares de dopamina en regiones límbicas, en especial en el NAc (Koob y Bloom, 1988; Di Chiara, 2002). De manera específica, parece que las propiedades reforzantes de las drogas de abuso se deben a su habilidad para superar en magnitud y duración la elevación de los niveles de dopamina en el NAc originados por los refuerzos

naturales como la comida o el sexo (Wise, 2002). Psicoestimulantes como la cocaína, la Anfetamina, la metanfetamina o el éxtasis aumentan los niveles de monoaminas bloqueando su recaptación e incrementando la liberación de dopamina mediante la unión a su transportador (Madras y cols., 1994) (Fig. 4). Otras drogas como la nicotina, el alcohol, los opiáceos y el Δ^9 -tetrahidrocannabinol (THC), a través de diferentes mecanismos de acción, actúan indirectamente modificando la actividad de neuronas (gabaérgicas o glutamatérgicas) que a su vez modulan la actividad de las neuronas dopaminérgicas (Kreek y cols., 2002) (Fig. 4). El resultado final es un aumento en la neurotransmisión dopaminérgica en el NAc, que además de activarse ante la presencia de drogas también se activa ante refuerzos naturales como comida, agua, sexo o situaciones novedosas. Si bien, existe una convergencia en el sistema dopaminérgico del refuerzo inducido por las drogas y los refuerzos naturales, los sustratos neuronales son diferentes para ambos tipos de refuerzo. Existen diferentes estudios electrofisiológicos que han demostrado la activación de diferentes tipos de neuronas en el NAc según las ratas se autoadministren comida/agua o cocaína (Carelli y cols., 2000, Carelli y Wondolowski, 2003). Recientemente, Baunez y cols., (2005) han mostrado que lesiones excitotóxicas en el núcleo subtalámico aumentan la motivación por comida al mismo tiempo que la disminuyen por cocaína, sugiriendo así, que el núcleo subtalámico juega un papel importante en la adicción de cocaína y que la modulación de su actividad podría representar una nueva diana para el tratamiento de la adicción de cocaína.

3 Teorías de la adicción

Se puede hacer una clasificación de las diferentes teorías de la adicción según su enfoque sea psicológico o biológico. Desde una perspectiva psicológica, podemos destacar diferentes teorías: el modelo “cognitivo” (Ludwig y Wikler, 1974, Melchior y Tabakoff, 1984), el modelo de “expectación del resultado” (Marlatt, 1979; Goldman y Rather, 1993), el modelo del “doble afecto” (Baker, 1987) y el modelo del “procesamiento cognitivo” (Tiffany, 1990). Estas teorías introducen conceptos como memoria, expectación, interpretación de los estímulos y comportamientos automáticos para definir el deseo o el ansia de consumir una droga. Aunque la validez de estos modelos está aún poco explorada, representan una nueva corriente en el estudio de las adicciones. En este capítulo únicamente se detallan tres de las principales teorías neurobiológicas de la adicción: teoría de los procesos oponentes (Solomon y Corbit, 1974), teoría motivacional de la adicción (Koob y Le Moal, 1997) y teoría de la sensibilización del incentivo (Robinson y Berridge, 1993).

3.1 Teoría de los procesos oponentes (Solomon y Corbit, 1974; Koob y cols., 1989)

La teoría de los procesos oponentes parte de la base de que el cerebro contiene diferentes mecanismos de control capaces de equilibrar cualquier estado afectivo que se aleje de la estabilidad o el equilibrio, ya sea este placentero o aversivo (Solomon y Corbit, 1974). Con posterioridad, Koob y cols. (1989) aplicaron la teoría de los procesos oponentes a los cuadros de adicción a drogas. Esta teoría propone dos procesos opuestos, la suma de los cuales determina el estado afectivo de un individuo en un determinado momento. En primer lugar, tras el consumo de una droga se activa un proceso emocional relacionado con la intensidad, la calidad y la duración del estímulo reforzante (proceso A) (Fig. 6). Posteriormente y como consecuencia, se dispara un proceso negativo, opuesto al inicial (proceso B), normalmente de naturaleza fisiológica. Cuando el proceso A es mayor que el proceso B el individuo se encuentra en una situación placentera, estado A. En caso contrario, si el proceso B es mayor que el proceso A el individuo siente un efecto desagradable o disfórico, estado B. El “high” producido por una droga (estado A) está causado directamente por el proceso A. A medida que el consumo de la droga se repite, el “high” va disminuyendo y el proceso B predomina de forma progresiva, tanto en magnitud como en duración.

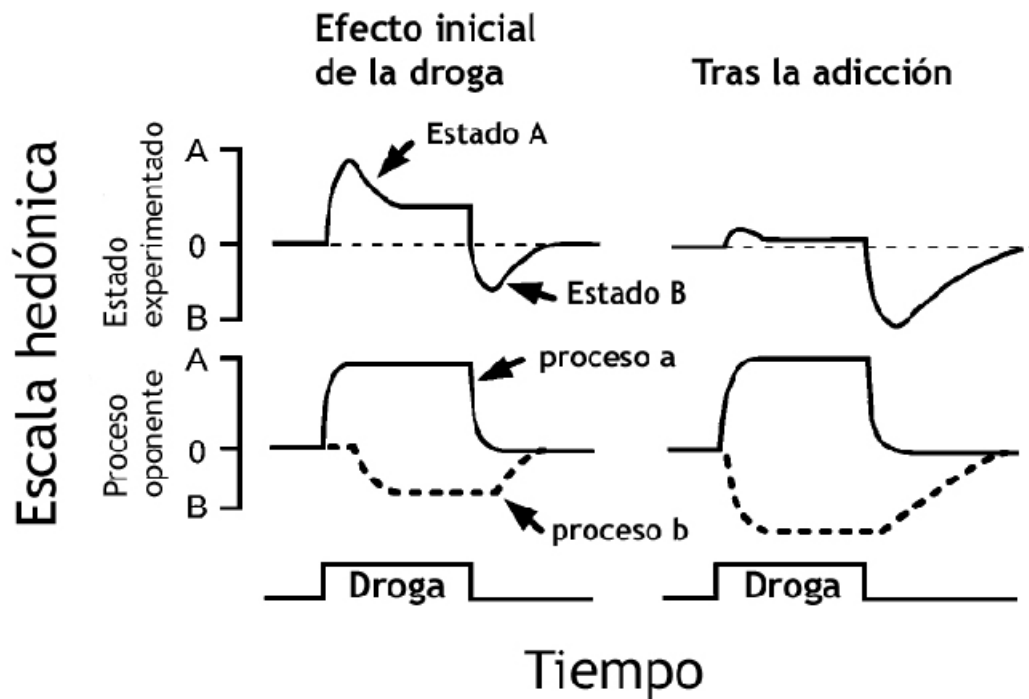


Figura 6. Modelo de adicción del proceso oponente (de Salomón y Corbit, 1974).

Los conceptos de tolerancia y dependencia están expuestos intrínsecamente en esta teoría (Solomon y Corbit, 1974). La intensidad del proceso A disminuye con el consumo repetido de la droga, al mismo tiempo que aumenta el proceso B, como un estado aversivo de deseo (craving). Cuando el proceso de adicción se encuentra en una fase avanzada, el estado emocional negativo, o proceso B, sigue creciendo y predomina sobre el positivo produciendo una completa tolerancia a los efectos eufóricos iniciales de la droga. El desarrollo del proceso B equivale al desarrollo de un estado afectivo negativo, en oposición al efecto hedónico de la droga, y a la aparición de un cuadro disfórico/aversivo en el momento de la interrupción del consumo de la droga. Por tanto, el individuo hará todo lo posible para evitar, prevenir o acortar ese efecto negativo (Koob y Le Moal, 2005).

3.2 Teoría motivacional de la adicción: neuroadaptación y alostasis (Koob y Le Moal, 1997)

Una de las teorías más aceptadas en la actualidad para explicar el proceso de inicio y mantenimiento de la adicción de drogas de abuso es la teoría de la espiral de desregulación del sistema de recompensa cerebral (Fig. 4) (Koob y Le Moal, 1997, 2001; Koob y cols., 2004). Esta teoría propone el desarrollo de una adaptación alostática de los sistemas motivacionales del cerebro para explicar los cambios asociados al proceso

adictivo y se encuentra basada en la teoría de los procesos oponentes anteriormente descrita.



Figura 7. Diagrama de la espiral de desregulación del sistema de recompensa cerebral (de Koob y Le Moal, 1997).

Según este modelo, en la espiral del proceso adictivo existen 3 componentes principales que son: la preocupación por conseguir la droga, la intoxicación o efecto agudo de la droga y la abstinencia asociada a un estado emocional negativo. El estado de preocupación por la droga y/ o anticipación a sus efectos se relaciona con el fenómeno de sensibilización psicomotora. Los cambios neuroadaptativos que ocurren en el SNC tras el consumo repetido de una droga son en mayor medida los causantes del estado disfórico asociado a la abstinencia de la droga. Desde un punto de vista neuroquímico, la fase de intoxicación está reflejada por la activación de los sistemas dopaminérgico y opioide, y la fase de abstinencia y de estado emocional negativo se encuentra dominada por la sobreactivación del eje hipotálamo-hipofisario-adrenal (HPA), el incremento de la síntesis de CRF (Koob y Le Moal, 2001) y la disminución de la actividad dopaminérgica. El concepto de alostasis se define como el conjunto de procesos neuroadaptativos que se desarrollan en el sistema nervioso central (SNC), para mantener una situación de equilibrio tras alterarse la homeostasis en el sistema de recompensa cerebral, debido al consumo de droga (Koob y Le Moal, 2001). Como consecuencia del consumo repetido, los circuitos cerebrales implicados en el refuerzo mantienen alteradas sus funciones en el tiempo (Koob y cols., 1989; Koob y Le Moal, 1997), y se produce una desviación

crónica del umbral de recompensa. Estos procesos neuroadaptativos van creciendo con el consumo repetido de la droga produciendo un estado patológico que consolida el consumo repetido de la misma. Se produce así una exacerbación progresiva de esta situación patológica (Koob y Le Moal, 2001; Koob y cols., 2004).

Estos procesos neuroadaptativos que aparecen durante la adicción no sólo han sido relacionados con las propiedades reforzantes de las drogas, sino también con el consumo prolongado cuyo fin no es la sensación placentera sino el evitar las consecuencias negativas del síndrome de abstinencia (Maldonado, 2003). Los efectos reforzantes agudos de las drogas de abuso parecen ser responsables del inicio y establecimiento del fenómeno adictivo (Koob, 1992). Por otra parte, los efectos negativos relacionados con la abstinencia de la droga resultan cruciales para el mantenimiento del proceso adictivo y la tendencia a la recaída tras periodos prolongados de abstinencia (Koob y Le Moal, 1997). De esta manera, esta teoría propone una visión de la adicción más real, capaz de identificar los factores neurobiológicos responsables de la vulnerabilidad a la adicción y a la recaída en individuos con una historia previa de drogodependencia.

3.3 Teoría de la sensibilización del incentivo (Robinson y Berridge, 1993)

El término “sensibilización” es utilizado en farmacología para expresar el aumento del efecto de una droga tras su administración repetida. La exposición repetida a muchas drogas de abuso provoca un aumento progresivo y duradero del efecto estimulante de dicha droga. Diversos estudios han demostrado este proceso evaluando los efectos psicomotores de las drogas de abuso, tales como su capacidad de aumentar la actividad locomotora, el comportamiento rotacional o comportamientos de tipo estereotipia (Robinson y Berridge, 1993; Stewart y Badiani, 1993). Estos hallazgos han sido relacionados con el proceso adictivo, ya que los sustratos neuronales que median los efectos psicomotores de las drogas se solapan con los sustratos neuronales responsables de las propiedades reforzantes de las drogas de abuso (Wise y Bozart, 1987). El sustrato neuronal referido es el sistema dopaminérgico mesolímbico, especialmente las proyecciones dopaminérgicas del VTA hacia el NAc.

Esta teoría separa en dos conceptos la asociación entre el valor incentivo de la droga (“wanting”) y el efecto placentero o hedónico (“liking”). Durante la administración repetida de la droga, puede observarse el fenómeno de sensibilización a determinadas acciones farmacológicas. En el animal de experimentación, este fenómeno se manifiesta de manera principal por un incremento progresivo de los efectos hiperlocomotores de la

droga (Valverde y Maldonado, 2005). La sensibilización se observa sobre todo utilizando un protocolo de administración intermitente de la droga y ha sido interpretada como una manifestación del incremento progresivo del estado de expectación a los efectos producidos por la droga, que ocurre tras su administración repetida en humanos (“wanting”) (Robinson y Berridge, 1993). Así pues, los efectos placenteros subjetivos (“liking”) no parecen estar sensibilizados durante la adicción. Al contrario, el componente de la adicción sujeto a la sensibilización y mediado por la dopamina es la motivación por la droga *per se* (“wanting”), también llamada “Saliencia Incentiva”. Si relacionamos esta teoría con la teoría de los procesos oponentes podemos observar una analogía según la cual el componente hedónico de la adicción sujeto a tolerancia (proceso A) equivale al “liking”, mientras que el componente sujeto a sensibilización (proceso B) equivale al “wanting”.

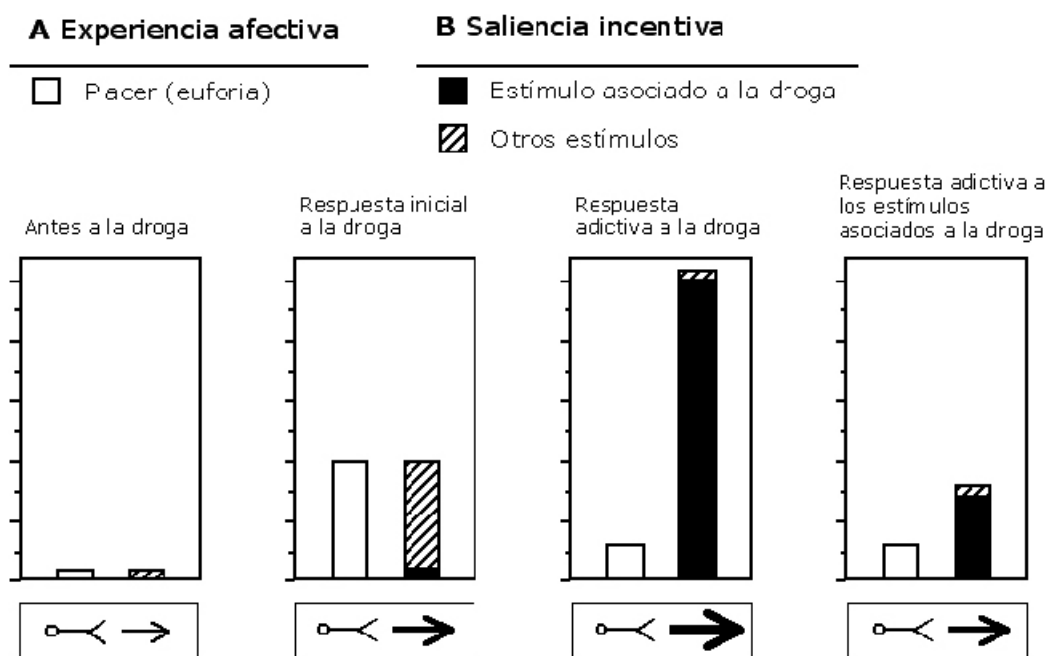


Figura 5. Ilustración esquemática de los cambios que ocurren durante el proceso de adicción en (A) placer producido por la droga, (B) “saliencia incentiva” atribuida a los estímulos asociados a la droga y (C) activación del sistema dopaminérgico (flechas) (Modificado de Robinson y Berridge, 1993).

El mecanismo cerebral implicado en el proceso de recompensa llega a estar hipersensibilizado tanto a los efectos directos de la droga como a los estímulos asociados que no son directamente atribuibles a la sustancia. Esta hipersensibilización produce deseo patológico, o “craving”, independientemente de la presencia de síntomas de retirada, y conduce a una búsqueda y comportamiento de consumo de la

droga compulsivos. Mediante un proceso de aprendizaje pavloviano o asociativo, el valor incentivo del estímulo asociado a la droga aumenta progresivamente, llevando a un comportamiento de escalada compulsiva en la búsqueda y consumo de la droga (Fig. 5). La continuada sensibilización de este sistema provoca en última instancia que los adictos sean muy vulnerables a los fenómenos de recaída.

4 Modelos animales de la adicción de drogas de abuso

La mayor parte del progreso realizado en el estudio de la adicción, y sus bases neurobiológicas, proviene de trabajos desarrollados en modelos animales. A pesar de que no existe ningún modelo animal completo del proceso adictivo tal y como se desarrolla en humanos, los modelos animales nos permiten investigar elementos específicos que forman parte del proceso adictivo (Koob y Le Moal, 2005).

En este capítulo se resume la teoría de algunos de los modelos animales más utilizados para estudiar la adicción.

4.1 Sensibilización de los efectos locomotores inducidos por las drogas

En humanos y en animales, diversas drogas de abuso aumentan la atención y la actividad motora, produciendo un incremento de la locomoción, la exploración y la ejecución de tareas. Estos efectos activadores de la locomoción son fácilmente perceptibles y tienen un sustrato neurobiológico que en parte es común con el responsable de los efectos de recompensa (Wise y Bozarth, 1987). En este sentido, se ha descrito que en el animal de experimentación, la actividad locomotora expresada frente a una situación novedosa es directamente proporcional a la habilidad de desarrollar una conducta de autoadministración de Anfetamina (Piazza y cols., 1990a), lo que supone la existencia de una correlación entre la actividad locomotora ante la novedad y la vulnerabilidad para sufrir una adicción.

Tras la exposición repetida a drogas como la morfina, la nicotina y los psicoestimulantes (Anfetamina y Cocaína), su efecto activador de la locomoción aumenta persistentemente, fenómeno conocido como “sensibilización psicomotora” (Vanderschuren y cols., 2001; Schoffelmeer y cols., 2002; Robinson y Berridge, 2003). Del mismo modo, la administración repetida de estas drogas produce una sensibilización sobre la liberación de dopamina en el NAc (Robinson y cols., 1988). Además, los efectos de recompensa y placer de las drogas de abuso también se encuentran aumentados en animales sensibilizados (De Vries y cols., 1998). Así pues, dado el carácter persistente de estos fenómenos, se plantea un paralelismo interesante entre la sensibilización comportamental, los cambios neuroadaptativos en el sistema mesolímbico dopaminérgico tras la interrupción del consumo y el gran deseo (“craving”) que se desarrolla durante la abstinencia y que perdura incluso durante años tras la abstinencia (Vanderschuren y cols., 1999). La capacidad de las drogas de aumentar su

efecto sobre la liberación de dopamina a largo plazo tiene un interés especial para poder explicar la escalada en el consumo que se produce con ciertas drogas y que es característico de la transición entre el uso ocasional al abuso y dependencia (Vezina, 2004). De acuerdo con la teoría propuesta por Robinson y Berridge (1993), la sensibilización neuroquímica aumenta de manera exclusiva la búsqueda de la droga o “wanting”, sugiriendo que la sensibilización es el paso fundamental hacia la adicción y la recaída.

En conjunto, según esta teoría, la capacidad de las drogas de reinstaurar una conducta asociada a su consumo está directamente relacionada con su habilidad de provocar una sensibilización neuroquímica y comportamental (Stewart y Vezina, 1988; Robinson y Berridge, 1993, De Vries y cols., 1998; Vanderschuren y cols., 1999). En tal caso y hablando en términos generales, con un modelo animal de sensibilización locomotora seríamos capaces de predecir la capacidad de la droga para producir abuso y recaída tras un período de abstinencia. Este modelo es limitado ya que parte de una teoría restrictiva, y además evaluando la locomoción sólo se mide un componente indirecto del proceso adictivo.

4.2 Condicionamiento espacial

El modelo de condicionamiento espacial es un procedimiento basado en el condicionamiento clásico que sirve para investigar el efecto de recompensa que producen las drogas de abuso (Katz y Gormezano, 1979). Brevemente, los animales exploran dos compartimentos neutros, pero diferentes entre sí. Uno de ellos estará asociado a los efectos de la droga. Tras el condicionamiento, al animal se le ofrece la oportunidad de elegir entre los dos compartimentos, el tiempo que el animal pasa en el compartimento asociado a la droga es un índice indirecto del valor reforzante de dicha droga. El animal expresará preferencia por aquel contexto donde ha experimentado un refuerzo positivo (preferencia de plaza condicionada) y evitará aquel contexto que le induzca un estado aversivo (aversión de plaza condicionada).

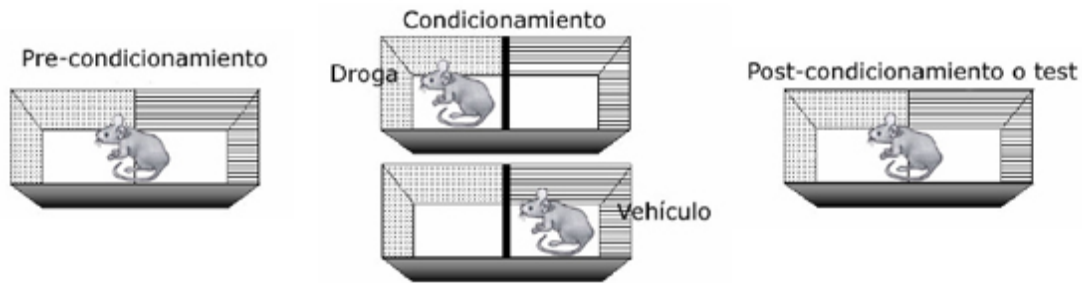


Figura 8. Paradigma del condicionamiento espacial (Modificado de Castañé y cols., 2005).

Sin embargo, este modelo tiene diversas limitaciones. Por ejemplo, el animal recibe la droga pasivamente administrada por el experimentador. Esto representa una restricción para estudiar el proceso adictivo, en tanto en cuanto el objetivo de la investigación es identificar el consumo de la droga. Además, existe controversia sobre la validación de este modelo como medida de placer inducido por una droga en humanos y en primates no-humanos (Bardo y Bevins, 2000). Por otro lado, el modelo de condicionamiento espacial es una manera sencilla, rápida y económica de evaluar las propiedades placenteras de las drogas. Así, este modelo nos proporciona una herramienta única para comprobar el condicionamiento que puede ejercer una droga reforzante y nos da información indirecta sobre sus posibles efectos placenteros o disfóricos (Carboni y Vacca, 2003; Roux y cols., 2003).

4.3 Condicionamiento operante o instrumental: autoadministración intravenosa

El condicionamiento operante o instrumental nace de la teoría psicológica del aprendizaje desarrollada por Skinner. La base fundamental de este paradigma es la noción de contingencia entre la respuesta que se solicita al animal y el refuerzo que recibe como consecuencia de la misma. De este modo, cuando una situación reforzante (los efectos de la droga) es contingente con una respuesta (accionar una palanca, introducir el hocico en un agujero) la probabilidad de que aparezca dicha conducta aumenta (Skinner, 1938). El condicionamiento operante, es sin duda uno de los modelos más utilizados y de mayor capacidad predictiva para el estudio de los procesos neurobiológicos implicados en la adicción. El método de autoadministración más utilizado es por vía intravenosa, pero también se utilizan otras rutas de autoadministración, como la oral y la intracerebral. El método de condicionamiento

operante también se utiliza para estudiar la motivación por los refuerzos naturales como el agua o la comida.

El condicionamiento operante ha permitido explicar de una manera fundamenta la conducta de autoadministración de las drogas de abuso. Self y Nestler (1995) señalaban que las drogas son clasificadas como refuerzos si la probabilidad de una respuesta de búsqueda se incrementa cuando es asociada con la exposición de la droga. Además, las drogas que los animales de experimentación se autoadministran corresponden con las drogas con potencial de abuso en humanos (Collins y col, 1984). Así, la autoadministración intravenosa de una droga es el modelo animal por excelencia que predice el potencial de abuso (Collins y cols., 1984).

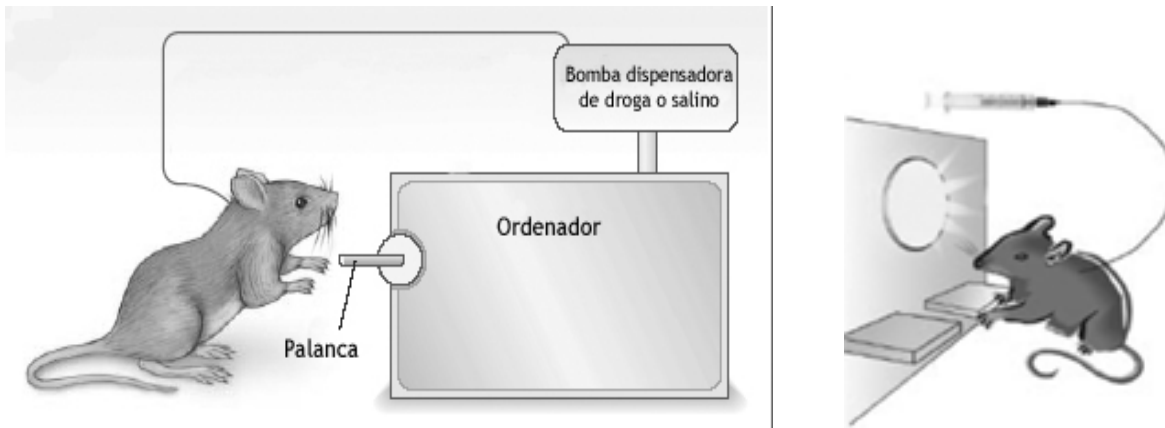


Figura 9. Modelo de condicionamiento operante reforzado por la autoadministración intravenosa de una droga. (Modificado de Camí y Farré, 2003; Le Foll y Goldberg, 2005).

Este modelo es una variación de la original “caja de Skinner” donde hay dos manipulandos (p.e.: palanca), la respuesta en el manipulando activo conduce directamente a la liberación de una infusión intravenosa (refuerzo), y la respuesta en el manipulando inactivo no tiene ninguna consecuencia (Fig. 9). Con frecuencia, se usan protocolos de tipo “razón fija” en los que el número de respuestas rqueridas para obtener el refuerzo es fijo durante cada sesión. Por ejemplo, en razón fija 1, el animal debe apretar una vez la palanca para obtener una infusión de droga. Existen otros protocolos como el de razón variable, intervalo fijo, intervalo variable, patrones de segundo orden, etc. En los programas de intervalo, el refuerzo ocurre tras un periodo de tiempo fijo o variable, a partir de la última respuesta reforzada. Los protocolos de segundo orden son más complejos, ya que incluyen a la vez dos programas diferentes: uno de los protocolos es intervalo fijo (FI) y el otro razón fija (FR). Por ejemplo, en un

programa de FI5min-(FR1:S), la primera respuesta tras la finalización del intervalo de 5 min produce el refuerzo.

El paradigma de autoadministración, modelo nos permite evaluar de forma directa la eficacia reforzante de la droga, así como diferentes procesos implicados en la conducta adictiva como son la adquisición, el mantenimiento, la extinción o la recaída.

4.3.1 Adquisición

En la fase de adquisición los animales se enfrentan por primera vez a la droga y a sus propiedades reforzantes. En esta etapa, se inicia el proceso en el que los animales aprenden a discriminar entre el manipulando activo y el inactivo para obtener el refuerzo. De forma habitual, se establece un criterio de adquisición que requiere cierta estabilidad en el número de infusiones recibido en cada sesión, una clara discriminación entre manipulandos y un mínimo de refuerzos por sesión.

Existen diferentes factores que influyen la conducta de autoadministración y, en particular, en su adquisición. En primer lugar, los estudios de adquisición de una conducta de autoadministración intravenosa muestran que las diferencias individuales juegan un papel muy importante en el desarrollo de dicha conducta (Piazza y cols., 1989). También, existen evidencias de una correlación positiva entre el nivel de actividad locomotora desarrollado por un animal en un ambiente novedoso y su capacidad para desarrollar un comportamiento de autoadministración intravenosa (Piazza y cols., 1990a). Un modelo muy sensible para determinar esta vulnerabilidad es exponer a los animales a dosis muy bajas de la droga objeto de estudio, en las que solamente los animales más sensibles desarrollarían una conducta de autoadministración (Piazza y Le Moal, 1996, Piazza y cols., 2000). Las investigaciones sobre la influencia del estrés en el consumo de drogas han mostrado que el estado emocional del individuo tiene una gran importancia en el desarrollo de una conducta de autoadministración. De este modo, en animales adultos un estrés de tipo físico como un pinzamiento en la cola o un choque eléctrico facilita la adquisición de un comportamiento de autoadministración de cocaína y anfetamina (Piazza y cols., 1990b, Goeders y Guerin, 1994; revisión en Goeders, 2002). También la privación de comida facilita la adquisición de autoadministración de psicoestimulantes, opiáceos y alcohol (Carrol y Meisch, 1984; Kanarek y Marks-Kaufman, 1988). De manera similar, la adquisición de autoadministración oral de morfina y alcohol, así como de heroína por vía intravenosa, se encuentra facilitada por el aislamiento social, lo cual supone un estrés de tipo psicológico (Revisión en Piazza y Le Moal, 1998).

Como hemos comentado en apartado 1.3, los factores genéticos también influyen en la vulnerabilidad a desarrollar una adicción. Así, existen diferentes cepas de ratas y de ratones que presentan susceptibilidades muy diferentes a los efectos reforzantes de las drogas de abuso. Es el caso de las ratas Lewis que poseen una apetencia natural altamente superior por la cocaína y la morfina que las ratas Fisher (Crabbe y cols., 1994). Igualmente, los ratones C57Bl/6 consumen más etanol, cocaína y morfina que la cepa DBA/2 (Risinger y cols., 1998; Kuzmin y Johansson, 2000; Ferraro y cols., 2005). Comparando las diferentes cepas de animales, se pueden observar modificaciones sobre el sistema de la recompensa que ayudan a explicar la predisposición al consumo de drogas (Deroche y cols., 1997).

4.3.2 Mantenimiento

Durante la etapa de mantenimiento, el animal ya ha aprendido que la droga tiene efectos reforzantes y cual es la respuesta requerida para su presentación. Si aumentamos el valor de razón fija requerida para la obtención de un refuerzo, estaremos incrementando el esfuerzo que el animal debe realizar para obtener una infusión de droga, y eliminaremos posibles sesgos de comportamiento inespecífico. La autoadministración intravenosa en roedores de determinados prototipos de drogas como pueden ser la cocaína o la heroína produce un patrón comportamental característico que puede ser estudiado desde un punto de vista farmacológico (Fig. 10). Entre el rango de dosis que mantiene una respuesta estable, los animales son capaces de compensar su tasa de autoadministración en función de la dosis, produciendo más respuestas ante dosis bajas que ante las altas. Cuando se realiza un tratamiento farmacológico para observar un alteración en la conducta de autoadministración, un incremento de la tasa de repuesta se corresponde con una disminución de la dosis de la droga, lo cual se interpreta como una disminución de la potencia reforzante de la droga que se está estudiando. Existen numerosos estudios farmacológicos que demuestran que un desplazamiento de la curva dosis respuesta hacia la izquierda indica un aumento en la sensibilidad del animal a la droga, mientras que al contrario, un desplazamiento hacia la derecha representa una reducción de dicha sensibilidad (Koob y cols., 1986; Deminiere y cols., 1989; Wise, 1996). Se ha demostrado que también existen desplazamientos verticales de la curva dosis respuesta que reflejan cambios en la eficacia reforzante de la droga y que ayudan a representar un fenotipo de vulnerabilidad (Piazza y cols., 2000). Los animales que tiene un desplazamiento por encima de la curva dosis-respuesta presentan un número de respuestas más elevado a la misma dosis y consumen mayor cantidad de droga. En consecuencia, estos animales serían más vulnerables al desarrollo de la adicción, mientras que un desplazamiento por

debajo de la curva dosis-respuesta representa una menor vulnerabilidad al proceso adictivo.

En general, el estudio del mantenimiento de un comportamiento de autoadministración de una droga es una evaluación indirecta de la conducta adictiva del animal. Sin embargo, este modelo no permite distinguir si dicho comportamiento es mantenido para volver a experimentar los efectos hedónicos de la droga o para evitar sus efectos aversivos.

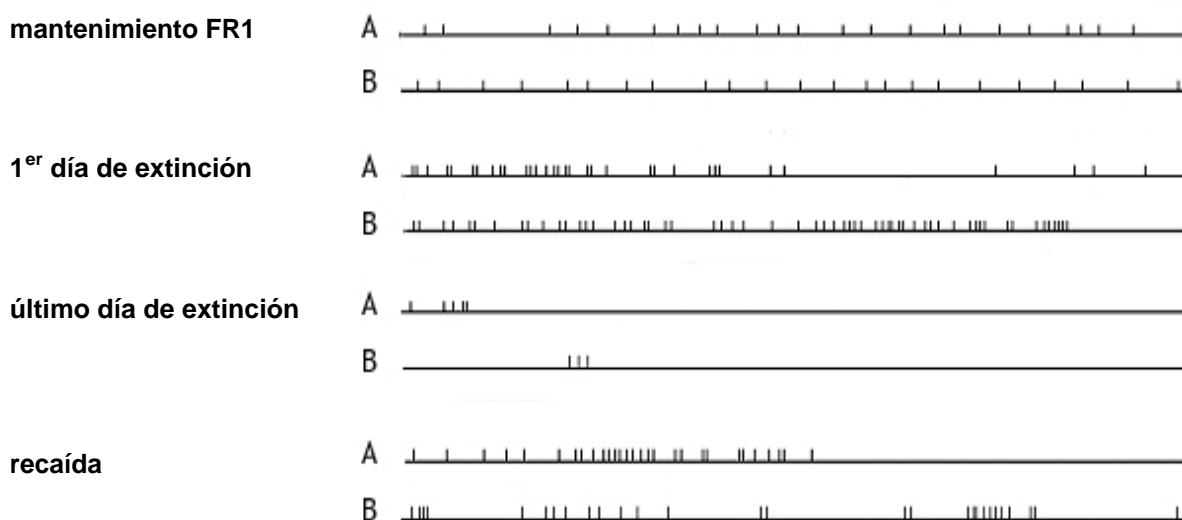


Figura 10. Patrones de respuesta representativos de dos ratones (A y B) en diferentes etapas de autoadministración de cocaína. Cada barra vertical representa una infusión en una duración máxima de dos horas.

4.3.3 Razón progresiva

Los protocolos de razón progresiva se utilizan para cuantificar el valor reforzante de la droga que se autoadministra y consisten en aumentar progresivamente, en una misma sesión, el número de respuestas requeridas para la obtención de cada refuerzo. El llamado “Breaking Point” (o punto de corte) determina el punto donde el animal alcanza el máximo de respuestas posibles, deja de ejecutar respuestas, reflejando el esfuerzo máximo que el animal es capaz de realizar para obtener una infusión de droga. Un aumento de la dosis de droga autoadministrada suele producir un aumento en el “Breaking Point” (Roberts y cols., 1989). Así, este tipo de estudios nos proporcionan información directa sobre la motivación que el animal manifiesta por la droga.

4.3.4 Extinción

La resistencia a la extinción de un comportamiento de autoadministración puede representar un modelo propio para estudiar las propiedades motivacionales de las drogas. Sin embargo, este proceso de extinción puede ser simplemente una etapa previa requerida para los estudios de recaída.

La etapa de extinción consiste en la pérdida de aprendizaje de la conducta asociada al consumo de droga. Para ello, es necesario que los animales hayan adquirido previamente una conducta de autoadministración. Después, la droga es substituida por vehículo. Las sesiones de extinción se llevan a cabo en las mismas condiciones que las sesiones de entrenamiento, excepto que después de la respuesta requerida no se libera ninguna infusión de droga. Durante la sesión en la que el animal experimenta esta situación por primera vez y como resultado de esa búsqueda compulsiva, se observa un incremento muy significativo en el número de respuestas tanto en el manipulando activo como en el inactivo. De manera progresiva, el animal dejará de responder, ya que habrá extinguido su comportamiento de autoadministración (Fig. 10). Mediante la valoración de la persistencia de un comportamiento de búsqueda por la droga en ausencia de la misma, los protocolos de extinción nos proporcionan también una medida de las propiedades motivacionales de las drogas.

4.3.5 Recaída

Los fenómenos de recaída han sido investigados de forma extensa en los últimos años. La reinstauración de una conducta (extinguida previamente) asociada al consumo de droga refleja la cronicidad del fenómeno adictivo. Los modelos animales de recaída utilizan tres estímulos clásicos: recaída provocada por una inyección de droga, recaída provocada por la presentación de un estímulo asociado a la droga (Fig. 10) y la recaída provocada por estrés. Estímulos ambientales asociados repetidamente con refuerzos primarios (p.e.: comida, droga) adquieren propiedades reforzantes mediante un proceso de condicionamiento clásico (Mc Farland y Ettemberg, 1997, Arroyo y cols., 1998, See y cols., 1999, Weiss y cols., 2000; Deroche-Gamonet y cols., 2004). Se ha postulado que estos refuerzos condicionados tienen la capacidad de inducir un estado subjetivo que contribuyen al deseo por la droga y a la recaída. Un estímulo predictivo de la droga puede ser una señal de disponibilidad de la misma, y por tanto proporciona una motivación especial para empezar un comportamiento que lleve al individuo en contacto directo con la droga (Meyer y Mirin, 1979).

Los estudios que usan este modelo sugieren que las vías neuronales que median los tres tipos diferentes de recaída en la conducta de búsqueda compulsiva no son idénticos.

Además, los mecanismos que median la recaída inducida por una exposición a la droga son diferentes de los que median el placer producido por la misma. Por ejemplo, la recaída en la conducta de autoadministración de cocaína, inducida por estímulos condicionados a la droga, se encuentra atenuada tras la inactivación de estructuras cerebrales tales como la PFC, la amígdala basolateral y el hipocampo dorsal (Fuchs y cols., 2005). Estudios recientes han demostrado que la recaída inducida por una exposición de cocaína está modulada por la neurotransmisión dopaminérgica y glutamatérgica en el NAc y en otras áreas mesocorticolímbicas (para revisión véase Bossert y cols., 2005). Por otra parte, la recaída provocada en respuesta al estrés tiene su sustrato neurobiológico en las neuronas glutamatérgicas y dopaminérgicas del VTA sobreactivadas por efecto del incremento de CRF (Wang y cols., 2005). Otras estructuras cerebrales también son de gran importancia en la recaída inducida por estrés, como el lecho del núcleo de la estría terminal, la PFC dorsal, NAc, VTA, amígdala basolateral y tálamo mediodorsal (Capriles y cols., 2003; Mc Farland y cols., 2004; Xi y cols., 2004).

Uno de los factores que pueden influir en la recaída es el tipo de consumo que se ha experimentado anteriormente. Así, un acceso a la droga moderado conduce al animal a desarrollar un consumo estable. Por el contrario, un acceso excesivo durante la fase de intoxicación modifica el umbral hedónico de percepción de la droga, favorece el fenómeno de recaída después de un período de abstinencia y el reinicio de la conducta de autoadministración se hará en forma de un consumo excesivo y en forma de escalada (Ahmed y Koob, 1998; 1999; 2005; Ahmed y cols., 1999, 2002). Por otra parte, la duración del período de abstinencia tras la autoadministración tiene un gran efecto sobre la recaída inducida por estrés o por el estímulo asociado a la droga (Shaham y cols., 2002).

El modelo de autoadministración intravenosa de drogas de abuso en animales de experimentación posee una gran fiabilidad y validez predictiva. Utilizando los protocolos adecuados, la motivación y la eficacia reforzante se modifica en función de la droga, de la dosis, y del estado de dependencia de los animales. La conducta de autoadministración de drogas es estable entre sesiones y puede ser alterada por antagonistas de estas drogas.

La relación entre la conducta operante en animales y los efectos eufóricos alcanzados en humanos no puede ser extrapolada directamente. Sin embargo, debido a la alta concordancia entre la capacidad de una droga para mantener un comportamiento operante, cuyo objetivo es recibir una infusión intravenosa, y su abuso en humanos, el

paradigma de autoadministración se utiliza de un modo eficaz como modelo predictivo del potencial de abuso de una droga en humanos (Collins y cols., 1984).

4.4 Autoestimulación intracraneal (ICSS)

La ICSS es una técnica que consiste en observar la conducta derivada de aplicar una estimulación eléctrica en determinadas áreas cerebrales. Para ello, se procede a la implantación de electrodos en estructuras cerebrales específicas. El animal realiza una conducta operante para recibir la estimulación eléctrica allí donde el electrodo ha sido implantado (Fig. 11). Así, cuando dicha estimulación provoca un efecto positivo o placentero, los animales son capaces de autoadministrarse estimulaciones eléctricas en ciertas estructuras cerebrales. Estudios en humanos también han descrito efectos placenteros tras la estimulación de algunas de estas áreas (Olds y Milner, 1954).

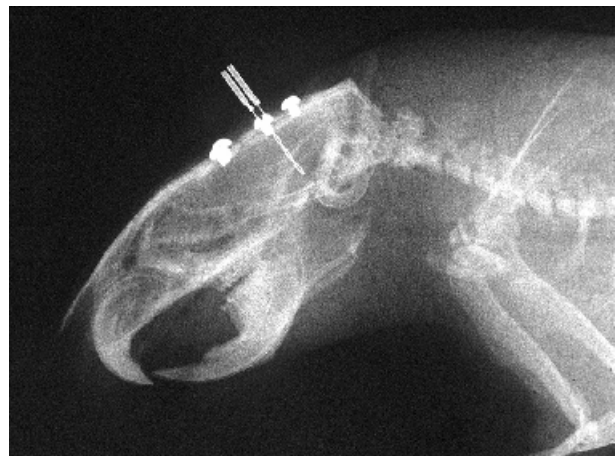
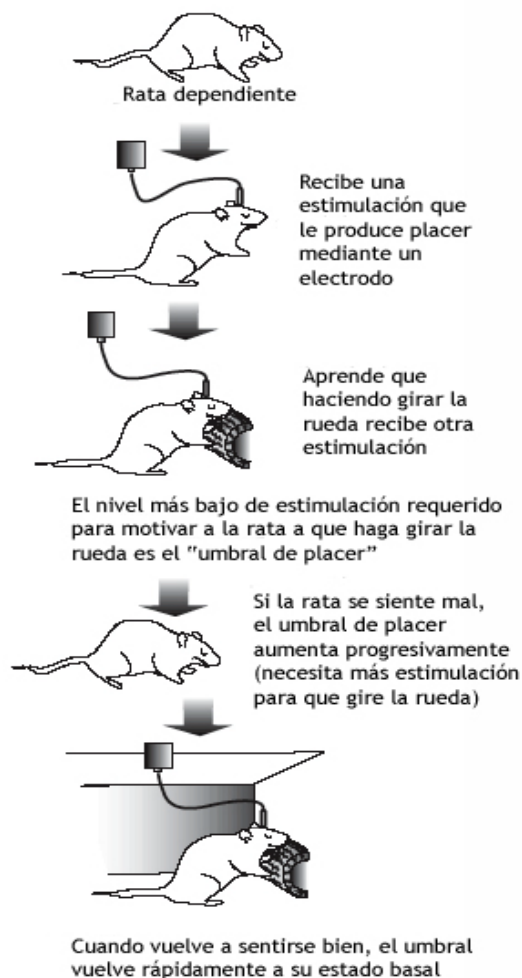


Figura 11. Autoestimulación intracraneal. Modelo descrito por Athina Markou y cols. para evaluar los efectos disfóricos del síndrome de abstinencia a nicotina (Kenny y cols., 2003).

La estructura para la que se han encontrado niveles más altos de ICSS es el haz prosencefálico medial (Gallistel, 1986). El efecto placentero de la ICSS es muy elevado, y esto ha llevado a la hipótesis de que la ICSS activa directamente circuitos neurales que se activan ante refuerzos naturales (p.e.: comida, agua, sexo) y drogas. El tratamiento con drogas de abuso induce un estado hedónico positivo en el animal de experimentación, y como consecuencia el animal reduce el nivel de autoestimulación. Si el tratamiento es crónico el umbral de placer se modifica y desciende de manera progresiva, indicando tolerancia. Así pues, los estudios de ICSS reflejan un cambio en el punto de equilibrio hedónico (Ahmed y Koob, 1998). Por otro lado, la abstinencia de una droga en animales dependientes eleva los umbrales de ICSS, lo que corresponde una disminución del umbral hedónico del animal (Markou y Koob, 1991; 1992; Gardner y Vorel, 1998; Paterson y cols., 2000).

Del mismo modo que ocurre para la técnica de autoadministración, se ha descrito una clara correlación entre la capacidad de una droga de disminuir el umbral de autoestimulación y el potencial de abuso de dicha droga (Kornetsky y Esposito, 1979; Kornetsky y Bain, 1992).

4.5 Tolerancia a los efectos agudos producidos por las drogas

La tolerancia es una disminución de la respuesta farmacológica tras la administración repetida de la misma dosis, o la necesidad de ir aumentando la dosis para producir un mismo efecto. La tolerancia se debe a la administración repetida o prolongada de algunos fármacos, y ocurre cuando el organismo se adapta a la continua presencia del fármaco. Por lo general, son dos los mecanismos que pueden participar en el desarrollo de la tolerancia: (1) el metabolismo del fármaco se acelera, habitualmente porque aumenta la actividad de las enzimas hepáticas que metabolizan el fármaco (tolerancia farmacocinética), y (2) disminuye la cantidad de receptores, la sensibilidad de los mismos o se activan sistemas biológicos que se oponen a sus acciones farmacológicas (tolerancia farmacodinámica).

En relación con el proceso de adicción, se considera que la tolerancia es una consecuencia directa de los intentos del organismo para compensar la inusual condición de intoxicación por la droga. La droga altera los mecanismos homeostáticos normales del cerebro y estos producen efectos contrarios a los de la droga. Estos mecanismos explican por qué se necesita tomar cada vez más droga para conseguir los mismos efectos que se produjeron cuando el individuo se inició en el consumo. También contribuyen a explicar la sintomatología del síndrome de abstinencia (ver punto 4.6), ya que al cesar la administración de la droga, los mecanismos compensatorios se hacen evidentes sin ser contrarrestados por la acción de la droga. La evaluación de la

tolerancia a los efectos agudos producidos por las drogas no es un modelo de adicción en sí mismo, pero nos permiten aproximarnos a este fenómeno en el animal de experimentación.

Para un mismo fármaco o droga, no existe un desarrollo idéntico de la tolerancia para todos los efectos inducidos por dicho fármaco. La tolerancia producida por los opioides ha sido estudiada de manera extensa y se desarrolla con relativa rapidez para las acciones depresoras, como la analgesia, la depresión respiratoria, la euforia, la sedación y la hipotensión y mucho menos, para otras como la miosis y la acción gastrointestinal. Una de las teorías más reconocidas para explicar el fenómeno de tolerancia opioide es la de regulación al alza del AMPc en determinadas células como las neuronas noradrenérgicas del locus coeruleus (Camí y Farre, 2003; Nestler, 2004). Así, la administración aguda de opiáceos, inhibe la actividad de las neuronas noradrenérgicas del locus coeruleus mediante su unión a los receptores opioides μ , los cuales están acoplados a proteínas G. Entre los mecanismos intracelulares que se activan tras la estimulación de la proteína G acoplada al receptor opioide μ , la disminución de la concentración del AMPc y la actividad de la proteína quinasa A (PKA), son las más relevantes. Esto, junto con la inhibición de canales catiónicos de K^+ , provoca una disminución de la excitabilidad neuronal en el locus coeruleus (Monteggia y Nestler, 2003). Tras la administración repetida o crónica, la actividad de la adenilato ciclasa y de la PKA se incrementa de forma progresiva de manera compensatoria y, como consecuencia, las concentraciones de AMPc en las neuronas del locus coeruleus aumentan poco a poco. Así, se necesitan cada vez dosis mayores de opioides para mantener la disminución de AMPc (tolerancia). Al cesar el consumo del opiáceo, o al administrar un antagonista como la naloxona, se produce un aumento de AMPc, que manifiesta el efecto compensatorio que sobre dicho sistema ha producido la administración crónica del opiáceo. Este incremento del AMPc aumenta la excitabilidad de las neuronas noradrenérgicas del locus coeruleus y es una de las principales bases moleculares de los síntomas físicos de la abstinencia. La regulación al alza de la vía del AMPc también ha sido demostrada en las neuronas gabaérgicas del NAc, estructura típicamente relacionada con las propiedades reforzantes de las drogas de abuso. Así, infusiones de inhibidores o activadores de la vía del AMPc en el NAc, disminuyen o aumentan respectivamente las propiedades reforzantes de la cocaína y los opiáceos (Self y Nestler, 1995; Self y cols., 1998). En este sentido, ciertos estudios han demostrado el fenómeno de tolerancia a los efectos reforzantes de psicoestimulantes como la cocaína (Emmett-Oglesby y cols., 1993; Negus y Mello, 2003) y de opioides (Winger y Woods, 2001). Mediante el uso del paradigma de autoadministración intravenosa, se ha observado que una exposición crónica a la droga induce un desplazamiento horizontal hacia la derecha de la curva dosis-respuesta de autoadministración, indicando

tolerancia al refuerzo inducido por dicha droga (Emmett-Oglesby y cols., 1993). Además, un tratamiento crónico de cocaína produce un incremento de la actividad de la PKA y de los niveles de AMPc (Terwilliger y cols., 1991), así como una reducción de las proteínas G inhibitorias (Nestler y cols., 1990) en el NAc. Por lo tanto, aumentos en la actividad de la PKA inducen una conducta de autoadministración de cocaína acrecentada (Self y cols., 1998). Estos autores proponen la posibilidad de que, tras la repetida exposición a cocaína, la regulación tónica al alza del AMPc en el NAc representa el mecanismo intracelular responsable de la tolerancia a los efectos reforzantes de la cocaína (Self y cols., 1998). De manera similar, este fenómeno ha sido demostrado en el VTA, la amígdala y el núcleo dorsal del rafe (Terwilliger y cols., 1991; Bonci y Williams, 1997; Jolas y cols., 2000), indicando una relación entre el sistema gabaérgico y serotoninérgico con los síntomas somáticos y emocionales asociados al síndrome de abstinencia. La inhibición de la vía del AMPc también induce una disminución de la fosforilación de diferentes proteínas, como es el caso del factor de transcripción CREB. Tras un tratamiento crónico con opiáceos aumenta la expresión de CREB. El aumento de CREB induce un incremento de la síntesis de dinorfina, sustancia que activa los receptores opioides kappa en las neuronas del VTA, que a su vez produce una disminución de la liberación de dopamina en el NAc. Esta reducción contribuye a las manifestaciones somáticas de la abstinencia física y al estado emocional negativo (disforia y anhedonia) característico de dicha abstinencia (Maldonado y cols., 1996; Nestler, 2004).

Otros fármacos como por ejemplo el THC también producen tolerancia a varios de sus efectos farmacológicos. Diferentes estudios han demostrado tolerancia a los efectos de los cannabinoides en nocicepción, locomoción, hipotermia, catalepsia, movilidad gastrointestinal y respuestas cardiovasculares (revisión en Maldonado y Valverde, 2003). En el animal de experimentación, la aparición de tolerancia es especialmente rápida, y se puede observar un importante descenso de las respuestas agudas después de la segunda administración de un agonista cannabinoide (Abood y Martin, 1992; Hutcheson y cols., 1998). Se ha demostrado que durante el tratamiento crónico con THC se produce una disminución de la densidad de receptores CB1 (Rodríguez de Fonseca y cols., 1994), así como del mRNA que codifica para este receptor en diversas áreas cerebrales (Romero y cols., 1998). También se ha observado un descenso generalizado de los niveles cerebrales de mRNA que codifica para diferentes subunidades de las proteínas G (Rubino y cols., 1997), y estos cambios están relacionados con una desensibilización de los receptores cannabinoides CB1 (Sm y cols., 1996). Por otra parte, se ha demostrado la existencia de tolerancia cruzada entre compuestos cannabinoides y opioides lo que sugiere la existencia de una interacción funcional entre ambos sistemas (Bloom y Dewey, 1978; Thorat y Bhargava, 1994; Castañé y cols., 2005).

Otra droga de abuso que provoca tolerancia tras su consumo repetitivo es la nicotina. Ratones tratados crónicamente con nicotina desarrollan una regulación al alza de los receptores nicotínicos (Collins y cols., 1989). También existe tolerancia cruzada entre compuestos nicotínicos y opioides a nivel de antinocicepción (Biala y Weglinska, 2006). De manera similar, el consumo crónico de alcohol produce cambios adaptativos en la transmisión gabaérgica y glutamatérgica que contribuyen en el desarrollo de la tolerancia a sus efectos farmacológicos (Heinz y cols., 2003), y en la tolerancia cruzada con opioides (Khanna y Mayer, 1982).

4.6 Síndrome de abstinencia físico

El síndrome de abstinencia es el conjunto de manifestaciones somáticas que aparecen al retirar el consumo de una determinada droga con la que se ha generado un cuadro de dependencia física. Estos síntomas se alivian al volver a usar la droga cuyo consumo se dejó de forma abrupta. Sin embargo, no todas las drogas son capaces de desarrollar un cuadro de dependencia física. Así, la interrupción repentina del consumo de algunas drogas no produce síndrome de abstinencia físico. Es el caso de la cocaína, que a pesar de provocar una síndrome de naturaleza psíquica muy importante, su abstinencia no induce la expresión de signos somáticos físicos. No obstante, otras sustancias dan lugar a un síndrome de abstinencia, con signos característicos y de diferente gravedad. El síndrome de abstinencia de opiáceos y alcohol es muy destacado, mientras que las manifestaciones físicas de la abstinencia de nicotina y THC son más leves.

En el animal de experimentación, este modelo permite evaluar el componente físico de la dependencia desarrollada por algunas drogas como la morfina, los cannabinoides, el alcohol o la nicotina. La interrupción de un tratamiento crónico de la droga produce el síndrome de abstinencia, que se caracteriza por presentar respuestas opuestas a las acciones iniciales agudas de la droga. De este modo, el animal expresa signos comportamentales que pueden ser fácilmente cuantificados y que reflejan los síntomas físicos de dicha abstinencia. Para estudiar el síndrome de abstinencia en el animal de experimentación, se realiza en primer lugar un tratamiento crónico para inducir la dependencia. Posteriormente, se puede observar el síndrome de abstinencia de una manera espontánea, o precipitarlo con un antagonista específico de la droga que se esté estudiando. La precipitación del síndrome de abstinencia con un antagonista específico, nos permite evaluar los signos somáticos característicos de la abstinencia, al mismo tiempo en todos los animales. Existen escalas de puntuación para la cuantificación de los síndromes de abstinencia de opiáceos (Gellert y Holtzman, 1978), nicotina (Malin y cols., 1992), alcohol (Macey y cols., 1996) y cannabinoides (Hutchenson y cols., 1998). Debido a sus manifestaciones severas, los signos físicos asociados al síndrome de

abstinencia de opiáceos han sido estudiados de forma extensa (Aghajanian, 1978; Maldonado y cols., 1992; Maldonado y Koob, 1993). La expresión de la abstinencia física de opioides se correlaciona con una gran hiperactividad neuronal directamente relacionada con las manifestaciones somáticas de dicho síndrome (Rasmussen y cols., 1990). Entre las estructuras cerebrales más implicadas en la expresión de dicha abstinencia se encuentran el locus coeruleus y la sustancia gris periacueductal (Maldonado y cols., 1993; Maldonado y cols., 1995). En el caso del síndrome de abstinencia cannabinoide una estructura cerebral implicada de forma directa es el cerebelo (Tzavara y cols., 2000; Castañé y cols., 2004). Hay que destacar que el síndrome de abstinencia de todas las drogas de abuso se encuentra también acompañado por un componente emocional negativo que caracteriza la parte psíquica de dicha abstinencia. Una manera de evaluar el componente emocional de la abstinencia es utilizando el modelo de condicionamiento espacial (ver punto 4.1 de este capítulo).

5 Sistema endocannabinoide

Aunque las referencias históricas del uso del *Cannabis Sativa* con fines médicos data de hace más de 4000 años (Adams y Martin, 1996), la estructura química de sus principales compuestos activos tales como el Δ^9 -tetrahidrocannabinol (THC) no fue identificada hasta pasada la mitad del siglo XX (Mechoulam y Gaoni, 1965). Durante la década de los 80, diversos estudios sugerían la presencia de receptores cannabinoides en el SNC (Razdan, 1986; Devane y cols., 1988), pero no fue hasta 1990 cuando se clonó el primer receptor cannabinoide (receptor CB1) (Matsuda y cols., 1990). Más tarde, en 1993, el grupo de Munro y cols., clonó el receptor cannabinoide CB2. Más tarde, la anandamida y el 2-araquidonil glicerol fueron identificados como ligandos endógenos de los receptores cannabinoides (Devane y cols., 1992; Mechoulam y cols., 1995; Sugiura y cols., 1995). Desde entonces el conocimiento sobre el sistema endocannabinoide y su importancia fisiológica se ha expandido en gran manera (Fowler, 2005).

5.1 Cannabinoides endógenos

Los ligandos endógenos de los receptores cannabinoides son compuestos derivados de ácidos grasos poliinsaturados, siendo los más representativos la etanolamida del ácido araquidónico, también llamada anandamida (Devane y cols., 1992) y el 2-araquidonil glicerol (Mechoulam y cols., 1995, Sugiura y cols., 1995). La palmitoiletanolamida es otro miembro de esta familia de lípidos, comparte diversos efectos fisiológicos con los cannabinoides endógenos, pero es incapaz de unirse a ninguno de los dos subtipos de receptores cannabinoides descritos hasta el momento (Sugiura y cols., 2000). Otros cannabinoides endógenos han sido identificados recientemente como el 2-araquidonil gliceril éter (Hanus y cols., 2001), la virodamina (Porter y cols., 2002) y la N-araquidonildopamina (Huang y cols., 2002). Todos los cannabinoides endógenos son compuestos de naturaleza lipídica y derivados de la degradación de fosfolípidos de membrana (Piomelli, 2003).

5.1.1 Biosíntesis y metabolismo de los endocannabinoides

Los endocannabinoides cumplen algunas de las características necesarias de los neurotransmisores clásicos: se sintetizan y liberan a partir de neuronas, son capaces de unirse y activar receptores de membranas y son inactivados por recaptación y degradación enzimática en el interior de la célula. Sin embargo, los endocannabinoides no se acumulan en el interior de vesículas sinápticas como otros neurotransmisores. Así, los endocannabinoides son mediadores que se sintetizan según la demanda (Di Marzo y

cols., 1994), actúan en las proximidades del lugar donde se han liberado y una vez han actuado son rápidamente inactivados por la acción de enzimas específicas de degradación (Piomelli, 2003). La anandamida es el cannabinoide endógeno más estudiado y es sintetizada a partir de la fosfatidiletanolamina presente en la membrana celular. En su síntesis confluyen la acción sucesiva de 2 enzimas que catalizan la formación de anandamida, la N-acetiltransferasa y la fosfolipasa D (Di Marzo y cols., 1994). La anandamida se sintetiza y se libera en el momento en que existe una necesidad de la misma. La acción de los endocannabinoides está limitada por dos procesos que incluyen el transporte enzimático desde la hendidura sináptica hacia el interior de la célula, y la hidrólisis provocada por dos sistemas enzimáticos, la hidrolasa de ácidos grasos (FAAH) (Cravatt y cols., 1996) y la lipasa de monoacilglicéridos (MAGL) (Dinh y cols., 2002). Estos dos procesos ejercen un control sobre los niveles de endocannabinoides presentes en los tejidos, eliminándolos rápidamente tras su acción (Rodríguez de Fonseca y cols., 2005).

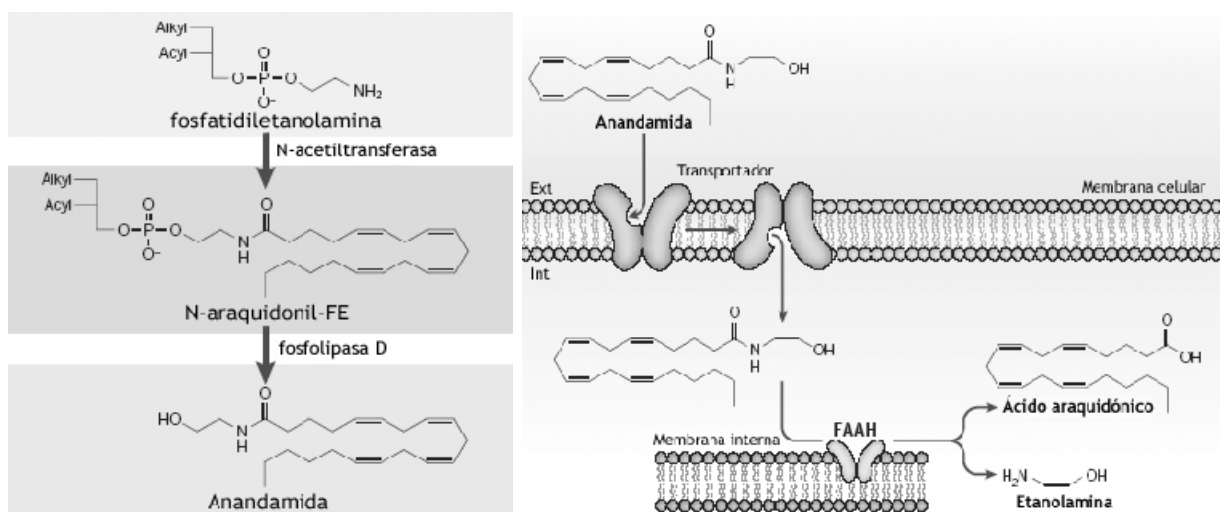


Figura 12. Mecanismo de formación e inactivación de la anandamida en neuronas (Piomelli, 2003)

El 2-araquidonil glicerol es el cannabinoide endógeno más abundante en el cerebro y su concentración es aproximadamente 200 veces superior a la de la anandamida (Stella y cols., 1997; Bisogno y cols., 1999). El proceso de formación del 2-araquidonil glicerol y otros 2-monoacilglicéridos está mediado de manera mayoritaria por la fosfolipasa C (Piomelli, 2003). Su eliminación, como la anandamida, se realiza a través de un proceso que consta de dos pasos sucesivos, recaptación y degradación enzimática. La recaptación del 2-araquidonil glicerol tiene lugar a través del mismo sistema de transporte que la anandamida (Piomelli y cols., 1999). Por otro lado, aunque el 2-

araquidonil glicerol es también sustrato de la FAAH (Goparaju y cols., 1998), se ha sugerido la existencia de otros enzimas implicados en su degradación tales como la MAGL (Dinh y cols., 2002).

5.2 Receptores cannabinoides

Los cannabinoides ejercen su acción farmacológica mediante la activación de dos tipos de receptores acoplados a proteínas G con siete dominios transmembranarios, y hasta el momento se han identificado y clonado dos tipos diferentes, el receptor cannabinoide CB1 (Matsuda y cols., 1990) y el receptor cannabinoide CB2 (Munro y cols., 1993). El receptor CB1 está ampliamente distribuido en el SNC, se considera que es el receptor acoplado a proteína G más abundante en el cerebro de mamíferos.

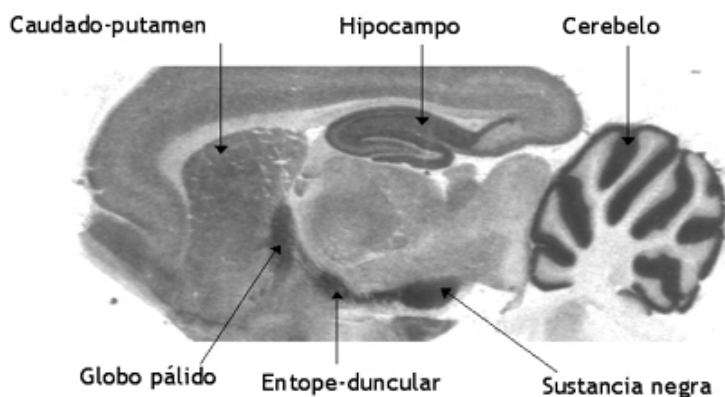


Figura 13. Expresión del receptor CB1 en un corte sagital de cerebro de rata (Herkenham y cols., 1990).

Mediante la aplicación de diferentes técnicas de autoradiografía y de estudios inmunohistoquímicos se ha descrito de forma detallada la distribución de este receptor en el cerebro de rata (Herkenham y cols., 1990; Mailleux y Vanderhaeghen, 1992) (Fig. 13). Así, los receptores CB1 se expresan en áreas del SNC que contribuyen al control del movimiento (caudado-putamen, globo pálido, núcleo entopeduncular, sustancia negra y cerebelo), cognición y memoria (formación hipocampal, corteza cingulada, PFC), procesamiento de emociones y respuestas motivacionales (complejo amigdalino, NAc, corteza olfatoria), percepción dolorosa (sustancia gris periacueductal, asta dorsal de la médula espinal), e integración neuroendocrina (núcleos del hipotálamo como el paraventricular, el arcuato, el supraóptico y el ventromedial), (Mailleux y Vanderhaeghen, 1992; Matsuda y cols., 1993) (Fig. 14). Además, el receptor CB1 se encuentra en órganos y tejidos periféricos como el bazo, pulmón, endotelio vascular,

músculo liso, adipocitos hígado y páncreas entre otros (Galiegue y cols., 1995; Pertwee, 2001). El receptor CB1 es responsable de los efectos psicotrópicos de los cannabinoides (Ledent y cols., 1999), y su distribución se encuentra estrechamente relacionada con sus efectos farmacológicos.

Resulta interesante comprobar que el receptor CB1 ha sido muy preservado a lo largo de la evolución, este hecho sumado a su alta y organizada distribución en las neuronas gabaérgicas y glutamatérgicas le confieren al receptor CB1 un papel muy importante como modulador en la sinapsis (Rodríguez de Fonseca y cols., 2005). El receptor CB2 se localiza fundamentalmente a nivel periférico, en células del sistema inmunitario (Galiegue y cols., 1995). Los receptores CB2 han sido relacionados con las propiedades inmunosupresoras de la marihuana (Klein y cols., 1998). Recientemente, se ha demostrado su presencia en el SNC y su participación en funciones clásicamente atribuidas al receptor CB1, como es el efecto antiemético (Van Sickle y cols., 2005).

Diversos estudios han sugerido la existencia de un tercer receptor cannabinoide que se podría expresar a nivel cerebral (Di Marzo y cols., 2000; Haller y cols., 2002). Así, en ratones deficientes en el receptor cannabinoide CB1, la anandamida es capaz de modificar la actividad espontánea y el umbral nociceptivo (Di Marzo y cols., 2000). Mediante estudios bioquímicos, se ha demostrado que la anandamida es capaz de estimular la unión de $^{35}\text{S-GTP}\gamma\text{S}$ en preparaciones de cerebro de ratones deficientes en los receptores CB1 sin que este efecto sea inhibido por antagonistas de los receptores CB1 o CB2 (Di Marzo y cols., 2000). Asimismo, se ha observado que el antagonista del receptor CB1 rimonabant es capaz de producir un efecto ansiolítico tanto en ratones normales como en ratones CB1 knockout (Haller y cols., 2002). Muy recientemente, se ha asociado el receptor CB3 con el receptor huérfano conocido como GPR55 (Baker y cols., 2006), recientemente clonado (Brown y cols., 2005). Si bien continúa siendo un punto controvertido y no totalmente aceptado en la actualidad.

Los cannabinoides endógenos poseen diferentes propiedades de unión y de actividad a los receptores CB1 y CB2. La anandamida es un agonista parcial y se une a ambos receptores aunque posee mayor afinidad por el receptor CB1. Del mismo modo, la actividad intrínseca de la anandamida al unirse al receptor CB1 es superior que cuando se une al receptor CB2. El ácido 2-araquidonil glicerol también se une a ambos receptores pero, a pesar de ser un agonista completo, se une al receptor CB1 con menos afinidad que la anandamida (Stella y cols., 1997; Howlett y cols., 2002).

5.2.1 Ligandos exógenos de los receptores cannabinoides

Entre los cannabinoides naturales destacamos el Δ^9 -tetrahidrocannabinol (THC), principal responsable de las propiedades psicoactivas de la planta *Cannabis sativa*. Además, otros cannabinoides como el Δ^8 -tetrahidrocannabinol (Δ^8 -THC), el cannabinalol y el cannabidiol también están presentes en esta planta. Los agonistas cannabinoides han sido clasificados en función de su estructura química en tres clases: (1) los “cannabinoides clásicos” son aquellos que presentan una estructura de dibenzopirano, entre ellos están los cannabinoides derivados de la cannabis sativa como el THC, el Δ^8 -THC, el cannabinalol o el cannabidiol, y los análogos sintéticos del Δ^9 -THC como el HU-210, el HU-243 y la babilona. (2) Los “cannabinoides no-clásicos” son compuestos análogos bicíclicos y tricíclicos del THC, pero con modificaciones sustanciales. A esta clase pertenece el CP-55,940 empleado para la caracterización del receptor CB1 (Devane y cols., 1988), y otros agonistas cannabinoides como el CP-55,244; CP-50,556 o levonantradol y el desacetilevonantradol. Finalmente (3), los aminoalquilindoles constituyen la tercera clase de agonistas de receptor cannabinoide, tienen una estructura que no está relacionada con la de los cannabinoides clásicos, y deriva de la pravadolina. Su principal representante es el WIN55,212-2.

También se han desarrollado antagonistas selectivos para los receptores cannabinoides. Así, el SR141716A (rimonabant) (Rinaldi-Carmona y cols., 1994) y el SR144528 (Rinaldi-Carmona y cols., 1998) son los primeros compuestos antagonistas selectivos para los receptores CB1 y CB2 respectivamente.

5.2.2 Mecanismo de transducción de señales del receptor cannabinoide CB1

Como se puede observar en la figura 14, la estimulación de los receptores CB1 y CB2 produce una inhibición de la vía de la adenilato ciclasa que como consecuencia, da lugar a un descenso de los niveles intracelulares de AMPc. De esta manera se ve afectada la capacidad de fosforilación de proteína quinasas dependientes de AMPc, involucradas en procesos metabólicos y de expresión génica (Howlett y cols., 1990; Felder y cols., 1995). Al mismo tiempo, se produce una activación de la vía de las MAP quinasas (Bouaboula y cols., 1995). Otra consecuencia de la activación de los receptores CB1 es la inhibición de los canales de Ca^{2+} voltaje dependientes y el aumento de la conductancia del K^+ . Este mecanismo combinado parece ser el responsable del efecto inhibitorio de los cannabinoides sobre la liberación de neurotransmisores (Howlett, 1998, Bouaboula y cols., 1995).

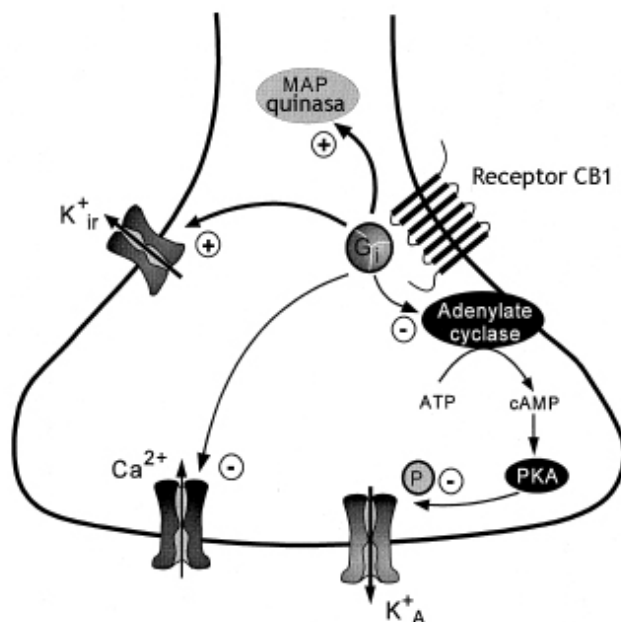


Figura 14. Mecanismo de transducción de señales de los receptores CB1 (Ameri, 1999).

5.3 Funciones fisiológicas del sistema endocannabinoide

La distribución de los receptores cannabinoides, sumada a los resultados de diversas investigaciones básicas sugieren que el sistema endocannabinoide participaría en la regulación de diversas funciones del SNC y periférico (Ameri, 1999, Porter y Felder, 2001), el equilibrio metabólico (Ducobu, 2005) el sistema inmunológico (Berdyshev, 2000; Klein, 1998) y el aparato cardiovascular (Kunos y cols., 2000), entre otros. En general, el sistema endocannabinoide actúa de forma silenciosa y se sobreactiva como sistema de recuperación en respuesta a situaciones de estrés.

Uno de los efectos mejor caracterizados de los cannabinoides es su efecto antinociceptivo. El mecanismo de acción de los endocannabinoides como inhibidores de la transmisión dolorosa incluye acciones a nivel central y periférico (Lichtman y Martin, 1991; Pertwee, 2001). De este modo, los agonistas cannabinoides modulan tanto las vías ascendentes y descendentes del dolor, así como la interpretación emocional del mismo por estructuras supraespinales. En el SNC, el sistema endocannabinoide también participa en la coordinación y el control del movimiento (Giuffrida y Piomelli, 2000) ya que la activación del sistema endocannabinoide induce una disminución de la actividad locomotora. Los efectos hipolocomotores inducidos por los cannabinoides parecen ser mediados por sus acciones inhibitorias a nivel del cerebelo, de la sustancia negra y de los ganglios basales, estructuras donde se encuentra una alta densidad de receptores CB1 (Herkenham y cols., 1990). El sistema endocannabinoide también participa en funciones cognitivas superiores, como por ejemplo las relacionadas con el aprendizaje y

la memoria (Lichtman, 2000). Los cannabinoides provocan una disminución importante en la retención de la memoria a corto plazo (Miller y Branconnier, 1983; Chait y Pierri, 1992). Asimismo, este sistema está involucrado en la respuesta al estrés (Pertwee, 1999). Ante una situación estresante y/o traumática, el sistema endocannabinoide favorece la extinción de la memoria aversiva (Marsicano y cols., 2002). Sobre la regulación del metabolismo, la activación del receptor CB1 presente en los hepatocitos estimula la síntesis de ácidos grasos y contribuye a la obesidad inducida por dieta en ratones (Osei-Hyiaman y cols., 2005). En ratas obesas (fa/fa), el rimonabant fue capaz de inducir un aumento de la síntesis de mRNA de adiponectina, una proteína sintetizada por los adipocitos y que, entre otros efectos, induce la eliminación de ácidos grasos, disminuye la resistencia periférica a insulina y protege el endotelio vascular (Bensaid y cols., 2003). Recientemente, también se ha demostrado la existencia de receptores cannabinoides CB1 y CB2 en el páncreas, donde parece ser que los endocannabinoides tienen un efecto orexigénico, regulando así el balance energético (Juan-Pico y cols., 2006). Igualmente, el sistema endocannabinoide participa en la regulación del sueño (Cravatt y cols., 1995; Mechoulam y cols., 1997) y los mecanismos de recompensa (Maldonado y Rodríguez de Fonseca, 2002; Valverde y cols., 2005; Arnold, 2005; Gardner, 2005), como veremos en los siguientes apartados. De manera similar, se ha demostrado un participación del sistema cannabinoide endógeno en la regulación de la temperatura corporal, de la ingesta de comida (Di Marzo y cols., 2001; Kirkham y Williams, 2001) y en los mecanismos que determinan el reflejo de succión, el crecimiento y el desarrollo de los recién nacidos (Fride y cols., 2001). Los efectos sobre el sistema inmunológico no están bien establecidos. Estudios experimentales muestran que la anandamida y el ácido 2-arquidonil glicerol tienen efectos inmunomoduladores, de manera que pueden incrementar ciertas respuestas humorales y celulares (proliferación de los linfocitos B, linfocitos T y liberación de citoquinas) según el modelo experimental y el tipo de células inmunitarias. El efecto inmunomodulador está mediado sobre todo por los receptores CB2. En el sistema cardiovascular, el sistema endocannabinoide participa en la regulación de la presión arterial, ya que los endocannabinoides se comportan como vasodilatadores sistémicos y vasoconstrictores pulmonares (Kunos y cols., 2000). En el sistema reproductor participaría en mecanismos de fertilidad durante el período de preimplantación embrionaria (Paria y Dey, 2000; Wang y cols., 2003).

Proceso cerebral	Función atribuida a los endocannabinoides
Control de la actividad motora	Los cannabinoides producen inhibición motora
Control del dolor	Los cannabinoides tienen efectos analgésicos
Memoria y aprendizaje	Los cannabinoides producen alteraciones de la memoria a corto plazo
Motivación y emocionalidad	Los cannabinoides producen efectos reforzantes
Regulación neuroendocrina	Los cannabinoides modifican la secreción de hormonas adenohipofisarias
Procesos neurovegetativos	Los cannabinoides actúan, entre otros, a nivel de los centros nerviosos reguladores de la émesis, de la temperatura y del apetito
Desarrollo cerebral	Los cannabinoides, actuando como factores epigenéticos, podrían tener efectos sobre la proliferación de neuronas y/o células gliales, sobre la migración y elongación axonal, sobre la sinaptogénesis y/o sobre la mielinogénesis
Metabolismo	Los cannabinoides inducen la acumulación de energía y disminuyen el consumo de glucosa

Tabla 2. Procesos cerebrales en los que se ha propuesto una función para los cannabinoides (endógenos y exógenos) a través de sus receptores de membrana.

5.3.1 Los endocannabinoides como mensajeros retrógrados

Una de las características más destacadas y más estudiadas de los endocannabinoides, en contraste con otros neurotransmisores, es que actúan como mensajeros retrógrados de muchas sinapsis centrales. Su liberación desde las neuronas postsinápticas estimula los receptores CB1 situados a nivel presináptico inhibiendo la liberación de diferentes neurotransmisores (Alger, 2002; Wilson y Nicoll, 2002). Mediante esta señalización retrógrada, los endocannabinoides son capaces de participar en la regulación a corto plazo de sinapsis inhibitorias (neuronas gabaérgicas) y excitatorias (neuronas glutamatérgicas). Como en la figura 15, la activación postsináptica del receptor metabotrópico de glutamato tipo 5 (mGlu5) induce un aumento del Ca^{2+} intracelular en la neurona postsináptica y activa la síntesis de endocannabinoides, que hiperpolarizan la neurona presináptica, disminuyendo así la liberación del neurotransmisor (Freund y cols., 2003; Howlett y cols., 2004). Este proceso se denomina supresión inducida por la despolarización (DS); si se desarrolla sobre neuronas que liberan neurotransmisores inhibidores, como el GABA, se considera una DS de la inhibición (DSI), proceso dependiente de receptores CB1; si el neurotransmisor es excitador, como el glutamato, será una DS de la excitación (DSE), proceso que también puede verificarse en ausencia de receptores CB1 (Wilson y Nicoll, 2002). El papel del endocannabinoide como inductor de DSE o DSI depende por tanto del tipo de neurona, pero también parece influido por ciertas condiciones basales, especialmente en relación con la concentración de Ca^{2+} . La

DSE y la DSI son de crucial importancia en procesos de plasticidad sináptica y de reafirmación de circuitos y redes neuronales determinados, ya que forman la base de los procesos de aprendizaje y memoria (Freund y cols., 2003).

Además, parece que los endocannabinoides son necesarios para el desarrollo de ciertas formas de plasticidad sináptica a largo plazo, como por ejemplo la depresión a largo plazo (LTD) de la liberación de glutamato que ocurre en áreas como el NAc y el estriado dorsal (Robbe y cols., 2002; Hoffman y cols., 2003; Lupica y cols., 2004). Dado el importante papel que juegan estas estructuras en la mediación de los efectos motivacionales y reforzantes de las drogas de abuso, se ha propuesto que la función de los endocannabinoides en los procesos de LTD existentes en el NAc puede representar un tipo de adaptación molecular que participa en el desarrollo del proceso adictivo (Gerdeman y cols., 2003; Hoffman y cols., 2003).

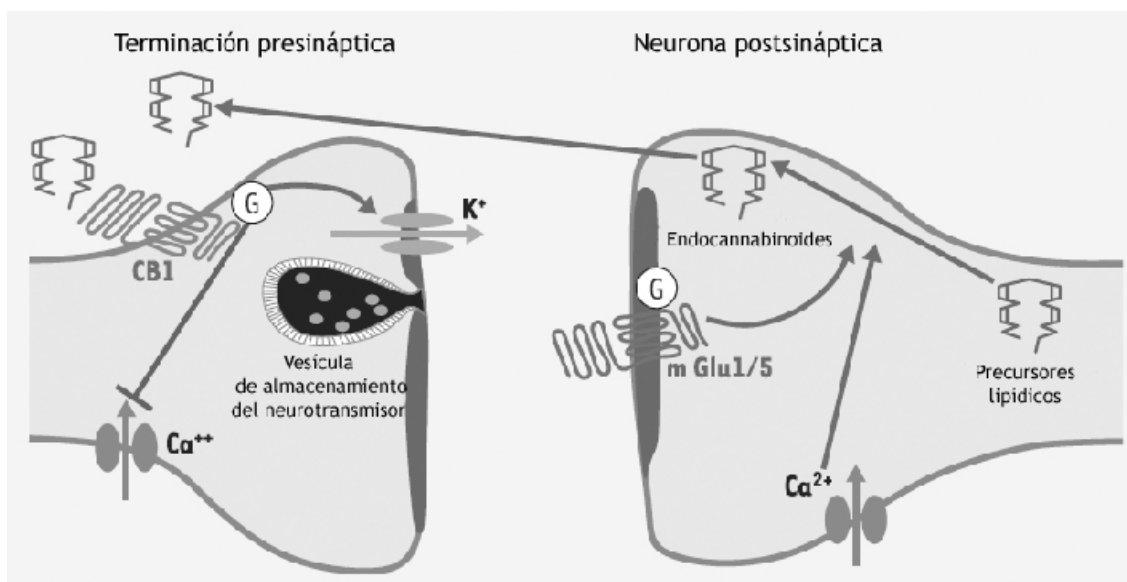


Figura 15. Representación esquemática de la vía retrógrada de señalización de los endocannabinoides. La activación postsináptica de los receptores mGlu1/5 y/o la elevación de Ca^{2+} intracelular inducen la producción de endocannabinoides y la activación presináptica de los receptores CB1 inhibiendo la liberación de neurotransmisores (Venance y cols., 2004).

5.4 Participación del sistema endocannabinoide en los circuitos de recompensa

En este capítulo se presentan diferentes evidencias que sugieren que el sistema endocannabinoide participa en los procesos de adicción de algunas drogas de abuso como un sistema modulador de los circuitos de recompensa.

5.4.1 Interacción entre los receptores cannabinoides y los receptores dopaminérgicos

Una de las evidencias que nos permiten postular un papel modulador del sistema endocannabinoide sobre la transmisión dopaminérgica es el hecho de que se haya demostrado una colocalización, en terminales gabaérgicos del estriado, de los receptores CB1 con los receptores de dopamina D1 y D2, y con los de serotonina 5-HT1B (Hermann y cols., 2002). Esta colocalización implica una interacción bilateral a nivel de transducción de señales entre los receptores cannabinoides y los receptores monoaminérgicos. Apoyando estos datos, Glass y Felder (1997) demostraron que la estimulación del receptor CB1 o D2 induce un descenso en la acumulación de AMPc intracelular. Sin embargo, al estimular ambos receptores a la vez se produce un aumento de los niveles de AMPc (Arnold, 2005). Además, estudios recientes han demostrado que el receptor de dopamina D2 modula de manera positiva la subunidad α de la proteína G acoplada al receptor CB1 (Jarrahian y cols., 2004), indicando que las interacciones entre los receptores D2 y CB1 juegan un papel crucial en la señalización del sistema dopaminérgico, y como consecuencia podrían participar en enfermedades del SNC como son la esquizofrenia o la adicción. La activación de los receptores D2 por la dopamina también juega un papel importante en las alteraciones de la memoria causadas por el THC (Nava y cols., 2000). Asimismo, el incremento de la expresión del gen Fos que ocurre tras el bloqueo del receptor CB1 con rimonabant está regulada por la función de los receptores D2 (Alonso y cols., 1999). En la misma línea, Valjent y cols., (2001) demostraron que los receptores D2 y D1 participan en la activación de la vía de las MAP/ERK quinasas inducida por THC.

También existen evidencias de una interacción funcional entre los sistemas cannabinoide y dopaminérgico. Así, experimentos de microdiálisis *in vivo* en ratas han demostrado que la estimulación de los receptores D2 induce un aumento de los niveles extracelulares de anandamida. Por el contrario, un tratamiento crónico de antagonistas D2 produce una regulación al alza de los receptores CB1 en el estriado (Giuffrida y cols., 1999). Estos datos sugieren que el sistema endocannabinoide podría actuar como mecanismo de retroinhibición, y modular los efectos inducidos por la dopamina sobre la actividad locomotora.

5.4.2 Modulación endocannabinoide de la transmisión dopaminérgica

La mayor parte de los efectos de los endocannabinoides ocurren a nivel presináptico sobre las neuronas intrínsecas y aferentes del NAc y el VTA. En efecto, el receptor CB1 modula la transmisión gabaérgica y glutamatérgica en el mismo NAc (Hoffman y Lupica, 2001; Manzoni y Bockaert, 2001; Robbe y cols., 2001; 2002). Se ha demostrado que los

receptores cannabinoides CB1 están presentes en las sinapsis glutamatérgicas en el NAc, las cuales contactan con el bucle inhibitor de las neuronas gabaérgicas espinosas de tamaño medio (Robbe y cols., 2001). Los terminales glutamatérgicos del NAc, procedentes de la PFC, controlan la activación de dichas neuronas gabaérgicas espinosas, que a su vez, inhiben las neuronas dopaminérgicas del VTA. Se ha demostrado que la activación de los receptores CB1 presentes en las aferencias glutamatérgicas de la corteza reduce fuertemente la transmisión glutamatérgica (Pistis y cols., 2002; Robbe y cols., 2001; 2002). Por otra parte, Hoffman y Lupica (2001) mostraron que también existe una reducción de la transmisión excitatoria tras la activación postsináptica del receptor CB1 en el NAc. La activación de los receptores CB1 desinhibe las neuronas dopaminérgicas, aumentando su activación y la liberación de dopamina mediante la reducción de la transmisión glutamatérgica en el NAc y la subsecuente inhibición de la señalización gabaérgica procedente de las neuronas gabaérgicas espinosas de tamaño medio (Van der Stelt y Di Marzo, 2003).

Los receptores cannabinoides CB1 también se encuentran expresados en otras áreas que proyectan al sistema límbico como la amígdala y el hipocampo. Estas estructuras han sido relacionadas con procesos de cognición y memoria muy relacionados con el desarrollo de la adicción. De este modo, el tono dopaminérgico de las neuronas cuyos cuerpos celulares se encuentran en el VTA está regulado por receptores cannabinoides CB1 que se encuentran en 3 localizaciones distintas: (1) en los terminales de las neuronas gabaérgicas intrínsecas del VTA, (2) en los terminales de las neuronas medianas espinosas gabaérgicas que proyectan desde el NAc y (3) en los terminales de las neuronas glutamatérgicas que proceden de fuera del VTA (PFC, hipocampo y amígdala) (Fig. 16) (Lupica y cols., 2004). Según este modelo, los endocannabinoides son liberados desde los cuerpos celulares de las neuronas dopaminérgicas en el VTA y viajan por transporte retrógrado a los terminales de las neuronas gabaérgicas y glutamatérgicas que forman sinapsis en dicha estructura (VTA). De este modo, esta acción retrógrada de los endocannabinoides regula las entradas excitatorias e inhibitorias que reciben las neuronas dopaminérgicas en el VTA, contribuyendo a la modulación de la transmisión dopaminérgica vía VTA-NAc que resulta tan importante en los fenómenos de recompensa.

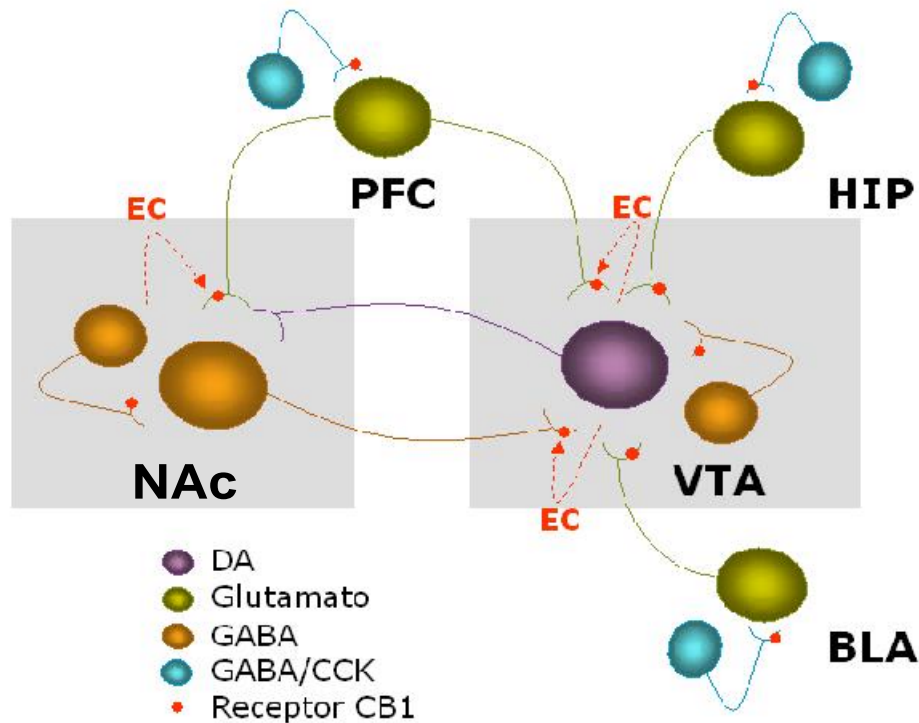


Figura 16. Esquema de los posibles interacciones sinápticas entre neuronas que expresan receptores CB1, en áreas límbicas implicadas en el refuerzo (Maldonado y cols., 2006).

5.5 Participación del sistema endocannabinoide en las propiedades adictivas de diferentes drogas de abuso

El desarrollo farmacológico de antagonistas CB1 como el rimonabant (SR141716A) (Rinaldi-Carmona y cols., 1994) o el AM121, y la existencia de ratones modificados genéticamente deficientes en el receptor CB1 (Ledent y cols., 1999, Zimmer y cols., 1999) y CB2 (Buckley y cols., 2000) nos permiten disponer de importantes herramientas para expandir el conocimiento sobre el sistema endocannabinoide, en especial acerca del papel de los receptores CB1 en los fenómenos de adicción. Como se describe en este capítulo, se ha demostrado claramente la participación del sistema endocannabinoide en las propiedades adictivas de los cannabinoides, el etanol, los opioides y la nicotina, mientras que en el caso de los psicoestimulantes, como la cocaína, los resultados no parecen concluyentes.

5.5.1 Cannabinoides

Gracias al gran avance de las técnicas genéticas, y al desarrollo de animales modificados genéticamente, los efectos comportamentales del THC han podido ser evaluados en animales deficientes en el receptor cannabinoide CB1 (Ledent y cols.,

1999, Zimmer y cols., 1999) y CB2 (Buckley y cols., 2000). Tras la inactivación del receptor CB1, los ratones knockout muestran una ausencia de efectos antinociceptivos, hipotérmicos e hipolocomotores inducidos por el THC. Además, los animales deficientes en el receptor CB1 no se autoadministran el agonista cannabinoide WIN55,212-2 en un paradigma de autoadministración intravenosa aguda (Ledent y cols., 1999). La dependencia inducida por una administración crónica de THC también fue explorada en este estudio. De este modo, el antagonista CB1 rimonabant precipitó un síndrome de abstinencia en los animales wild-type pero no en los animales mutantes, que habían recibido un tratamiento crónico con THC. Estos resultados demostraron de forma muy clara que tanto las principales respuestas farmacológicas inducidas por el THC como las propiedades adictivas de los cannabinoides están mediadas por el receptor CB1 (Ledent y cols., 1999).

Estudios farmacológicos también han demostrado que el THC, otros cannabinoides sintéticos y endocannabinoides actúan sobre los mecanismos de recompensa a través del receptor CB1. Así, diversos trabajos reflejan que monos saimiri ("squirrel monkeys") son capaces de aprender una conducta operante mantenida por infusiones de THC (Tanda y cols., 2000), anandamida y su análogo sintético, la R(+)-metanandamida (Justinova y cols., 2005). El antagonista CB1 rimonabant produce un bloqueo de la autoadministración de THC y anandamida en monos entrenados bajo un protocolo de razón fija 10 (Tanda y cols., 2000, Justinova y cols., 2005), lo cual demuestra el papel crucial del receptor CB1 en las propiedades reforzantes de los cannabinoides. Además, se ha podido demostrar que cannabinoides sintéticos como el WIN55-212,2 y el CP-55,940 originan una conducta de autoadministración en ratas (Fattore y cols., 2001; Braida y cols., 2001) y ratones (Martellotta y cols., 1998), que también se suprime tras el tratamiento con rimonabant.

5.5.2 Etanol

Estudios recientes muestran que algunos efectos comportamentales y farmacológicos del etanol podrían estar mediados por el sistema endocannabinoide (Hungund y cols., 2002). El bloqueo farmacológico del receptor CB1 reduce la preferencia de plaza (Houchi y cols., 2004) y el consumo voluntario de etanol (Arnone y cols., 1997; Colombo y cols., 1998; Rodríguez de Fonseca y cols., 1999; Freedland y cols., 2001; Rinaldi-Carmona y cols., 2004). La motivación por el consumo oral de cerveza, estudiado con un protocolo de razón progresiva, disminuye tras el bloqueo farmacológico con rimonabant (Gallate y McGregor, 1999; Gallate y cols., 2004). Al contrario, se observó un aumento en la motivación de las ratas por la cerveza al estimular dicho receptor con el agonista CB1 CP-55,940 (Gallate y cols., 1999). La supresión genética del receptor CB1 produce

un menor consumo de etanol en los animales CB1 knockout que en sus hermanos wild-type (Hungund y cols., 2003; Poncelet y cols., 2003, Naassila y cols., 2004, Thanos y cols., 2005). Recientemente se ha demostrado que estos ratones deficientes en el receptor CB1 son incapaces de mostrar una preferencia de plaza inducida por etanol (Thanos y cols., 2005). Asimismo, la exposición a un estrés de tipo choque eléctrico no modificó la preferencia producida por etanol en animales CB1 knockout mientras que en los animales wild-type el choque eléctrico aumentó dicha preferencia de plaza (Poncelet y cols., 2003)

En relación a la participación de los receptores CB1 en los efectos de dependencia física del etanol, Naassila y cols., (2004) han evaluado las manifestaciones somáticas del síndrome de abstinencia espontáneo en ratones dependientes a alcohol a los que se les interrumpió su consumo de forma abrupta. Mientras que los ratones wild-type mostraron signos físicos asociados al síndrome de abstinencia, los ratones deficientes en el receptor CB1 revelaron una total ausencia de las manifestaciones somáticas del síndrome de abstinencia de alcohol, indicando la implicación del receptor CB1 en dicha dependencia física.

5.5.3 Opioides

Los sistemas cannabinoide y opioide interactúan en diferentes funciones. La primera interacción descrita entre estos dos sistemas fue demostrada sobre las respuestas antinociceptivas inducidas por los cannabinoides y los opioides (revisión en Maldonado y Valverde, 2003). También se han demostrado interacciones de tipo funcional entre los sistemas cannabinoide y opioide a nivel de la regulación de la temperatura corporal, la respuesta al estrés (revisión en Viveros y cols., 2005) y de los procesos adictivos (Ghozland y cols., 2002; Valverde y cols., 2000; 2005).

En este apartado tan sólo se detallarán las interacciones de tipo funcional entre los sistemas cannabinoide y opioide en respuestas relacionadas con los procesos adictivos (Manzanares y cols., 1999; Navarro y cols., 2001; De Vries y cols., 2003; Solinas y cols., 2003). Los efectos discriminatorios, placenteros y reforzantes del THC pueden ser revertidos con antagonistas de los receptores opioides como la naloxona y la naltrexona (Chen y cols., 1990, Solinas y Goldberg, 2005; Justinova y cols., 2004). La invalidación selectiva del receptor opioide en ratones redujo las propiedades placenteras del THC en el paradigma de preferencia de plaza condicionada (Ghozland y cols., 2002). De acuerdo con estos resultados, Justinova y cols., (2004) mostraron que la autoadministración intravenosa de THC disminuye tras el tratamiento con el antagonista opioide naloxona. Por otro lado, los efectos disfóricos producidos por el THC se

encuentran anulados en animales deficientes en el receptor opioide kappa (Ghozland y cols., 2002). Existen numerosas evidencias demostrando que la interacción funcional entre los dos sistemas es recíproca. De este modo, diferentes estudios han evaluado el papel del sistema cannabinoide en la modulación de las propiedades adictivas de los opioides. El bloqueo farmacológico de los receptores CB1 con rimonabant bloquea el desarrollo de la preferencia de plaza inducida por morfina (Chaperon y cols., 1998) y revierte parcialmente la autoadministración intracerebroventricular de heroína (Brida y cols., 2001). De acuerdo con estos resultados, el tratamiento con rimonabant produce una reducción significativa en el número de respuestas tanto en animales que se autoadministran morfina en un protocolo de razón fija 5, como en animales que están bajo un protocolo de razón progresiva (De Vries y cols., 2003; Solinas y cols., 2003). Además, el rimonabant atenúa de forma dosis-dependiente el efecto de recaída provocado por la presentación de un estímulo lumínico-sonoro asociado a la infusión de heroína (De Vries y cols., 2003). Del mismo modo, los ratones knockout deficientes en el receptor CB1 no se autoadministran morfina (Cossu y cols., 2001), ni muestran la preferencia de plaza inducida por dicha droga (Martín y cols., 2000). Sin embargo, la administración aguda de rimonabant no modifica el aumento de los niveles extracelulares de dopamina en el NAc tras una inyección de heroína (Tanda y cols., 1997; Caillé y Parsons, 2003).

Por otro lado, se ha demostrado la existencia de una interacción bidireccional entre el sistema opioide y cannabinoide en relación a los fenómenos de tolerancia y dependencia física. Así, numerosos estudios farmacológicos muestran un fenómeno de tolerancia cruzada entre compuestos cannabinoides y opioides a nivel de la respuesta antinociceptiva en el animal de experimentación (Bloom y Dewey, 1978; Smith y cols., 1994; Thorat y Bhargava, 1994). Además, el bloqueo del receptor CB1 con rimonabant es capaz de precipitar manifestaciones físicas y bioquímicas características del síndrome de abstinencia en animales dependientes de morfina (Navarro y cols., 1998). De forma recíproca, el antagonista opioide naloxona precipita el síndrome de abstinencia de cannabinoides en ratas tratadas de forma crónica con cannabinoides (Kaymakcalan y cols., 1977; Navarro y cols., 1998). Sin embargo, este efecto no se ha podido demostrar en el caso de los ratones (Lichtman y cols., 2001). Al mismo tiempo, la administración aguda o crónica de THC o anandamida atenúa la severidad del síndrome de abstinencia de morfina (Hine y cols., 1975; Lichtman y cols., 2001; Valverde y cols., 2001).

Estudios realizados en ratones knockout han permitido esclarecer el papel del sistema opioide en los diferentes componentes de la abstinencia de cannabinoides (Maldonado y Rodríguez de Fonseca, 2002). Así, la severidad del síndrome de abstinencia cannabinoide está disminuida de forma significativa en animales deficientes en el gen de pre-proencefalina (Valverde y cols., 2000), prodinorfina (Zimmer y cols., 2001) y en

ratones dobles mutantes deficientes en los receptores opioides μ y δ (Castañé y cols., 2003). De nuevo, esta interacción resultó ser bidireccional ya que se observó una disminución en la severidad del síndrome de abstinencia de morfina en animales deficientes en el receptor cannabinoide CB1 (Ledent y cols., 1999).

5.5.4 Nicotina

En humanos, el consumo de nicotina y THC se asocia con frecuencia (Schorling y cols., 1994; Degenhardt y cols., 2001). En este sentido, resulta interesante estudiar las posibles interacciones que pueden desarrollarse entre ambas drogas de abuso. Así, la coadministración de dosis subefectivas de THC y nicotina produce una facilitación de los efectos placenteros de estas dos drogas, evaluados en el paradigma de condicionamiento espacial (Valjent y cols., 2002). Además, el antagonista del receptor CB1 rimonabant disminuye la autoadministración de nicotina en ratas (Cohen y cols., 2002). De acuerdo con estos resultados, la administración de nicotina no induce efectos gratificantes en animales deficientes en el receptor CB1 en un paradigma de condicionamiento espacial (Castañé y cols., 2002; Le Foll y Goldberg, 2004). Sin embargo, otro estudio ha mostrado que los ratones CB1 knockout aprenden a autoadministrarse nicotina (Cossu y cols., 2001). Hay que señalar que en este último trabajo se utilizó un paradigma de autoadministración aguda con movilidad restringida. Este procedimiento no permite evaluar el mantenimiento de una conducta operante mantenida por infusiones de nicotina y además, los efectos ansiolíticos de la nicotina pueden interferir en los resultados ya que los animales están bajo una situación de estrés causado por la inmovilización. Aunque el bloqueo farmacológico del receptor CB1 con rimonabant no altera los efectos discriminatorios de la nicotina sí que disminuye la autoadministración de nicotina en ratas (Cohen y cols., 2002; Le Foll y Goldberg, 2004). Además, el aumento de los niveles extracelulares de dopamina en el NAc tras una inyección de nicotina es bloqueado por el rimonabant de una manera dosis-dependiente (Cohen y cols., 2002). Asimismo, el rimonabant atenúa el efecto de recaída provocado por la presentación de un estímulo lumínico-sonoro asociado a la infusión de nicotina en ratas (Cohen y cols., 2005; De Vries y cols., 2005). En conjunto, estos datos sugieren un papel importante del receptor CB1 en las propiedades placenteras y reforzantes de la nicotina (Le Foll y Goldberg, 2005). El papel importante que desempeñan los receptores CB1 en los efectos reforzantes y las propiedades adictivas de la nicotina se ha confirmando también en el humano. Así, datos procedentes del estudio clínico en fase III STRATUS-US (“Smoking cessation in smokers motivated to quit”) han demostrado que el tratamiento crónico con el antagonista rimonabant aumenta de una manera

significativa la probabilidad de abandono de la adicción del tabaco (Anthenelli y Despres, 2004).

Del mismo modo que en el caso de los opioides y el etanol, la interacción cannabinoide-nicotina también se observa a nivel de la dependencia física. Así, ratones cotratados de forma crónica con nicotina y THC muestran un incremento en las manifestaciones somáticas asociadas al síndrome de abstinencia de THC precipitado por rimonabant (Valjent y cols., 2002). Además, el pretratamiento con THC es capaz de atenuar la intensidad de las manifestaciones somáticas del síndrome de abstinencia de nicotina (Balerio y cols., 2004). Por otro lado, existen estudios realizados en animales knockout deficientes en el receptor CB1 que muestran la misma severidad del síndrome de abstinencia de nicotina tanto en animales knockout como en los wild-type (Castañé y cols., 2002).

5.5.5 Psicoestimulantes

Hasta hace pocos años, diversos estudios habían propuesto que el sistema endocannabinoide no participa, o tiene un papel muy limitado, en las propiedades adictivas de los psicoestimulantes. Así, la preferencia de plaza inducida por cocaína resultó ser igual en ratones wild-type y en ratones deficientes en el receptor CB1 (Martín y cols., 2000). Del mismo modo, la autoadministración de cocaína y anfetamina en un paradigma de autoadministración aguda con movilidad restringida es similar en ambos genotipos (Cossu y cols., 2001). Por otro lado, estudios farmacológicos muestran que la administración de rimonabant no interfiere en la conducta de autoadministración de cocaína en ratas (De Vries y cols., 2001), ni en monos (Tanda y cols., 2000), entrenados con un protocolo de razón fija. Sin embargo, estos últimos autores han podido demostrar que el rimonabant es capaz de atenuar la conducta de recaída provocada por una inyección de cocaína o por los estímulos asociados a esta (De Vries y cols., 2001). Además, la estimulación del receptor CB1 con el agonista WIN55,212-2 disminuye los efectos placenteros de la cocaína evaluados en un paradigma de autoestimulación intracraneal (Vlachou y cols., 2003). Otros estudios de tipo neuroquímico y neurofisiológico muestran liberación de anandamida en el estriado tras una administración de cocaína (Centonze y cols., 2004), apoyando la posible implicación del sistema endocannabinoide en los efectos de la cocaína. Con esta controversia en relación a los psicoestimulantes, el papel del sistema endocannabinoide como sustrato común en la neurobiología de la adicción de diferentes drogas de abuso queda aún por ser esclarecido, y ha constituido uno de los objetivos del presente estudio.

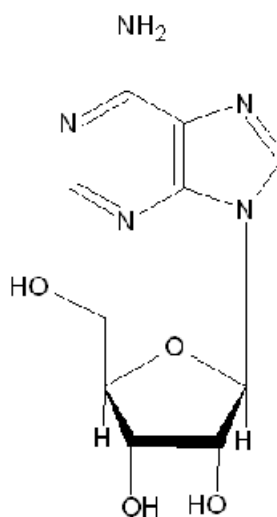
6 Sistema purinérgico

En 1963, Berne, incluye la idea de modulación de la transmisión purinérgica, cuando sugiere que la adenosina puede actuar como regulador fisiológico del flujo sanguíneo. Más tarde, el concepto de neurotransmisión purinérgica fue propuesto por Burnstock en 1972. Esta hipótesis generó una fuerte resistencia debido a que el ATP es un constituyente esencial de todas las células vivas y está muy relacionado con el metabolismo energético, de modo que resultaba extraño pensar que una molécula tan ubicua pudiera actuar como un neurotransmisor. Más tarde se desarrolla otro concepto de influencia significativa en el desarrollo de la comunicación purinérgica, la idea de contranmisión (Burnstock, 1976). Dos años más tarde, el mismo autor provee las bases farmacológicas para distinguir entre dos tipos principales de receptores purinérgicos: los llamados receptores P1 selectivos para adenosina, que actúan a través de la adenilato ciclasa y son antagonizados por bajas concentraciones de metilxantinas, y los receptores P2 selectivos para nucleótidos que muestran poca inhibición con metilxantinas (Burnstock, 1978).

Así, el sistema purinérgico es un sistema endógeno del cual forman parte, las purinas y los nucleótidos purinérgicos, ambos como ligandos endógenos de los receptores purinérgicos. Las purinas, especialmente la adenosina, y los nucleótidos purinérgicos, el ATP y el ADP, son constituyentes esenciales de todas las células vivas. Dada su naturaleza tan general, las purinas han resultado ser importantes moléculas para la señalización intra y extracelular, además de su actividad relacionada con el metabolismo energético y la transmisión genética de información (Dunwiddie y Masino, 2001). Este capítulo se centra en la adenosina como neurotransmisor y en el papel del receptor A2A en los procesos de recompensa involucrados en la adicción de drogas de abuso.

6.1 Adenosina

La adenosina es un nucleósido formado de la unión de la adenina con un anillo de ribosa. La adenosina constituye un elemento estructural de los ácidos nucleicos y participa en el metabolismo energético de todos los seres vivos. Además, constituye el ligando endógeno de los receptores purinérgicos P1. Los efectos fisiológicos de la adenosina fueron descritos inicialmente en el sistema cardiovascular y en el tracto gastrointestinal (Drury y Sent.-Gyorgy, 1929), pero existe un extenso espectro de funciones neuromoduladoras de la adenosina descritas hasta ahora.



Dada su ubicuidad la adenosina participa en un gran número de funciones fisiológicas y por eso Engler en 1991 la llamó “la señal de la vida”. La adenosina se ha relacionado con la modulación de sistemas de señalización de segundos mensajeros, de neurotransmisores, del metabolismo energético y del sistema inmunitario. Asimismo, participa en la maduración neuronal, en procesos de apoptosis y neuroprotección (Abbracchio y Cattabeni, 1999; Stone, 2002). La adenosina regula diferentes conductas como la actividad locomotora, el comportamiento agresivo, la interacción social y tiene un papel muy importante en la inducción del sueño (Machado-Vieira y cols., 2002). Además, la adenosina está involucrada de una manera importante en los procesos de memoria y aprendizaje (Zarrindast y Shafaghi, 1994; Ohno y Watanabe, 1996) regulando la transmisión sináptica, la excitabilidad neuronal y los fenómenos de neuroplasticidad incluyendo procesos de LTP y LTD en el hipocampo (de Mendonca y Ribeiro, 1994; Sebastiao y Ribeiro, 2000; Kaplan y Abel, 2003). A su vez, las alteraciones de la neurotransmisión purinérgica han sido implicadas en diferentes procesos fisiopatológicos como el dolor, el asma y neuropatologías de tipo epiléptico, enfermedad de Huntington, Parkinson, Alzheimer y fenómenos de adicción (Ribeiro y cols., 2003).

Como en el caso de los endocannabinoides, la adenosina no se comporta como un neurotransmisor clásico ya que no se libera vía exocitosis vesicular, al no acumularse en vesículas sinápticas aunque se libera desde el citoplasma al espacio extracelular a través de transportadores de nucleósidos (Hack y Christie, 2003). La adenosina cumple una doble función actuando a la vez como un mensajero transcelular de tipo homeostático y como neuromodulador, controlando la liberación de otros neurotransmisores y la excitabilidad neuronal (Fredholm y cols., 2005). Igualmente, se

ha postulado un papel de la adenosina como mensajero sináptico de tipo retrógrado (Brundege y Dunwiddie, 1996).

6.1.1 Biosíntesis y metabolismo de la adenosina

Dada la alta concentración de adenosina en el SNC y la alta afinidad que presenta por los receptores tipo P1 (A1, A2A, A2B, A3), se ha sugerido la existencia de un tono basal de adenosina en algunas sinapsis centrales (Brundege y Williams, 2002). La disponibilidad de adenosina extracelular se ve aumentada tras (1) la excitación neuronal como la estimulación sináptica; (2) situaciones de hipoxia; (3) la inhibición del metabolismo por la adenosina quinasa o adenosina desaminasa; y (4) alteraciones de los mecanismos mediados por otros receptores (Latini y Pedata, 2001; Dunwiddie y Masino, 2001). La formación de adenosina puede tener origen intra y/o extracelular. Cuando la procedencia es intracelular, la adenosina se puede formar a partir del AMPc o de la S-adenosil homocisteína. En el exterior de la célula, la adenosina puede proceder de los mismos transportadores de nucleósidos como del metabolismo del AMPc extracelular (Fig. 17).

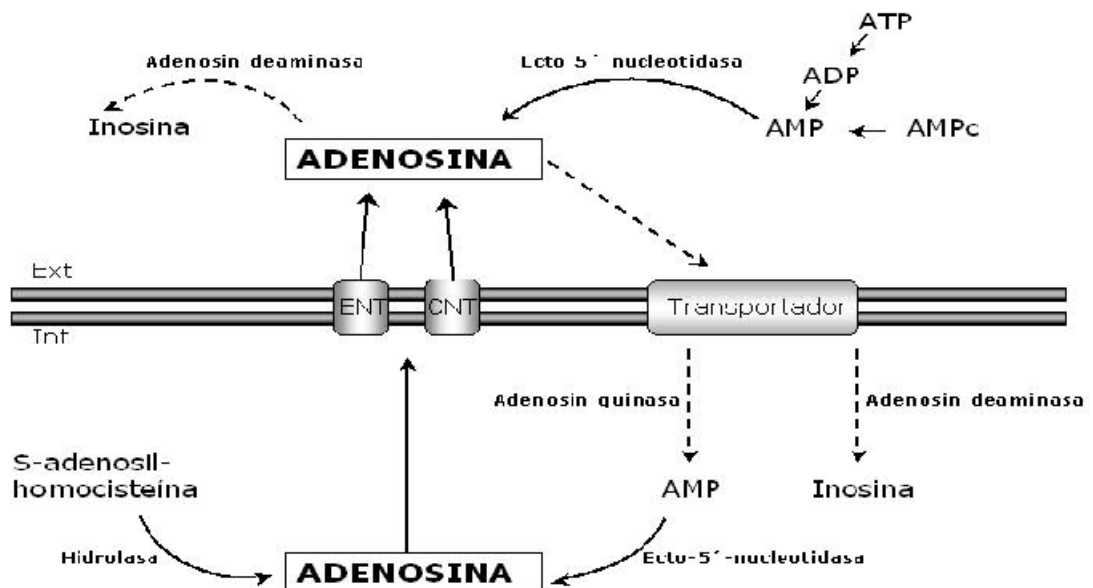


Figura 17. Biosíntesis (línea continua) e inactivación (línea discontinua) de la adenosina
 Abreviaciones: ENT (transportador de nucleósidos equilibrativo), CNT (transportador de nucleósidos concentrativo).

La inactivación de adenosina extracelular ocurre principalmente mediante la acción de los transportadores de nucleósidos, cuya actividad puede estar regulada por la

activación de receptores de adenosina (Delicado y cols., 1994). La efectividad del sistema de recaptación de la adenosina está garantizada por el posterior metabolismo intracelular de la adenosina. Así, la adenosina se puede reconvertir en inosina mediante la adenosina desaminasa o fosforilarse y convertirse en AMP mediante la adenosina quinasa (Fredholm y cols., 2005).

6.2 Receptores de adenosina

La adenosina efectúa su papel neuromodulador a través de la unión a 4 tipos de receptores distintos, que fueron clonados a principio de los años 90: A1, A2A, A2B, A3 (Libert y cols., 1991; Maenhaut y cols., 1990; Stehle y cols., 1992; Zhou y cols., 1992). Estos 4 receptores forman el subtipo P1 de receptores purinérgicos, están codificados por genes independientes y poseen diferente afinidad por el nucleósido purinérgico adenosina. Los receptores A1, A2A y A3 se consideran de alta afinidad, mientras que los receptores A2B presentan baja afinidad por la adenosina (Klinger y cols., 2002). Los receptores purinérgicos pertenecen a la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G, con siete dominios transmembranarios. En su origen, se clasificaron según la afinidad que muestran por ellos los análogos de la adenosina y los antagonistas de las metilxantinas (Fredholm y cols., 1994). Posteriormente se estableció una clasificación en base a su mecanismo de transducción de señales: los receptores A1 y A3 son inhibidores de la adenilato ciclasa, mientras que los receptores A2A y A2B la estimulan. De este modo los receptores A1 y A3 disminuyen los niveles intracelulares de AMPc y los receptores A2 los aumentan.

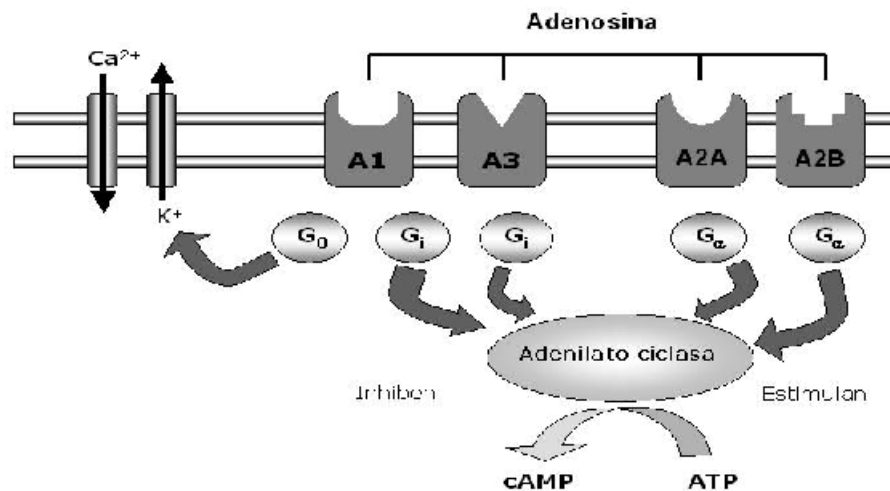


Figura 18. Receptores de adenosina. Los receptores A1 y A3, acoplados a proteínas G_i inhiben la adenilato ciclasa. Los receptores A2A y A2B, acoplados a proteínas G_α , estimulan la adenilato ciclasa.

Diferentes canales iónicos de tipo K^+ y de Ca^{2+} se encuentran bajo el control directo o indirecto (vía mensajeros secundarios) de los receptores de adenosina. Por ejemplo, los receptores A1 inhiben los canales de Ca^{2+} mientras que los receptores A2 aumentan los niveles de Ca^{2+} intracelular (Park y cols., 2001; Gubitza y cols., 1996; Gonçalves y cols., 1997). Además, los receptores A2A pueden actuar también estimulando la vía de las MAP quinasas y en el caso de los receptores A1, A2B y A3 activando la fosfolipasa C (Hack y Christie, 2003).

6.2.1 Localización de los receptores de adenosina

Dada la cantidad de procesos que están modulados por la adenosina, la expresión de sus receptores es muy general a nivel del SNC (Fredholm y cols., 1994; Klinger y cols., 2002). En el cerebro de roedor, existe una alta densidad de receptores A1 en el SNC, en áreas como la corteza, el cerebelo, el hipocampo y en el asta dorsal de la médula espinal (Fig. 19). El receptor A2A se encuentra expresado en altas concentraciones en el estriado, el NAc y el tubérculo olfatorio. También se encuentra en otras estructuras cerebrales pero con menor densidad, como el tálamo o el hipocampo (Sebastiao y Ribeiro, 1996). El receptor A2B posee un nivel de expresión bajo en el cerebro (Dixon y cols., 1996), mientras que el receptor A3 tiene niveles de expresión intermedios en el cerebelo e hipocampo, y niveles muy bajos en el resto de cerebro (Fredholm y cols., 2001) (Tabla 3).

Receptor A1	Receptor A2A	Receptor A2B	Receptor A3
Alta expresión Cerebro (córtex, cerebelo e hipocampo), asta dorsal de la médula espinal, ojo, glándula adrenal, atrio	Alta expresión bazo, leucocitos, plaquetas. Neuronas gabaérgicas (en caudado-putámen, NAc, tubérculo olfatorio), bulbo olfatorio	Alta expresión Ciego, colon, bufeta	Alta expresión Testículo, mastocitos (en ratas)
Niveles intermedios Otras estructuras cerebrales, músculo, hígado, riñón, tejido adiposo, glándulas salivarias, esófago, colon, antrum, testículo	Niveles intermedios Tálamo, hipocampo, corazón, pulmón, vasos sanguíneos	Niveles intermedios Pulmón, vasos sanguíneos, ojo, median eminente, mastocitos	Niveles intermedios Cerebelo, hipocampo, pulmón, bazo, glándula pineal (en ovejas)
Niveles bajos Pulmón, páncreas	Niveles bajos Otras estructuras cerebrales	Niveles bajos Tejido adiposo, glándula adrenal, riñón, hígado, ovarios, glándula pituitaria	Niveles bajos Tiroides, glándula adrenal, bazo, hígado, riñón, intestino, testículos (en humanos)

Tabla 3. Resumen de la distribución de los receptores de adenosina (Modificado de Fredholm y cols., 2001).

También se encuentran altas densidades de receptores purinérgicos en la periferia (p.e.: corazón, pulmón, hígado, riñón) y tienen un papel importante en el control de las funciones cardiovascular, gastrointestinal y respiratoria. En la tabla 3 se resume su distribución central y periférica según sus niveles de expresión.

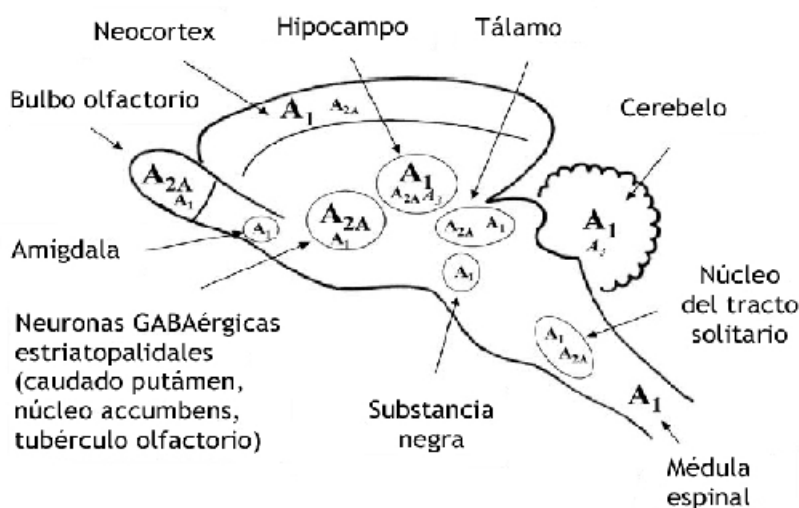


Figura 19. Distribución de los receptores de adenosina en un corte sagital de cerebro de ratona (Ribeiro y cols., 2002)

6.3 Relevancia del receptor A2A en procesos de adicción

La elevada densidad de los receptores A2A en estructuras relacionadas con el sustrato neuroanatómico de la adicción nos hace pensar que el sistema purinérgico podría modular también los procesos adictivos. En este capítulo se presentan diferentes evidencias que sugieren que el sistema purinérgico, concretamente el receptor A2A, participa en el fenómeno de la adicción.

6.3.1 Interacción entre los receptores adenosina A2A y los receptores dopaminérgicos D2

El estriado ventral, en el que se integra el NAc, representa el punto de contacto entre el sistema límbico y el sistema motor y está involucrado en el control del movimiento espontáneo y la actividad dirigida hacia la búsqueda de la droga (Pennartz y cols., 1994). Desde un punto de vista neuroquímico, el estriado (caudado-putamen, NAc y tubérculo olfatorio) recibe sinapsis glutamatérgicas de zonas corticales y talámicas (Ferré y cols., 1992). Más del 90% de neuronas estriatales son de tipo gabaérgico espinosas de tamaño medio. Así, encontramos dos tipos de neuronas eferentes gabaérgicas en el estriado: las neuronas estriatopalidales, que expresan encefalinas y constituyen la vía directa de conexión con la sustancia negra, y las neuronas estriatonigrales y estriato-entopedunculares, que contienen dinorfina y sustancia P y que también conectan con la sustancia negra, constituyendo la vía indirecta. Como hemos visto en el apartado anterior, los receptores A2A se encuentran altamente expresados en el estriado (Fredholm y cols., 2001), en concreto en las neuronas gabaérgicas estriatopalidales donde se colocan con los receptores de dopamina D2 (Fink y cols., 1992). Fuxe y Ungerstedt (1974), en un estudio farmacológico sobre la activación motora, proporcionaron evidencias de las interacciones antagonísticas entre la adenosina y la dopamina. Los primeros estudios realizados en preparaciones de membranas estriatales indicaban que el mecanismo de esta interacción podía implicar interacciones antagonísticas de tipo intermembrana entre los receptores A2A y D2. En estos trabajos se mostraba que el antagonista A2A CGS21680 puede reducir de manera sustancial la afinidad de la dopamina por el receptor D2 (Ferré y cols., 1991). Al mismo tiempo, mediante técnicas de hibridación "in situ", se pudo demostrar que los receptores A2A están coexpresados con los receptores D2 en las neuronas gabaérgicas estriatopalidales (Schiffmann y cols., 1991; Fink y cols., 1992). Con posterioridad, se sugirió que la base molecular de esta interacción receptor-receptor es la formación de heterodímeros tipo A2A-D2 (Zoli y cols., 1993). Utilizando técnicas de análisis estructural, se observó que los receptores A2A y D2 se colocaban en zonas perisinápticas que rodean botones dopaminérgicos y glutamatérgicos localizados en las

mismas espinas dendríticas de las neuronas estriatales eferentes de tamaño mediano (Hettinger y cols., 2001; Agnati y cols., 2003). Sin embargo, no todos los receptores A2A tienen una interacción física con los receptores D2, sino que existe una proporción de receptores A2A que interactúan con receptores de glutamato mGlu5 (Ferré y cols., 2002; Fuxe y cols., 2003).

Los receptores de adenosina A2A y los receptores dopaminérgicos D2 también interactúan de manera indirecta a nivel de los sistemas de señalización intracelular. La fosfoproteína reguladora de la dopamina de peso molecular 32 KDa (DARPP-32) es una molécula efectora de la dopamina que actúa tras la activación de los receptores D2 y se ha demostrado que tiene un papel fundamental en los efectos farmacológicos de diferentes drogas de abuso (Nairn y cols., 2004). La activación de DARPP-32 también está regulada directamente por los receptores de adenosina A2A (Svenningsson y cols., 2004). En este sentido, estudios recientes han revelado la existencia de un mecanismo sinérgico entre los receptores D2 y A2A sobre la señalización de la PKA, mediada por dímeros $\beta\gamma$ de las proteínas G acopladas los receptores A2A (Yao y cols., 2002; 2003).

6.4 Interacción de los receptores A2A y las propiedades adictivas de las drogas de abuso

Los estudios farmacológicos con agonistas y antagonistas de los receptores purinérgicos tienen una importante limitación relacionada con la inespecificidad de la mayoría de estos ligandos. Por este motivo, el desarrollo de ratones knockout deficientes en el receptor A2A (Ledent y cols., 1997; Chen y cols., 1999) ha permitido progresar en el conocimiento sobre el sistema purinérgico y su función moduladora del SNC. Sin embargo, la implicación de los receptores de adenosina A2A en la neurotransmisión implicada en el control de los procesos de placer y refuerzo no ha sido investigada en profundidad. Así, el agonista inespecífico de los receptores de adenosina NECA induce una preferencia de plaza condicionada en ratones, que se puede bloquear con teofilina, antagonista inespecífico de dichos mismos receptores (Zarrindast y Moghadamnia, 1997). Sin embargo, el agonista A2A CGS21680 no produce preferencia de plaza, mientras que el antagonista CGS15943A sí que induce condicionamiento espacial en ratas (Brockwell y Beninger, 1986). Por otro lado, la cafeína posee unas propiedades reforzantes bastante débiles, que parecen ser debidas al bloqueo de los receptores A2A que estimulan las neuronas gabaérgicas de las vías inhibitorias del sistema dopaminérgico, en el estriado (Daly y Fredholm, 1998). Se ha demostrado que dosis moderadas de cafeína y de aminofilina son capaces de producir de manera dosis-dependiente comportamientos reforzados positivamente en dos modelos diferentes, la estimulación intracraneal y el condicionamiento operante (Valdes y cols., 1982). Por

otra parte, el agonista A2A CGS21680 elevó el umbral de placer en la ICSS, mientras que antagonistas selectivos como el DMPX no alteraron dicho umbral (Baldo y cols., 1999). Estos resultados sugieren una implicación de los receptores A2A en la modulación de los procesos de recompensa y confirman, a su vez, la ausencia de potencial de abuso de los ligandos del receptor A2A (Moreau y Huber, 1999).

6.4.1 Etanol

El etanol interacciona de forma directa con el sistema de la adenosina, además de sus acciones a nivel de otros sistemas de neurotransmisión. Así, el etanol bloquea uno de los transportadores de nucleósidos, provocando un aumento de los niveles de adenosina endógena (Hack y Christie, 2003). Existen evidencias de que la adenosina modula los efectos sobre el consumo de etanol. En concreto, la adenosina tiene un papel importante en el desarrollo de la tolerancia a los efectos del etanol (Nagy y cols., 1991; Sapru y cols., 1994; Coe y cols., 1996). En 1994, Daly y cols., observaron que los efectos estimulantes del etanol sobre la locomoción están reducidos de manera importante en animales tratados crónicamente con cafeína. También se ha observado un aumento en el consumo de alcohol en ratas tras un tratamiento con teofilina, antagonista A2A (Gatch y Selvig, 2002). Este mismo tratamiento (teofilina) reduce la hiperalgesia inducida por el síndrome de abstinencia en ratas dependientes de etanol (Gatch y Selvig, 2002). Además, los ratones deficientes en el receptor A2A son menos sensibles a los efectos agudos del etanol y consumen más etanol que sus hermanos wild-type (Naassila y cols., 2002). Para la correcta interpretación de estos resultados hay que destacar que los ratones A2A knockout demostraron una reducción del 50% de la expresión de sustancia P, la cual contribuye de manera importante en el consumo de alcohol (Slawecki y cols., 2001; Nicolaev y cols., 2002). Dicho resultado sugiere que esta adaptación pueden influir sobre la actividad de otros mecanismos de neurotransmisión que participan en los efectos inducidos por el etanol.

6.4.2 Opioides

Se ha sugerido que la adenosina regula diferentes respuestas inducidas por los opioides. En la médula espinal, los efectos antinociceptivos de la morfina están en parte mediados por la liberación de adenosina y la posterior activación de receptores A1 y A2 (Sweeney y cols., 1987, 1991). Estos resultados sugieren que la adenosina extracelular contribuye de manera significativa en la antinocicepción inducida por morfina. En la misma línea, ratones deficientes en el receptor A2A muestran una reducción de la unión de la [³H]deltorfina-I a los receptores opioides delta y un aumento en la unión de [³H]Cl-

977 a los receptores opioides kappa, ambos en el estriado (Bailey y cols., 2002), lo cual sugiere un cambio compensatorio en los receptores opioides debido a la ausencia del receptor A2A. Además, los receptores de adenosina A2A presentes en el estriado regulan la expresión del gen de la proencefalina (Fink y cols., 1992; Schiffmann y Vanderhaeghen, 1993). De este modo no resulta extraño que la adenosina module algunos aspectos de la dependencia de opioides. En este sentido, el bloqueo del metabolismo de la adenosina mediante inhibidores de la adenosina quinasa disminuye la severidad del síndrome de abstinencia de morfina (Kaplan y Coyle, 1998). También se ha demostrado que la cafeína aumenta la sintomatología del síndrome de abstinencia de morfina (Capasso, 2000; Khalili y cols., 2001). De acuerdo con estos resultados, el agonista del receptor de adenosina CGS21680 inhibe la expresión del síndrome de abstinencia de morfina, mientras que antagonistas como el DMPX aumentan la incidencia de los signos somáticos expresados durante la abstinencia (Kaplan y Sears, 1996; Salem y Hope, 1997). Asimismo, estudios previos de nuestro grupo de investigación demostraron que la severidad del síndrome de abstinencia de morfina, provocado por una inyección de naloxona, resultaba aumentada en los animales A2A knockout (Berrendero y cols, 2003). Sin embargo todavía no existen estudios comportamentales que permitan conocer el papel de los receptores A2A en las propiedades motivacionales y reforzantes de los opioides.

6.4.3. Psicoestimulantes

La cafeína, derivado de las xantinas, es la droga psicoactiva más consumida en todo el mundo. Aunque se considera un psicoestimulante no representa una droga de abuso prototípica (Daly y Fredholm, 1998). Así, la administración sistémica de cafeína aumenta los niveles de dopamina y glutamato extracelular en el Nac, indicando que la cafeína puede antagonizar los efectos endógenos de la adenosina, y facilitar de esta manera la transmisión dopaminérgica (Ferré y cols., 1997; Solinas y cols., 2002).

Existen algunos resultados controvertidos sobre la participación de los receptores A2A en las propiedades adictivas de los psicoestimulantes. En primer lugar, un trabajo realizado en animales deficientes en el receptor A2A mostró que los efectos agudos de los psicoestimulantes se encuentran atenuados en estos animales, sin que exista ninguna alteración aparente del sistema dopaminérgico (Chen y cols., 2000). En relación a los efectos placenteros de los psicoestimulantes, se ha demostrado que antagonistas del receptor A2A, como el DMPX y la cafeína, reducen la preferencia de plaza inducida por cocaína (Poleszak y Malec, 2003). Sin embargo, estudios recientes demuestran que tanto la cafeína como el CGS15943, otro antagonista A2A, pueden reinstaurar una conducta de búsqueda compulsiva de cocaína (Weerts y Griffiths, 2003). Por otro lado, agonistas A2A

como el CGS21680 y NECA inhiben la iniciación de una conducta de autoadministración mantenida por infusiones de cocaína (Knapp y cols., 2001) demostrando un papel inhibitorio de estos receptores en los efectos de recompensa producidos por la cocaína. En estudios de ICSS, se observó que el antagonista DMPX puede revertir los efectos sobre el umbral de placer producidos por un período de abstinencia de cocaína (Baldo y cols., 1999). Al contrario, se ha observado que el antagonista A2A MSX3 potencia los efectos discriminatorios de la cocaína y de la metamfetamina en ratas entrenadas a discriminar entre inyecciones de metanfetamina, cocaína o vehículo para autoadministrarse comida bajo un protocolo de razón fija 10 (Justinova y cols., 2003). Por otro lado, la cafeína previene la extinción de la autoadministración de cocaína en roedores (Worley y cols., 1994; Schenk y cols., 1996; Kuzmin y cols., 1999). Teniendo en cuenta este conjunto de resultados, se puede considerar que el papel específico del receptor A2A en las propiedades adictivas de los psicoestimulantes todavía permanece sin esclarecer.

6.4.4 Cannabinoides

Existe muy poca literatura sobre una posible interacción entre los sistemas cannabinoide y purinérgico. Los escasos estudios existentes se centran en los efectos de descoordinación motora producida por el THC. En este sentido, dos estudios demuestran que la infusión intracerebelar del agonista del receptor de adenosina A1 CHA aumenta la descoordinación motora inducida por THC, indicando una comodulación entre el receptor cannabinoide CB1 y el receptor de adenosina A1 en la discapacidad motora producida por dicho cannabinoide (Dar, 2000; De Santy y Dar, 2001). Un estudio previo realizado de nuestro laboratorio, investigó la posible interacción entre los receptores A2A y CB1 en el síndrome de abstinencia de morfina mediante el uso de ratones dobles mutantes A2A/CB1 (Berrendero y cols., 2003). Sin embargo, no se encontró ninguna diferencia significativa en la expresión somática de la abstinencia morfínica entre los animales A2A/CB1 knockout y los wild-type. Hasta el momento no se han realizado más experimentos que permitan conocer si la adenosina endógena, a través de sus receptores A2A, juega un papel importante en las propiedades adictivas de los cannabinoides.

A nivel de los sistemas de señalización intracelular, evidencias recientes sugieren una posible interacción entre el sistema purinérgico y cannabinoide. De este modo, se ha encontrado un mecanismo sinérgico entre el receptor cannabinoide CB1 y el de dopamina D2, sobre la señalización de la PKA, que estaría mediado por la activación del receptor A2A (Yao y cols., 2003). Por otra parte, se ha demostrado que los efectos psicomotores de los cannabinoides dependen de la cascada de señalización intracelular

de activación de la PKA, la cual está regulada por la fosforilación de DARPP-32, que a su vez está modulada por los receptores de dopamina D2 y los de adenosina A2A (Andersson y cols., 2005).

6.4.5 Nicotina

Estudios epidemiológicos han relacionado el consumo de cafeína y nicotina. En este sentido, los fumadores parecen consumir más nicotina si a la vez consumen cafeína (Brown y Benowitz, 1989), y al mismo tiempo, consumen más cafeína que los no fumadores (Swanson y cols., 1994). También existen datos experimentales mostrando que la inhibición de los receptores A2A por la administración de cafeína aumenta los efectos estimulantes de la nicotina sobre la locomoción (Sudakov y cols., 2003). Asimismo, un tratamiento crónico de cafeína facilita la adquisición de una conducta operante mantenida por infusiones de nicotina en ratas (Shoib y cols, 1999). Este tipo de tratamiento aumenta también los efectos discriminativos de la nicotina en un paradigma de autoadministración intravenosa (Gasior y cols., 2000). Pese a estos resultados, existen pocas evidencias que reflejen la posible implicación del receptor A2A en el fenómeno de adicción a nicotina.

Hipótesis de trabajo

Según lo expuesto hasta ahora, es evidente que el sistema cannabinoide juega un papel importante en la regulación de las propiedades adictivas mediando los efectos de recompensa de drogas de abuso prototípicas como el *cannabis*, el etanol, la morfina y la nicotina. Teniendo en cuenta la participación del sistema endocannabinoide en los procesos de modulación del sistema dopaminérgico y otros sistemas de neurotransmisión relacionados con el proceso adictivo, podríamos considerar que el sistema cannabinoide representa un sustrato común de la adicción de diferentes prototipos de drogas de abuso, incluidos los psicoestimulantes, cuya interacción con el sistema endocannabinoide nos proponemos demostrar.

Por otra parte, el sistema purinérgico modula numerosos sistemas de neurotransmisión en el SNC. La estrecha relación a nivel celular y funcional entre los receptores de adenosina y los receptores dopaminérgicos proporciona evidencias de que el sistema purinérgico podría modular los sistemas de recompensa. Hasta el momento pocos estudios han abordado la participación del receptor de adenosina A2A en los fenómenos adictivos. Nosotros proponemos evaluar la posible participación de dichos receptores en las propiedades reforzantes y adictivas de diferentes drogas de abuso, lo que podría suponer la existencia de un nuevo sistema de modulación común de los procesos adictivos.

A decorative horizontal band at the bottom of the page featuring a light gray, stylized floral and scrollwork pattern. The pattern includes various motifs such as acanthus leaves, scrolls, and floral shapes.

OBJETIVOS

Objetivos Generales

- Evaluar la participación del sistema endocannabinoide en las propiedades adictivas de la cocaína, mediante la utilización de ratones knockout deficientes en el receptor CB1.
- Evaluar la participación del sistema purinérgico en los fenómenos de dependencia de diferentes drogas de abuso como la cocaína, el THC, la nicotina y la morfina, mediante la utilización de ratones knockout deficientes en el receptor A2A.

Objetivos específicos

- Evaluaremos el componente motivacional de la adicción de cocaína en animales deficientes en el receptor CB1 utilizando la técnica de autoadministración intravenosa y el uso de diferentes protocolos de refuerzo. También investigaremos en animales deficientes en el receptor CB1 los efectos de la cocaína sobre el sistema dopaminérgico mediante la técnica de microdiálisis *in vivo* para determinar los niveles extracelulares de dopamina en el NAc. (*Artículo 1*)
- Evaluaremos los efectos agudos y crónicos de la exposición a cocaína en animales A2A knockout. Además, estudiaremos el papel del receptor A2A en las propiedades reforzantes de la cocaína mediante el uso de dos procedimientos diferentes: el paradigma de condicionamiento espacial y la técnica autoadministración intravenosa. (*Artículo 2*)
- Investigaremos la participación del receptor purinérgico A2A en los efectos farmacológicos del THC en animales A2A knockout. Además, estudiaremos las propiedades motivacionales del THC en estos animales mediante el paradigma de condicionamiento espacial. Asimismo, evaluaremos la implicación del receptor A2A en los fenómenos de dependencia física y tolerancia al THC. (*Artículo 3*)
- Investigaremos la participación del receptor purinérgico A2A en los efectos farmacológicos de la nicotina en animales A2A knockout. Además, estudiaremos las propiedades placenteras de diferentes dosis de nicotina en estos animales mediante el paradigma de condicionamiento espacial. Asimismo, investigaremos las propiedades discriminativas de la nicotina en los ratones A2A knockout, en un

paradigma de aversión condicionada al gusto. También evaluaremos la implicación del receptor A2A en los efectos de la nicotina sobre el sistema dopaminérgico mediante la técnica de microdiálisis *in vivo* para determinar los niveles extracelulares de dopamina en el NAc. Igualmente estudiaremos el papel del receptor A2A en los fenómenos de dependencia física de nicotina. (*Artículo 4*)

- Profundizaremos sobre la participación del receptor A2A en las propiedades motivacionales de la morfina y sus efectos farmacológicos utilizando ratones deficientes en el receptor A2A. (*Artículo 5 en preparación*)

A decorative horizontal border at the bottom of the page featuring a repeating pattern of stylized, light gray floral and scrollwork motifs. The word "RESULTADOS" is printed in bold black text on the right side of this border.

RESULTADOS

Cocaína

Dice la leyenda que Pacha Mama (la madre tierra) regaló la hoja de coca al pueblo andino para que soportase la tristeza, el hambre y el dolor en tiempos de esclavitud. “La hoja de coca da al pueblo andino la luz para la mente, el alimento para el cuerpo y el consuelo para el dolor. Pero ay del momento en que el conquistador blanco toque la sagrada hoja de coca porque solo encontrará en ella veneno para su cuerpo y locura para su mente y cuando la coca intente luego ablandar su corazón, sólo lograra romperlo como los cristales de hielo demuelen montañas”.

Leyenda anónima

La cocaína, metiléster de benzoilecgonina, es un alcaloide que se extrae de la hoja de coca (*Erythroxylon Coca*). Su uso como estimulante data del año 3000 a.C. y su consumo ha permanecido hasta nuestros días. Fue importada a Europa en 1580 y su principio activo fue aislado en 1862 por Wöhler y Nieman (Karch, 199). Las propiedades farmacológicas de la cocaína fueron investigadas incluso por Sigmund Freud, quien defendía sus propiedades curativas. Poco después, gracias a Louis Lewin, se puso de manifiesto el potencial adictivo de la cocaína. Sin embargo, tanto en Europa como en Norteamérica se generalizó su uso como tónico y hasta 1902 la cocaína era un compuesto de la conocida “Coca-Cola”, así como lo había sido anteriormente del “Vino Mariani”.

La cocaína es un psicoestimulante con efectos euforizantes y sus efectos farmacológicos son muy diversos. A dosis moderadas la cocaína incrementa la atención, provoca sensación de bienestar y euforia, aumenta la energía y la actividad motora y la sensación de vigor. Además de sus propiedades como anestésico local, la cocaína puede provocar vasoconstricción local y puede llegar a causar hipertensión, arritmias cardíacas y convulsiones. La euforia provocada por la cocaína disminuye a medida que su consumo se repite. En contrapartida aumenta la disforia provocada por la abstinencia. Este ciclo se repite constantemente y provoca que el abuso potencial de la cocaína sea muy elevado (Gawin y Ellinwood, 1998).

La cocaína actúa principalmente bloqueando el transportador de dopamina (DAT), aunque también presenta afinidad por los transportadores de serotonina (SERT) y de norepinefrina (NERT). Al bloquear la recaptación de monoaminas, sus niveles aumentan en el SNC. Se ha demostrado que las propiedades reforzantes y la motivación por la búsqueda compulsiva de los psicoestimulantes se deben sobre todo al aumento de dopamina en áreas límbicas, en especial en las terminaciones localizadas en el NAc y PFC (Chang y cols., 1994; Di Chiara e Imperato, 1988). Este aumento de dopamina se ha relacionado típicamente con la sensación de euforia. Según el modelo alostático de la adicción desarrollador por Koob y Le Moal (2001), tras el uso crónico de cocaína ocurren cambios neuroadaptativos en el SNC para contrarrestar los efectos producidos por dicha droga. Estos cambios van creciendo con el consumo repetido de la droga, modificando

el umbral de recompensa y produciendo un estado que consolida la continuidad del consumo.

Artículo 1

Lack of CB1 cannabinoid receptor impairs cocaine self-administration. Soria G, Mendizábal V, Touriño C, Robledo P, Ledent C, Parmentier M, Maldonado R, Valverde O. 2005 *Neuropsychopharmacology*. 30(9):1670-80.

OBJETIVOS

- Estudiar la participación de los receptores cannabinoides CB1 en diferentes aspectos del componente motivacional de la cocaína como la adquisición de una conducta operante mantenida por infusiones intravenosas de cocaína, su mantenimiento y la motivación por la búsqueda de cocaína. Para ello se utilizó la técnica de autoadministración intravenosa y el uso de diferentes protocolos de refuerzo en animales deficientes en el receptor CB1 y wild-type.
- Investigar los efectos de la cocaína sobre el sistema dopaminérgico mediante la técnica de microdiálisis *in vivo* para determinar los niveles extracelulares de dopamina en el NAc.

RESULTADOS

- El 75% de los animales wild-type adquirió una conducta operante para la autoadministración intravenosa de cocaína (1 mg/kg/infusión), mientras que en el caso de los animales deficientes en el receptor CB1 sólo un 25% adquirió dicha conducta.
- El máximo esfuerzo para obtener una infusión de cocaína realizado por los animales CB1 knockout fue significativamente menor cuando se comparó con el grupo wild-type.
- El bloqueo farmacológico del receptor CB1 con rimonabant disminuyó el máximo esfuerzo para obtener una infusión de cocaína.
- Se observó un aplanamiento de la curva dosis-respuesta de cocaína en el paradigma de autoadministración en el grupo de ratones deficientes en el receptor CB1.
- La administración aguda de cocaína indujo incrementos similares en los niveles extracelulares de dopamina en el NAc de los animales de ambos genotipos.

CONCLUSIÓN

- Los receptores cannabinoides CB1 desempeñan un papel fundamental en los procesos de consolidación de la motivación por la cocaína. Sin embargo, los receptores cannabinoides CB1 no son requeridos para los efectos agudos de la cocaína sobre la transmisión dopaminérgica en el NAc.

Lack of CB1 cannabinoid receptor impairs cocaine self-administration

Guadalupe Soria¹, Victoria Mendizábal¹, Clara Touriño¹, Patricia Robledo^{1,2}, Catherine Ledent³, Marc Parmentier³, Rafael Maldonado¹ and Olga Valverde^{1#}

To whom correspondence should be addressed: ovalverde@imim.es

¹Laboratori de Neurofarmacologia, Departament de Ciències Experimentals i de la Salut, Universitat Pompeu Fabra, C/Doctor Aiguader 80, 08003 Barcelona, Spain, Tel. 34935422831, Fax. 34935422802

²IMIM, Institut Municipal d'Investigacions Mèdiques, C/Doctor Aiguader 80, 08003 Barcelona, Spain

³IRIBHM, Université Libre de Bruxelles, N-1070 Bruxelles, Belgium

Abstract

Acute rewarding properties are essential for the establishment of cocaine addiction and multiple neurochemical processes participate in this complex behavior. In the present study, we used the self-administration paradigm to evaluate the role of CB1 cannabinoid receptors in several aspects of cocaine reward, including acquisition, maintenance and motivation to seek the drug. For this purpose, both CB1 receptor knockout mice and wild-type littermates were trained to intravenously self-administer cocaine under different schedules. Several cocaine training doses (0.32, 1 and 3.2 mg/kg/infusion) were used in the acquisition studies. Only 25% of CB1 knockout mice versus 75% of their wild-type littermates acquired a reliable operant responding to self-administer the most effective dose of cocaine (1 mg/kg/infusion), and the number of sessions required to attain this behavior was increased in knockout mice. Animals reaching the acquisition criteria were evaluated for the motivational strength of cocaine as a reinforcer under a progressive ratio schedule. **The maximal effort to obtain a cocaine infusion was significantly reduced after the genetic ablation of CB1 receptors. A similar result was obtained after the pharmacological blockade of CB1 receptors with SR141716A in wild-type mice.** Moreover, the cocaine dose-response curve was flattened in the knockout group suggesting that the differences observed between genotypes were related to changes in the reinforcing efficacy of the training dose of cocaine. Self-administration for water and food was not altered in CB1 knockout mice in any of the reinforcement schedules used, which emphasizes the selective impairment of drug reinforcement in these knockout mice. Finally, cocaine effects on mesolimbic dopaminergic transmission were evaluated by *in vivo* microdialysis in these mice. Acute cocaine administration induced a similar enhancement in the extracellular levels of dopamine in the nucleus accumbens of both

Olga Valverde

CB1 knockout and wild-type mice. This work clearly demonstrates that CB1 receptors play an important role in the consolidation of cocaine reinforcement, although are not required for its acute effects on mesolimbic dopaminergic transmission.

Keywords: CB1 cannabinoid receptor, self-administration, reinforcement, cocaine, motivation, knockout, reward, *in vivo* microdialysis, dopamine, **SR141716A**.

Introduction

Adaptive changes occurring in different brain areas within the mesocorticolimbic system during repeated drug exposure have been reported to play a crucial role in the consolidation of an addictive behavior (Koob and LeMoal 2001; Nestler 2004). Among these structures, the nucleus accumbens (NAc) and its dopaminergic input are considered a common feature mediating the primary reinforcing effects of most drugs of abuse (Di Chiara 1998). CB1 cannabinoid receptors are important modulators of dopaminergic activity in the mesocorticolimbic system, suggesting that the endogenous cannabinoid system may contribute to the addictive properties of different drugs of abuse such as opioids, ethanol and nicotine. Thus, the pharmacological blockade of CB1 receptors with SR141716A attenuates morphine, heroin and nicotine self-administration (Cohen et al. 2002; Caillé and Parsons 2003; Solinas et al. 2003) and inhibits ethanol intake in rodents (Arnone et al. 1997; Freedland et al. 2001). Knockout mice lacking CB1 cannabinoid receptor were generated and characterized (Ledent et al. 1999; Zimmer et al. 1999). The prototypical effects of CB1 cannabinoid agonists such as antinociception, reinforcement, hypothermia and hypolocomotion were absent in these mice. Moreover, the rewarding properties of nicotine and morphine measured in the conditioned place preference (CPP) and the self-administration paradigm are absent in mice lacking CB1 receptors (Ledent et al. 1999; Martin et al. 2000; Cossu et al. 2001; Castañé et al. 2002). The deletion of CB1 receptors not only abolishes WIN 55,212-2 self-administration (Ledent et al. 1999) but also attenuates oral ethanol self-administration and acute alcohol- and morphine-induced dopamine (DA) release in the NAc (Hungund et al. 2003; Mascia et al. 1999). However, several studies suggest that CB1 cannabinoid receptors do not participate in the acute rewarding properties of psychostimulants. Both acute cocaine self-administration performed during a single 30-

min session and cocaine-induced CPP were preserved in mice lacking CB1 receptors (Martin et al. 2000; Cossu et al. 2001). On the other hand, CB1 cannabinoid receptor stimulation by WIN 55,212-2 has been reported to decrease the rewarding effects of cocaine in the brain self-stimulation paradigm in mice (Vlachou et al. 2003), whereas the blockade of CB1 receptors by SR141716A decreased the reinforcing value of intracranial self-stimulation in rats (Deroche-Gamonet et al. 2001), suggesting that the endogenous cannabinoid system could modulate motivational states involved in reward processes.

Although acute reinforcing properties are essential for the establishment of drug addiction, other complex behavioral processes are crucial for the consolidation of this chronic relapsing disorder (Koob and LeMoal 2001). Intravenous drug self-administration is probably the most complete and reliable approach to investigate in animals the abuse potential of drugs in humans. Different aspects of drug addiction can be studied using this paradigm, including acquisition and maintenance of an operant response to obtain a drug, extinction, reinstatement and relapse. In this sense, an important role of the endocannabinoid system in the neuronal processes underlying cocaine seeking behavior has been recently demonstrated. Thus, SR141716A attenuates cocaine relapse induced by re-exposure to cocaine-associated cues or cocaine itself (De Vries et al, 2001).

In view of these data, we used the operant self-administration procedure to evaluate the role of CB1 receptors in different responses related to cocaine reinforcing effects including acquisition and maintenance of self-administration behavior, and motivation to seek the drug. For this purpose, both CB1 receptor knockout mice and their wild-type littermates were trained to self-administer different doses of cocaine (0.32, 1 and 3.2 mg/kg/infusion) using two schedules of reinforcement, namely fixed

Olga Valverde

ratio 1 (FR1) and progressive ratio (PR). These results were compared to the acquisition of an operant behavior to obtain two natural rewarding stimuli, food and water. **We also used wild-type mice to examine the effect of the CB1 receptor antagonist, SR141716A on cocaine self-administration under a PR schedule of reinforcement.** In addition, *in vivo* microdialysis studies were performed to assess if the acute effects of cocaine on the extracellular levels of DA in the NAc were modified in these knockout animals.

Materials and Methods

Animals

Male CB1 knockout mice and their wild-type littermates were used in all the experiments. The generation of mice lacking CB1 cannabinoid receptor was described previously by Ledent et al. (1999). In order to homogenize the genetic background of the mice, the first generation heterozygotes were bred for 15 generations on a CD1 background (Charles River, France) with selection for the mutant CB1 gene at each generation. **The CB1 receptor knockout mice derived from the backcrossing of chimeric CD1-CB1 receptor knockout mice developed by Ledent et al. (1999) with wild-type CD1 females (Charles River, France). Beginning with the 15th generation of backcrossed mice, heterozygote-heterozygote matings of CB1 knockout mice produced wild-type and knockout littermates for subsequent experiments. Breeding couples were periodically renovated by crossing heterozygote mice with wild-type CD1 females (Charles River, France) in order to maintain a genetically diverse outbred background.** All mice used in the experiment were originated from the same breeding and were matched for age and weight. **Male wild-type CD1 mice used in the SR141716A experiment were purchased from Charles River (France).**

Mice weighed 25-30 g at the beginning of the experiment, and were housed individually in a temperature (21 ± 1 °C) and humidity (55 ± 10 %) controlled room. For self-administration studies, mice were exposed to a 12 hours light:dark reversed cycle (light on between 20:00 and 8:00h), and the experiments took place during the dark phase. For microdialysis studies the light:dark cycle was light on between 8:00h and 20:00h, and the experiments took place during the light phase. Food and water were available *ad libitum* during the cocaine self-administration and microdialysis experiments, excepting during the exposure to the self-administration sessions. All

Olga Valverde

animal care and experimental procedures were conducted according to the guidelines of the European Communities Directive 86/609/EEC regulating animal research and approved by the local ethical committee (CEEA-IMAS-UPF).

Drugs

Cocaine hydrochloride was obtained from Ministerio Sanidad y Consumo (Spain) and dissolved in sterile 0.9 % physiological saline. Ketamine hydrochloride (100 mg/kg) (Imalgène 1000®, Rhône Mérieux, Lyon, France) and xylazine hydrochloride (20 mg/kg) (Sigma Chemical Co., Madrid, Spain) were mixed and dissolved in absolute ethanol and distilled water (1:9). The anesthetic mixture was administered in an injection volume of 20 ml/kg body weight (i.p.). **The selective CB1 receptor antagonist SR141716A (generously provided by Sanofi Recherche, Montpellier, France) was dissolved in a solution of 10% ethanol, 10% cremophor EL and 80% distilled water, and administered i.p. in a volume of 10 ml/kg.** All the other substances employed were obtained from Sigma Chemical Co, Madrid, Spain.

Operant self-administration

Apparatus. The self-administration experiments were conducted in mouse operant chambers (Model ENV-307A-CT, Medical Associates, Georgia, VT, USA) equipped with two holes, one was selected as active hole for delivering the reinforcer and the other as inactive hole. Nose-poking on the active hole resulted in a reinforcer (food pellet, water or cocaine infusion) while nose-poking on the inactive hole had no consequences. The chambers were housed in sound- and light-attenuated boxes equipped with fans to provide ventilation and ambient noise. A removable food and liquid dispenser equidistant between the two nose-pokes permitted delivery of food

pellets or water when required. A stimulus light, located above the active hole, was paired contingently with the delivery of the reinforcer. The same operant chambers were used for drug self-administration, except that drinking and food dippers were removed.

Food maintained behavior. Mice were deprived of food (3.5 g of food were provided daily) during four days, in order to obtain 95 % of their initial weight. The same food deprivation regime was maintained during the whole evaluation of food-maintained operant behavior. Water was available *ad libitum* during this experimental phase. Four days after starting food deprivation, mice were trained in the operant chambers to nose-poke for food pellets (Noyes Precision Pellets, Research Diets. Inc., USA). One hour daily self-administration sessions were conducted 6 days per week. The house light was on at the beginning of the session for 3 sec and off during all the session. First, mice were trained under a FR1 schedule of reinforcement. A 10 sec time-out period was established after each reinforcement. During this 10 sec period, the cue light was off and no reward was provided on the active hole. Responses on the inactive hole and all the responses during the 10 sec time-out period were also recorded. The session was terminated after 100 reinforcers were delivered or after 1 hour, whichever occurred first. The criteria for the acquisition was achieved when mice maintained a stable responding with less than 20 % deviation from the mean of the total number of reinforcers earned in three consecutive sessions (80 % of stability), with at least 75% responding on the active hole, and a minimum of 10 reinforcers per session. Once achieved the acquisition criteria, the reinforcement schedule was changed to FR3 (data not shown). The same criteria as above was used to move mice from FR3 to PR in which the response requirement to earn an injection escalate according to the following serie: 1 - 2 - 3 - 5 - 12 - 18 - 27 - 40 - 60 - 90 - 135 - 200 - 300 - 450 - 675 - 1000. The PR session lasted for

2 hours or until mice did not complete the ratio for delivery of one reinforcer within 1 hour, and was performed only once. The breaking point to extinguish self-administration behavior was determined in each animal. After each session, mice were returned to their home-cages.

Water maintained behavior. Mice were first deprived of water (20 min of free water were provided daily) during two days and this same water deprivation regime was maintained during the whole evaluation of water-maintained operant behavior. Food was available *ad libitum* during this experimental phase. Two days after starting water deprivation, mice were trained in the operant chambers to nose-poke for water. Water self-administration sessions were conducted as described above for food-maintained responding, except that the food dispenser was changed for a liquid dipper and responses were maintained by water delivered in 10 μ l over 10 sec. First, mice were trained under a FR1 schedule of reinforcement. A 20 sec time-out period was established after each reinforcement. The session was terminated after 100 reinforcers were delivered or after 1 hour whichever occurred first. When mice achieved the acquisition criteria (see food maintained behavior), the reinforcement schedule was changed to FR3 (data not shown). The same criteria as above was used to move mice from FR3 to PR, as described above.

Surgery for drug self-administration study. Mice were anaesthetized under isoflurane anaesthesia (1.5- 2.0 %) and then, implanted with indwelling i.v. Silastic catheters as previously described (Caine et al. 1999) with minor modifications. Briefly, a 6 cm length of silastic tubing (0.3 mm inner diameter, 0.6 mm outer diameter) (Silastic®, Dow Corning, Houdeng-Goegnies, Belgium) was fitted to a 22 gauge steel cannula

Olga Valverde

(Semat, Herts, England) that was bent at a right angle and then embedded in a cement disk (Dentalon Plus, Heraeus Kulzer, Germany) with an underlying nylon mesh. The catheter tubing was inserted 1.3 cm into the right jugular vein and anchored with suture. The remaining tubing run subcutaneously to the cannula, which exited at the midscapular region. All incisions were sutured and coated with antibiotic ointment (Bactroban, GlaxoSmithKline, Spain). After surgery, animals were allowed to recover for 3 days prior to initiation of self-administration sessions. The catheter was flushed daily with a saline solution containing heparin (30 UI/mL) in order to maintain its patency. The patency of intravenous catheters was evaluated periodically (approximately every 6 days) and whenever drug self-administration behavior appeared to deviate dramatically from that observed previously, by the infusion of 0.1 ml of tiobarbital (5mg/ml) through the catheter. If prominent signs of anesthesia were not apparent within 3 sec of the infusion, the catheter was surgically removed, and a new catheter was implanted in the opposite jugular vein using the surgical procedure described above.

Drug self-administration procedure. Cocaine self-administration sessions were conducted 3 days after surgery using the schedule described above for food and water self-administration with the following exceptions. Responding was maintained by cocaine (0.32, 1 and 3.2 mg/kg per injection) delivered in 23.5 μ l over 2 sec. Cocaine was infused via a syringe that was mounted on a microinfusion pump (PHM-100A, Med-Associates, Georgia, VT, USA) and connected, via Tygon tubing (0.96 mm o.d., Portex Fine Bore Polythene Tubing, Portex Limited, Kent, England) to a single channel liquid swivel (375/25, Instech Laboratories, Plymouth Meeting, PA, USA) and to the mouse intravenous catheters. The swivel was mounted on a counter-balanced arm above

the operant chamber. Mice were trained to nose-poke in order to receive a cocaine injection under a FR1 schedule of reinforcement. One hour daily self-administration sessions started with a priming injection of the drug. The number of reinforcers was limited to 50 infusions per session and each reinforcer was followed by a 30 sec time-out period where active nose-poking had no consequences. The stimulus light signaled delivery of the reinforcer. After mice achieved the acquisition criteria (80 % of stability in three consecutive sessions, with at least 75% responding on the active hole, and a minimum of 3 reinforcers per session), the reinforcement schedule was changed to PR, as described above. For the dose response curve, new animals were operated and trained to self-administer cocaine (1 mg/kg/infusion) under a FR1 schedule of reinforcement on the same conditions as described before. After acquisition (same criteria as above), self-administration of various doses of cocaine (0.032, 0.1, 0.32, 1, 3.2 mg/kg/infusion) was tested during 2 hours using a Latin square design: a single dose was presented each session, and the order of presentation was counterbalanced between mice.

In a second experiment, the effects of the CB1 receptor antagonist, SR141716A on the motivational strength of cocaine as a reinforcer were evaluated in wild-type mice by using a PR schedule. Mice were trained to self-administer cocaine (1 mg/kg/inf) using the same acquisition criteria as above. After acquisition, animals were pretreated with either vehicle or different doses of SR141716A (0.3, 1 or 3 mg/kg, i.p.) 30 min before starting the different PR sessions, performed as reported in the first experiment. A Latin square design was used to evaluate the effect of the different doses of SR141716A in each animal. PR sessions were performed once daily on subsequent days. The doses of SR141716A were chosen considering the behavioral results previously reported with this antagonist on cocaine self-administration in rats (De Vries et al. 2001).

Microdialysis procedure

Surgery and sample recollection. Mice were anesthetized with a ketamine/xylazine mixture (0.2 ml/10g body weight i.p) and placed in a stereotaxic apparatus with a flat skull (Paxinos and Franklin 1997). A small hole was drilled on the right side of the skull and the cannula guide (CMA/7, CMA Microdialysis, Stockholm, Sweden) was implanted vertically 1 mm above the NAc (AP: + 1.5 mm; ML: - 0.9 mm; DV: - 4.0 mm from the bregma), and then fixed to the skull with dental cement. Three days after the surgery, the analytical probe (CMA/7/1mm, CMA Microdialysis, Stockholm, Sweden) was inserted into the guide cannula. Forty-eight hours after probe implantation, animals were habituated to the experimental environment overnight. The following morning, a ringer solution (147 mM NaCl, 4 mM KCl, 2.3 CaCl₂) was pumped through the dialysis probe at a constant rate of 1 µl/min. Four consecutive 15-min dialysis samples were then collected for determination of baseline DA levels. Animals then received an i.p. injection of cocaine (20 mg/kg) and 12 samples were collected every 15 min and analyzed by HPLC.

Dopamine determination. Dialysate samples (15 µl) were injected without any purification into a HPLC apparatus that consisted of a pump linked to an automatic injector (Agilent 1100, Barcelona, Spain), a reverse-phase column (Zorbax SB C18, 3.5 µm, 150 x 4.6 mm, Agilent Technologies, Barcelona, Spain) and a coulometric detector (Coulochem II, ESA Inc., Chelmsford, USA) with a 5011 analytical cell to quantify DA. The first electrode was fixed at -100 mV and the second electrode at + 300 mV. The composition of the mobile phase was 50 mM NaH₂PO₄, 0.1 mM Na₂EDTA, 0.65 mM octyl sodium sulfate and 14 % (vol / vol) methanol, pH 3.5.

Histology. At the end of the experiments, animals were sacrificed and brains were quickly removed and stored at - 80 °C. In order to check the position of the probe, brains were cut using a cryostat in 20 µm serial sections, which were then processed with Cresyl Violet and observed under a microscope. Only those animals that had been implanted correctly were used in the study.

Statistical analysis

Two-way ANOVA, with hole (active or inactive) and genotype (knockout or wild-type) as factors of variation, was calculated on the mean of nose-pokes performed during the last 3 days required to reach the acquisition criteria. This statistical analysis was performed for FR1 in food, water and cocaine self-administration experiments. Subsequent one-way ANOVA were performed when required. The breaking point values obtained on the PR schedule for food, water and cocaine self-administration were compared between genotypes by calculating one-way ANOVA. Three-way ANOVA, with hole (active or inactive) and genotype (knockout or wild-type) as between factors, and time as within factor, was used to analyze the acquisition of cocaine self-administration at different training doses. For the cocaine dose-response curve, the number of infusions was compared by repeated measures two-way ANOVA (dose as within subject factor and genotype as between subject factor). Subsequent one-way ANOVA were made to calculate differences between genotypes in each dose. **One-way ANOVA repeated measures and subsequent Fisher *post-hoc* analysis were performed to determine the effects of SR141716A on breaking point values.** Additionally, one-way ANOVA within subjects was performed to discard a day effect in the two experiments using a Latin square design.

The microdialysis data were analyzed using three-way ANOVA with treatment (saline and cocaine) and genotype (wild-type and knockouts) as between subject factors and time after cocaine injection as within subject factor. Subsequent two-way ANOVA were performed when required. Unpaired student t-test was employed to compare DA basal level values between genotypes.

RESULTS

Food and water maintained behavior in wild-type and CB1 knockout mice

As shown in Figure 1a, nose-poke behavior maintained by food pellets was acquired by both wild-type and CB1 knockout mice. All the wild-type and CB1 knockout mice reached the FR1 acquisition criteria in 6.5 ± 0.81 days and 10.33 ± 1.91 days respectively ($F [1.10] = 3.422$; n.s.). Both genotypes maintained active nose-poke discrimination. Thus, two-way ANOVA showed in FR1 a main effect of nose-poke discrimination ($F [1.20] = 24.157$; $p < 0.01$), and no effect of genotype ($F [1.20] = 0.410$; n.s) nor interaction between genotype and nose-poke ($F [1.20] = 0.268$; n.s). Subsequent one-way ANOVA showed a significant nose-poke discrimination in wild-type ($F [1.10] = 18.370$; $p < 0.01$) and knockout mice ($F [1.10] = 8.080$; $p < 0.01$). In the case of PR schedule, one-way ANOVA did not reveal differences between the breaking points obtained in wild-type and CB1 knockout groups ($F [1.10] = 0.000$; n.s.) (Fig. 1b).

In order to have further information about operant responding for natural reward, we also tested nose-poke behavior maintained by water delivery in water-deprived mice (Fig 2). All the wild-type and knockout mice achieved the FR1 acquisition criteria in 6.14 ± 0.99 days and 5.00 ± 0.71 days respectively ($F [1.10] = 0.749$; n.s.). Both genotypes maintained active nose-poke discrimination. Thus, two-way ANOVA showed in FR1 a main effect of nose-poke discrimination ($F [1.20] = 58.220$; $p < 0.01$), a main effect of genotype ($F [1.20] = 7.022$; $p < 0.05$) but no interaction between genotype and nose-poke ($F [1.20] = 1.401$; n.s). Subsequent one-way ANOVA showed a significant nose-poke discrimination in wild-type ($F [1.12] = 31.241$; $p < 0.01$) and knockout mice ($F [1.8] = 25.560$; $p < 0.01$). In the PR schedule experiment, no

differences were found between the breaking points obtained for the wild-type and knockout groups ($F [1.10] = 0.032$; n.s.) (Fig 2b).

Cocaine self-administration in CB1 wild-type and knockout mice

The effects of the CB1 receptor mutation on the reinforcing properties of cocaine were evaluated by using the operant self-administration procedure. First, both wild-type and knockout mice were trained to self-administer cocaine (0.32, 1 and 3.2 mg/kg/infusion) during 10 days under a FR1 schedule of reinforcement (Fig 3). At the dose of 0.32 mg/kg/infusion, no reliable cocaine self-administration was observed since the two groups of mice did not discriminate between the active and the inactive holes (See table 1 for three-way ANOVA) (Fig 3a). The percentage of mice that reached the acquisition criteria was 11% for wild-type and 13% for knockout mice. At the dose of 1 mg/kg/infusion, only the wild-type mice were able to significantly maintain a reliable cocaine self-administration during the whole period (See table 1 for three-way ANOVA) (Fig 3b). The percentage of mice that reached the acquisition criteria was 75% for wild-type and 25% for knockout mice. Subsequent one-way ANOVA revealed that only wild-type mice discriminated between the active and the inactive holes after the second day. At the dose of 3.2 mg/kg/infusion, mice significantly maintained a reliable cocaine self-administration. However, in the case of knockout mice cocaine consumption was under a mean of 3 infusions per hour, **being this the reason to fail the achievement of the acquisition criteria** (See table 1 for three-way ANOVA). Subsequent one-way ANOVA revealed that wild-type mice discriminated between the active and the inactive holes after the third day and knockout mice after the eighth day (Fig 3c). The percentage of mice that reached the acquisition criteria was 87.5% for wild-type mice and 0% for knockout mice.

The dose of 1 mg/kg/infusion of cocaine was the most effective to enhance the number of nose-pokes in the active hole in wild-type mice. The highest percentage of knockout mice reaching the acquisition criteria was also obtained with this dose. Therefore, 1 mg/kg/infusion of cocaine was chosen to train mice for the PR and the dose-response curve experiments. At this dose, wild-type mice achieved the FR1 stability criteria in 6.11 ± 0.94 days, while knockout mice spent 10.22 ± 1.53 days for reaching this criteria ($F [1.17] = 6.043; p < 0.05$). As shown in Fig. 4a, cocaine intake during the three days reaching the stability criteria was similar in knockout mice and wild-type littermates. Thus, two-way ANOVA revealed a main effect of nose-poke ($F [1.320] = 37.464; p < 0.01$), no effect of genotype ($F [1.32] = 3.135; \text{n.s.}$), nor interaction between these two factors ($F [1.32] = 4.055; \text{n.s.}$). Subsequent one-way ANOVA showed a significant nose-poke discrimination in wild-type ($F [1.16] = 23.899; p < 0.01$) and knockout mice ($F [1.16] = 13.699; p < 0.01$). In the case of PR schedule, the breaking point values were significantly reduced in mice lacking the CB1 cannabinoid receptor when compared to wild-type littermates ($F [1.14] = 8.675; p < 0.05$) (Fig. 4b).

As shown in Figure 5, a bell shaped dose-response curve was obtained when different doses of cocaine were tested in wild-type mice, while a flattening of this dose-response curve was observed in the knockout group. Two-way ANOVA with repeated measures revealed a main effect of the treatment ($F [4.52] = 9.139; p < 0.01$), genotype ($F [1.13] = 22.405; p < 0.01$) and interaction between these two factors ($F [4.52] = 4.938; p < 0.01$). One-way ANOVA for treatment revealed a significant dose-response effect in wild-type ($F [4.34] = 4.131; p < 0.01$) but not in knockout mice ($F [4.39] = 0.818; \text{n.s.}$). One-way ANOVA for genotype revealed significant differences at the doses of 0.032 ($F [1.14] = 22.932; p < 0.01$), 0.1 ($F [1.14] = 15.729; p < 0.01$), 0.32 (F

[1.14] = 10.123; $p < 0.01$), 1 (F [1.14] = 11.994; $p < 0.01$) and 3.2 mg/kg/infusion (F [1.14] = 7.034; $p < 0.05$). One-way ANOVA revealed no effect of the day in the Latin square design (F [4.56] = 0.399; n.s.).

Effect of SR141716A on breaking points achieved under PR schedule

A new group of wild-type mice was trained to self-administer cocaine under a FR 1 schedule of reinforcement using the previously described acquisition criteria. Thus, mice that reached the acquisition criteria (9.17 ± 0.65 days) clearly discriminated between the active and the inactive holes (F [1.11] = 92.898; $p < 0.01$), and had 16.56 ± 1.62 as average of responses in the three days required to achieve this criteria. As shown in Figure 6, the maximal effort to obtain a cocaine infusion under a PR schedule of reinforcement was decreased when mice were previously treated with SR141716A. Thus, one way-ANOVA with repeated measures revealed a dose-dependent effect of SR141716A (F [3.15] = 5.303; $p < 0.01$). Subsequent post-hoc comparisons showed differences with the doses of 1 ($p < 0.05$) and 3 mg/kg ($p < 0.05$) were compared with vehicle.

Dopamine levels in the nucleus accumbens in CB1 wild-type and knockout mice

Figure 7 shows a representative coronal section of the mouse brain with the placement of the microdialysis probe through the NAc. Most of the probes were located medial to the anterior commissure, between 1.78 and 1.34 mm from bregma, and dorsal to the olfactory tubercule.

Basal levels of DA in NAc dialysates were similar in wild-type (5.63 ± 0.89 pg/15 μ l) and CB1 cannabinoid receptor knockout mice (3.93 ± 0.61 pg/15 μ l) ($t = 0.124$; n.s.). As shown in Fig. 8, cocaine administration (20 mg/kg, i.p.) increased DA in NAc

dialysates of both wild-type and CB1 knockout mice. The maximal increase of DA elicited by cocaine in the NAc of CB1 knockout mice (260%) did not differ significantly from that of wild-type mice (240%), and occurred in both groups from 15 to 30 min after cocaine administration. Three-way ANOVA revealed a significant main effect of time following cocaine injection ($F [11, 176] = 10.907; p < 0.01$), treatment ($F [1, 16] = 238.256; p < 0.01$) and no effect of genotype ($F [1, 16] = 0.029; n.s.$). An interaction between time following cocaine injection and treatment was observed ($F [11, 176] = 5.226; p < 0.01$). No other significant two- or three-way interactions among factors were observed.

Discussion

This work demonstrates for the first time that CB1 cannabinoid receptors play an important role in the acquisition and maintenance of cocaine self-administration. The present findings suggest a lack of motivation to seek the drug in CB1 knockout mice since, first, only 25% of CB1 knockout mice acquired a reliable operant responding to self-administer cocaine (1 mg/kg/infusion), second, the time required for reaching the acquisition criteria was significantly increased in knockout mice, third, the maximal effort required to obtain a cocaine infusion was significantly reduced **after the genetic ablation of CB1 receptors. A similar result was obtained after the pharmacological blockade of these receptors with SR141716A in wild-type mice.** However, acute cocaine administration induced a similar enhancement of the DA extracellular levels in the NAc in wild-type and CB1 knockout mice.

CB1 receptors have been involved in learning and memory processes (Reibaud et al. 1999; Martin et al. 2002; Varvel and Litchman 2002). However, the impairment to self-administer cocaine in these knockout mice does not seem to be the consequence of a learning and memory alteration. Indeed, self-administration for natural rewarding stimuli, such as water and food, was not altered in any of the reinforcement schedules used. This result shows first, that CB1 knockout mice are able to learn an operant self-administration behavior and, second, that CB1 receptors do not control the acquisition and maintenance of an operant responding for natural rewards. These findings are in line with recent studies showing that separate neuronal circuits exist in the NAc that encode information related to cocaine versus natural (food/water) reinforcement. (Carelli et al. 2003).

When mice were trained to self-administer different doses of cocaine, a low percentage of CB1 knockout mice (25%) achieved the acquisition criteria only at the

dose of 1 mg/kg/infusion, whereas wild-type mice efficiently reached the acquisition criteria at the dose of 1 mg/kg/infusion (75%) and 3.2 mg/kg/infusion (87.5%). Additionally, knockout mice required a longer training period than their wild-type littermates to reach this criteria. These results are in contrast with a previous study showing that cocaine self-administration was not impaired in CB1 knockout mice under an acute reinforcing paradigm (Cossu et al. 2001). More likely, this apparent disagreement could be due to the different experimental conditions employed. In the previous work, mice with restrained mobility received cocaine (0.1 mg/kg/infusion) when a nose-poke response was performed during a single 30-min session. Our conditions consisted of freely moving animals chronically receiving 1 hour self-administration sessions of cocaine at different training doses (0.32, 1 and 3.2 mg/kg/infusion) during several days. Interestingly, those wild-type and knockout mice that achieved the acquisition criteria (wild-type: 75%; knockout: 25%) showed similar cocaine intake during the first self-administration session (wild-type: 8.88 ± 1.39 ; knockout: 6.33 ± 1.49) and also during the first 30 min of this session (wild-type: 4.63 ± 0.98 ; knockout: 4.00 ± 0.90). However, the knockout group showed a lower cocaine intake than wild-type in the first self-administration session mice when considering all the animals exposed to this paradigm. The present methodological approach allows to evaluate a complex behavioral response in which the acute reinforcing effects of the drug are only the first step for the acquisition of a stable operant self-administration responding. Under these conditions, our results suggest that CB1 receptors are largely involved in the acquisition of cocaine self-administration. In agreement, a recent study using the intracranial self-stimulation paradigm showed that CB1 receptor stimulation decreases the rewarding effects of cocaine (Deroche-Gamonet et al. 2001).

Only the animals that did acquire cocaine self-administration were tested in the PR schedule. Both the breaking points achieved and, consequently, the cocaine intake in this schedule were lower in CB1 knockout mice in comparison with wild-type animals. Accordingly, the cocaine dose-response curve was flattened in the knockout group. The possibility that these differences could be due to changes in sensitivity and/or tolerance to the reinforcing effects of cocaine can be ruled out since knockout mice were unable to self-administer cocaine either at a lower (0.32 mg/kg/infusion) or higher (3.2 mg/kg/infusion) training dose of cocaine. These findings agree with the recent proposal that CB1 receptors could play a major role in the determination of the hedonic value of sucrose and saccharine, two palatable reinforcers (Sanchís-Segura et al. 2004). **In order to discard the possible influence of compensatory changes in CB1 knockout mice in the impairment observed in cocaine self-administration, we evaluated the effects induced by the CB1 receptor antagonist SR141716A on cocaine self-administration in wild-type mice. Mice pretreated with SR141716A (1 and 3 mg/kg) showed a clear decrease on the breaking points to obtain cocaine under a PR schedule. This result confirms the findings obtained on CB1 knockout mice and suggests that the behavioral alterations observed in these animals were a direct consequence of CB1 receptors deletion. Previous studies have demonstrated that SR141716A attenuates relapse induced by re-exposure to cocaine-associated cues or cocaine itself in rats, in spite of the absence of effects of this CB1 antagonist on the acquisition of cocaine self-administration (De Vries et al, 2001).** Hence, the impairment in cocaine self-administration found in these knockout mice could be explained as a lower motivation for maintaining a constant cocaine intake, suggesting a role for CB1 cannabinoid receptors in the consolidation of an addictive process to this psychostimulant drug.

Increases in DA extracellular levels in the NAc have been related to the primary reinforcing effects of prototypical drugs of abuse, including psychostimulants (Di Chiara 1998). The present *in vivo* microdialysis data indicating that cocaine effects in DA extracellular levels in the NAc were not modified in CB1 knockout mice discard the possibility that the decrease of cocaine self-administration in mutants was due to an impaired dopamine release in the NAc, as reported with other drugs of abuse in CB1 knockout mice (Hungund et al. 2003). In addition, these results are in agreement with our previous behavioral results showing the capability of cocaine to induce CPP in CB1 receptor knockout mice (Martin et al. 2000). Moreover, neuroanatomical data reported the absence of CB1 receptor mRNA and protein in dopaminergic neurons in the ventral tegmental area, suggesting that cannabinoids do not exert a direct control on DA release in the NAc (Herkenham et al. 1991; Matsuda et al. 1993). **Instead, post-synaptic interactions between DA D2 receptors and anandamide have been proposed as the basis for endocannabinoid modulation of dopaminergic transmission (Giuffrida et al. 1999).** Accordingly, there is increasing evidence supporting that cannabinoids may release DA by disinhibiting dopaminergic cells via inhibition of GABAergic signaling from medium spiny neurons (Van der Stelt and Di Marzo 2003). **Accordingly, the ability of cocaine to increase anandamide and to inhibit, via D2-like receptors, GABA transmission was partially prevented following blockade of CB1 cannabinoid receptors (Centonze et al. 2004).** Therefore, as observed in the present study, the acute effects of cocaine on DA release, which are mainly produced through inhibition of the DA transporter at the level of the NAc (Giros et al. 1996), would not be expected to change in CB1 cannabinoid receptor knockout mice. The fact that cocaine produced similar increases in DA concentrations in both genotypes is difficult to reconcile with the claim that cocaine functions as a less efficacious reinforcer in the

knockout group. However, there are other examples in the literature showing that either genetic or pharmacological approaches can induce profound differences in the self administration behavior without modifying extracellular levels of DA in the Nac (Chiamulera et al. 2001; Caillé and Parsons 2003). Moreover, independent DA neuronal circuits have been also proposed to be involved in the regulation of the reward-related processes (Lupica et al. 2004).

The mesolimbic dopaminergic system, particularly the NAc, has been largely implicated in the reinforcing properties of most drugs of abuse and natural reward (Koob and LeMoal 2001; Nestler 2004). Thus, lesions of the NAc impairs cocaine self-administration (Zito et al. 1985; Ito et al. 2004) suggesting that this limbic structure plays an essential role in cocaine reinforcement. However, lesions of several brain structures such as the basolateral amygdala, the medial prefrontal cortex or the hippocampus have also been reported to modify cocaine self-administration (Whitelaw et al. 1996; Weissenborn et al. 1997; Chambers and Self 2002), indicating the participation of these structures in cocaine-seeking behavior. Since CB1 cannabinoid receptors are highly expressed in basolateral amygdala, medial prefrontal cortex and hippocampus, a possible explanation for our results could be that the lack of CB1 receptors in these brain structures interfered with cocaine-seeking behavior. Cannabinoid system has also been related to neuronal processes underlying reinstatement of cocaine seeking behavior. Thus, the CB1 cannabinoid agonist HU-210 provokes relapse to cocaine seeking after prolonged withdrawal periods, and the antagonist SR141716A attenuates this response induced by re-exposure to cocaine-associated cues or cocaine itself (De Vries et al. 2001).

In summary, the present study provides further evidence for the role played by the endocannabinoid system as a common neurobiological substrate underlying drug

addictive processes. Indeed, mice lacking CB1 cannabinoid receptor failed to maintain a reliable operant responding for self-administer cocaine although cocaine-induced CPP (Martin et al. 2000) and DA release in the NAc were preserved in these knockout mice. This finding supports the hypothesis that cocaine acute rewarding properties are not enough to develop an addictive behavior and provides evidence for a role of the endocannabinoid system in the acquisition and consolidation of cocaine addiction. The lack of motivation for cocaine observed in CB1 knockout mice could be due not only to the reduction of its reinforcing efficacy, but also to impaired detection, association and representation of the reward signal or to inadequate responding to the rewarding stimuli. The endocannabinoid system seems to modulate cocaine addiction through neuronal circuits different from its acute effects on DA activity in the NAc, which is a prominent substrate for drug rewarding effects.

Olga Valverde

Acknowledgements

This study was supported by grants from Spanish MCYT (SAF 2001/0745) and (GEN2003-20651-C06-04), HFSP (RG007/200-B), Generalitat de Catalunya (Distinció de la Generalitat and 2002SGR00193), Redes del Instituto de Salud Carlos III (C03/06 and G03/005) and European Communities QLRT 2001-01691. CT is a fellowship from DURSI (Generalitat de Catalunya). PR is a researcher supported by FIS Programme. VM is a fellow supported by Fundación Carolina.

References

- Arnone M, Maruani J, Chaperon F, Thiebot MH, Poncelet M, Soubrie P, Le Fur G (1997). Selective inhibition of sucrose and ethanol intake by SR 141716, an antagonist of central cannabinoid (CB1) receptors. *Psychopharmacology* **132**: 104-106.
- Caillé S, Parsons LH (2003). SR141716A reduces the reinforcing properties of heroin but not heroin-induced increases in nucleus accumbens dopamine in rats. *Eur J Neurosci* **18**: 3145-3149.
- Caine SB, Negus SS, Mello NK (1999). Method for training operant responding and evaluating cocaine self-administration behavior in mutant mice. *Psychopharmacology* **147**: 22-24.
- Carelli RM, Ijames SG, Crumling AJ (2000). Evidence that separate neural circuits in the nucleus accumbens encode cocaine versus "natural" (water and food) reward. *J Neurosci* **20**: 4255-4266.
- Castañé A, Valjent E, Ledent C, Parmentier M, Maldonado R, Valverde O (2002). Lack of CB1 cannabinoid receptors modifies nicotine behavioural responses, but not nicotine abstinence. *Neuropharmacology* **43**: 857-867.
- Centonze D, Battista N, Rossi S, Mercuri NB, Finazzi-Agrò A, Bernardi G, Calabressi P, Maccarrone M (2004). A critical interaction between dopamine D2 receptors and endocannabinoids mediates the effects of cocaine on striatal GABAergic transmission. *Neuropsychopharmacology* **29**: 1488-1497.

Olga Valverde

Chambers RA, Self DW (2002). Motivational responses to natural and drug rewards in rats with neonatal ventral hippocampal lesions: an animal model of dual diagnosis schizophrenia. *Neuropsychopharmacology* **27**: 889-905.

Chiamulera C, Epping-Jordan MP, Zocchi A, Marcon C, Cottiny C, Tacconi S, Corsi M, Orzi F, Conquet F (2001). Reinforcing and locomotor stimulant effects of cocaine are absent in mGluR5 null mutant mice. *Nat Neurosci* **4**: 873-874.

Cohen C, Perrault G, Voltz C, Steinberg R, Soubrie P (2002). SR141716, a central cannabinoid (CB1) receptor antagonist, blocks the motivational and dopamine-releasing effects of nicotine in rats. *Behav Pharmacol* **13**: 451-463.

Cossu G, Ledent C, Fattore L, Imperato A, Bohme GA, Parmentier M, Fratta W (2001). Cannabinoid CB1 receptor knockout mice fail to self-administer morphine but not other drugs of abuse. *Behav Brain Res* **118**: 61-65.

De Vries TJ, Shaham Y, Homberg JR, Crombag H, Schuurman K, Dieben J, Vanderschuren LJ, Schoffelmeer AN (2001). A cannabinoid mechanism in relapse to cocaine seeking. *Nat Med* **47**: 1151-1154.

Deroche-Gamonet V, Le Moal M, Piazza PV, Soubrie P (2001). SR141716, a CB1 receptor antagonist, decreases the sensitivity to the reinforcing effects of electrical brain stimulation in rats. *Psychopharmacology* **157**: 254-259.

Di Chiara G (1998). A motivational learning hypothesis of the role of mesolimbic dopamine in compulsive drug use. *J Psychopharmacol* **12**: 54-67.

Olga Valverde

Freedland CS, Sharpe AL, Samson HH, Porrino LJ (2001). Effects of SR141716A on ethanol and sucrose self-administration. *Alcohol Clin Exp Res* **25**: 277-282.

Giros B, Jaber M, Jones SR, Wightman RM, Caron MG (1996). Hyperlocomotion and indifference to cocaine and amphetamine in mice lacking the dopamine transporter. *Nature* **379**: 606-612.

Giuffrida L, Parsons LH, Kerr TM, Rodriguez de Fonseca F, Navarro M, Piomelli D (1999). Dopamine activation of endogenous cannabinoid signaling in dorsal striatum. *Nature Neuroscience* **2**: 358-363.

Herkenham M, Lynn AB, Johnson MR, Melvin LS, de Costa BR, Rice KC (1991). Characterization and localization of cannabinoid receptors in rat brain: a quantitative in vitro autoradiographic study. *J Neurosci* **11**: 563-583.

Hungund BL, Szakall I, Adam A, Basavarajappa BS, Vadasz C (2003). Cannabinoid CB1 receptor knockout mice exhibit markedly reduced voluntary alcohol consumption and lack alcohol-induced dopamine release in the nucleus accumbens. *J Neurochem* **84**: 698-704.

Ito R, Robbins TW, Everitt BJ (2004). Differential control over cocaine-seeking behavior by nucleus accumbens core and shell. *Nat Neurosci* **7**: 389-397.

Koob GF, LeMoal M (2001). Drug addiction, dysregulation of reward, and allostasis. *Neuropsychopharmacology* **24**: 97-129.

Olga Valverde

Ledent C, Valverde O, Cossu G, Petitot F, Aubert JF, Beslot F, Bohme GA, Imperato A, Pedrazzini T, Roques BP, Vassart G, Fratta W, Parmentier M (1999). Unresponsiveness to cannabinoids and reduced addictive effects of opiates in CB1 receptor knockout mice. *Science* **283**: 401-404.

Lupica CR, Riegel AC, Hoffman AF (2004). Marijuana and cannabinoid regulation of brain reward circuits. *Br J Pharmacol* 10.1038/sj.bjp.0705931.

Martin M, Ledent C, Parmentier M, Maldonado R, Valverde O (2000). Cocaine, but not morphine, induces conditioned place preference and sensitization to locomotor responses in CB1 knockout mice. *Eur J Neurosci* **12**: 4038-4046.

Martin M, Ledent C, Parmentier M, Maldonado R, Valverde O (2002). Involvement of CB1 cannabinoid receptors in emotional behavior. *Psychopharmacology* **159**: 379-387.

Mascia MS, Obinu MC, Ledent C, Parmentier M, Bohme GA, Imperato A, Fratta W (1999). Lack of morphine-induced dopamine release in the nucleus accumbens of cannabinoid CB(1) receptor knockout mice. *Eur J Pharmacol* **383**: R1-R2.

Matsuda LA, Bonner TI, Lolait SJ (1993). Localization of cannabinoid receptor mRNA in rat brain. *J Comp Neurol* **327**: 535-550.

Nestler EJ (2004). Historical review: Molecular and cellular mechanisms of opiate and cocaine addiction. *Trends Pharmacol Sci* **25** :210-218.

Paxinos G, Franklin KBJ (1997). The mouse brain in stereotaxic coordinates. *San Diego: Academic*. **1** : 268-272.

Reibaud M, Obinu MC, Ledent C, Parmentier M, Bohme GA, Imperato A (1999). Enhancement of memory in cannabinoid CB1 receptor knock-out mice. *Eur J Pharmacol* **379**: R1-R2.

Sanchís-Segura C, Cline BH, Marsicano G, Lutz B, Spanagel R (2004). Reduced sensitivity to reward in CB1 knockout mice. *Psychopharmacology* 1432-2072 (online).

Solinas M, Panlilio LV, Antoniou K, Pappas LA, Goldberg SR (2003). The cannabinoid CB1 antagonist SR-141716A, differentially alters the reinforcing effects of heroin under continuous-reinforcement, fixed-ratio and progressive-ratio schedules of drug self-administration in rats. *J Pharmacol Exp Ther* **306**: 93-102.

Vlachou S, Nomikos GG, Panagis G (2003). WIN 55,212-2 decreases the reinforcing actions of cocaine through CB1 cannabinoid receptor stimulation. *Behav Brain Res* **141**: 215-222.

Van der Stelt M, Di Marzo V (2003). The endocannabinoid system in the basal ganglia and in the mesolimbic reward system: implications for neurological and psychiatric disorders. *Eur J Pharmacol* **480**: 133-150.

Varvel SA, Lichtman AH (2002). Evaluation of CB1 receptor knockout mice in the Morris water maze. *J Pharmacol Exp Ther* **301**: 915-924.

Weissenborn R, Robbins TW, Everitt BJ (1997). Effects of medial prefrontal or anterior cingulate cortex lesions on responding for cocaine under fixed-ratio and second-order schedules of reinforcement in rats. *Psychopharmacology* **134**: 242-257.

Whitelaw RB, Markou A, Robbins TW, Everitt BJ (1996). Excitotoxic lesions of the basolateral amygdala impair the acquisition of cocaine-seeking behaviour under a second-order schedule of reinforcement. *Psychopharmacology* **127**: 213-224.

Zito KA, Vickers G, Roberts DC (1985). Disruption of cocaine and heroin self-administration following kainic acid lesions of the nucleus accumbens. *Pharmacol Biochem Behav* **23**: 1029-1036.

Zimmer A, Zimmer AM, Hohmann AG, Herkenham M, Bonner TI (1999). Increased mortality, hypoactivity, and hypoalgesia in cannabinoid CB1 receptor knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 5780-5785.

Figure Legends

Fig. 1 Food self-administration in CB1 knockout (KO) and wild-type mice (WT).

(a) Average of the number of nose-pokes in both the active and the inactive holes made in the three consecutive sessions (1 hour each) required to achieve the acquisition criteria in FR1 schedule of reinforcement. **WT mice required 6.5 ± 0.81 days to achieve this criteria, whereas KO mice required 10.33 ± 1.91 days.** (b) Breaking point achieved in PR schedule. Data are expressed as mean \pm SEM (n = 8 per group). **★★** $P < 0.01$ comparison between holes (one-way ANOVA).

Fig. 2 Water self-administration in CB1 knockout (KO) and wild-type mice (WT).

(a) Average of the number of nose-pokes in both the active and the inactive holes made in the three consecutive sessions (1 hour each) required to achieve the acquisition criteria in FR1 schedule of reinforcement. **WT mice required 6.14 ± 0.99 days to achieve this criteria, whereas KO mice required 5.00 ± 0.71 days.** (b) Breaking point achieved in PR schedule. Data are expressed as mean \pm SEM (n = 7-8 per group). **★★** $P < 0.01$ comparison between holes (one-way ANOVA).

Fig. 3 Acquisition of cocaine self-administration in CB1 knockout (KO) and wild-type mice (WT).

Number of nose-pokes in both the active hole and the inactive holes in 1 hour session at (a) 0.32 mg/kg/infusion during 7 days, (b) 1 mg/kg/infusion during 10 days and (c) 3.2 mg/kg/infusion during 10 days. Data are expressed as mean \pm SEM (n = 7-13 per group). **★** $P < 0.05$; **★★** $P < 0.01$ comparison between either holes (one-way ANOVA).

Fig. 4 Cocaine self-administration (1 mg/kg/infusion) in CB1 knockout (KO) and wild-type mice (WT). (a) Average of the number of nose-pokes in both the active and the inactive holes made in the three consecutive sessions (1 hour each) required to achieve the acquisition criteria in FR1 schedule of reinforcement. (b) Breaking point achieved in PR schedule. Data are expressed as mean \pm SEM (n = 8-9 per group). ★ $P < 0.05$; ★★ $P < 0.01$ comparison between either holes or genotypes (one-way ANOVA).

Fig. 5 Cocaine dose-response curve in CB1 knockout and wild-type mice. Number of infusions during the two-hour self-administration session performed at different doses of cocaine. Data are expressed as mean \pm SEM (n = 8 per group). ★★ $P < 0.01$ comparison between genotypes (one-way ANOVA).

Fig. 6 Effects of SR141716A (0.3, 1 and 3 mg/kg, i.p.) on the breaking points achieved under PR schedule. Data are expressed as mean \pm SEM (n = 6). ★ $P < 0.05$; ★★ $P < 0.01$ comparison with vehicle treatment (Fisher post-hoc test).

Fig. 7 (a) Representative coronal section (20 μ m) of the mouse brain stained with Cresyl Violet illustrating the placement of the probe in the nucleus accumbens (bregma + 1.34 mm). (b) Diagram showing among bregma + 1.78 and + 1.34 mm the placement of the probes in all the mice included in the experiment.

Fig. 8 Effects of cocaine (20 mg/kg, i.p.) and saline on DA concentrations in dialysates obtained by *in vivo* microdialysis from the NAc of either CB1 cannabinoid receptor knockout and wild-type mice. Arrow indicates cocaine or saline administration at time

Olga Valverde

0. Dialysate samples were taken every 15 min during 1 h before, and 3 h following injection. ○ cocaine-treated wild-type mice; ● cocaine-treated knockout mice; △ saline-treated wild-type mice; ▲ saline-treated knockout mice. All values are expressed as mean \pm S.E.M. (n = 4-5 per group).

Table 1. Three-way ANOVA of cocaine self-administration time-course at different training doses.

	0.32 mg/kg/infusion		1 mg/kg/infusion		3.2 mg/kg/infusion	
	<i>F</i> -value	<i>p</i> -value	<i>F</i> -value	<i>p</i> -value	<i>F</i> -value	<i>p</i> -value
Day	$F_{(6,222)} = 7.078$	0.001	$F_{(9,252)} = 5.164$	0.001	$F_{(9,216)} = 8.303$	0.001
Hole	$F_{(1,37)} = 59.22$	n.s.	$F_{(1,28)} = 16.161$	0.001	$F_{(1,24)} = 33.452$	0.001
Genotype	$F_{(1,37)} = 9.48$	n.s.	$F_{(1,28)} = 13.336$	0.01	$F_{(1,24)} = 19.469$	0.001
DxH	$F_{(6,222)} = 0.233$	n.s.	$F_{(9,252)} = 2.107$	0.05	$F_{(9,216)} = 4.365$	0.001
DxG	$F_{(6,222)} = 0.535$	n.s.	$F_{(9,252)} = 1.743$	n.s.	$F_{(9,216)} = 0.476$	n.s.
HxG	$F_{(1,37)} = 0.97$	0.05	$F_{(1,28)} = 4.924$	0.05	$F_{(1,24)} = 5.547$	0.05
DxHxG	$F_{(6,222)} = 1.309$	n.s.	$F_{(9,252)} = 0.681$	n.s.	$F_{(9,216)} = 1.924$	0.05

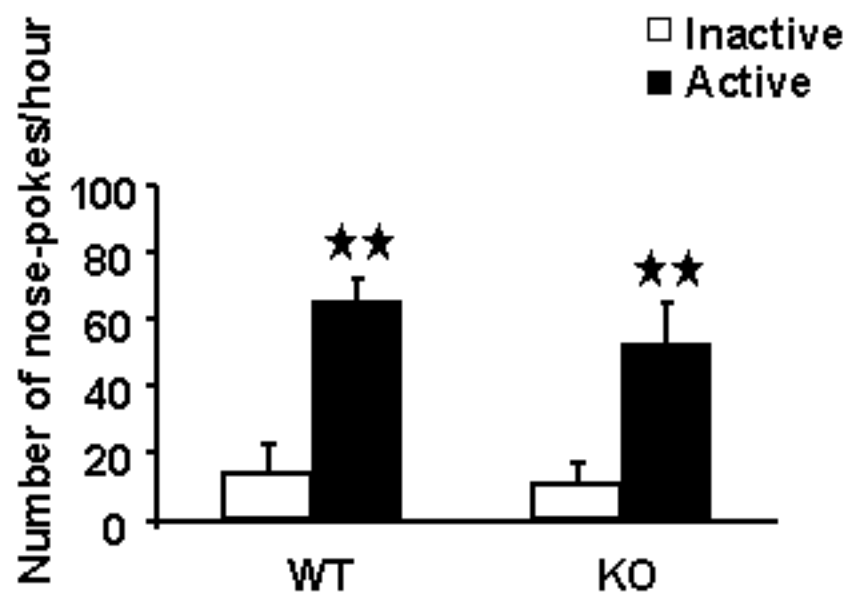
Three-way ANOVA repeated measures with hole (H) and genotype (G) as between subject factors and day (D) as within subject factor. See Materials and Methods for details.

Table 1. Three-way ANOVA of cocaine self-administration time-course at different training doses.

	0.32 mg/kg/infusion		1 mg/kg/infusion		3.2 mg/kg/infusion	
	<i>F</i> -value	<i>p</i> -value	<i>F</i> -value	<i>p</i> -value	<i>F</i> -value	<i>p</i> -value
Day	$F_{(6,222)} = 7.078$	0.001	$F_{(9,252)} = 5.164$	0.001	$F_{(9,216)} = 8.303$	0.001
Hole	$F_{(1,37)} = 59.22$	n.s.	$F_{(1,28)} = 16.161$	0.001	$F_{(1,24)} = 33.452$	0.001
Genotype	$F_{(1,37)} = 9.48$	n.s.	$F_{(1,28)} = 13.336$	0.01	$F_{(1,24)} = 19.469$	0.001
DxH	$F_{(6,222)} = 0.233$	n.s.	$F_{(9,252)} = 2.107$	0.05	$F_{(9,216)} = 4.365$	0.001
DxG	$F_{(6,222)} = 0.535$	n.s.	$F_{(9,252)} = 1.743$	n.s.	$F_{(9,216)} = 0.476$	n.s.
HxG	$F_{(1,37)} = 0.97$	0.05	$F_{(1,28)} = 4.924$	0.05	$F_{(1,24)} = 5.547$	0.05
DxHxG	$F_{(6,222)} = 1.309$	n.s.	$F_{(9,252)} = 0.681$	n.s.	$F_{(9,216)} = 1.924$	0.05

Three-way ANOVA repeated measures with hole (H) and genotype (G) as between subject factors and day (D) as within subject factor. See Materials and Methods for details.

a



b

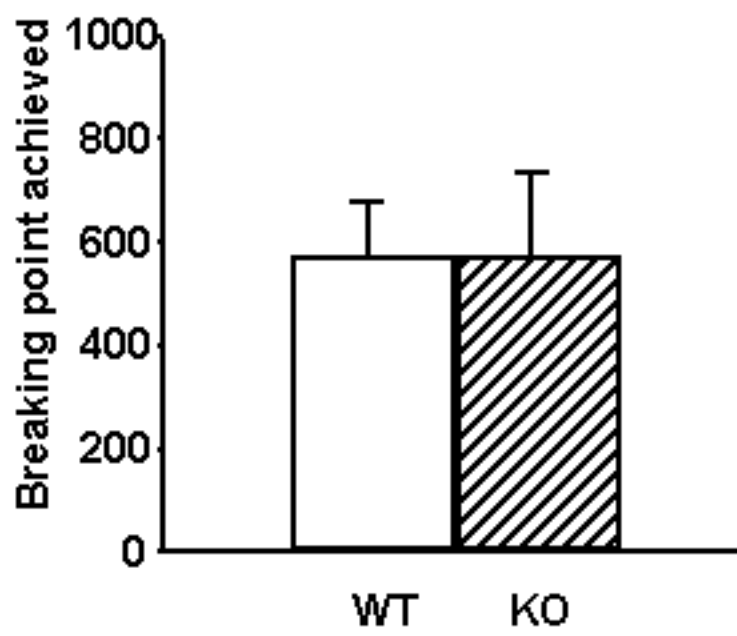
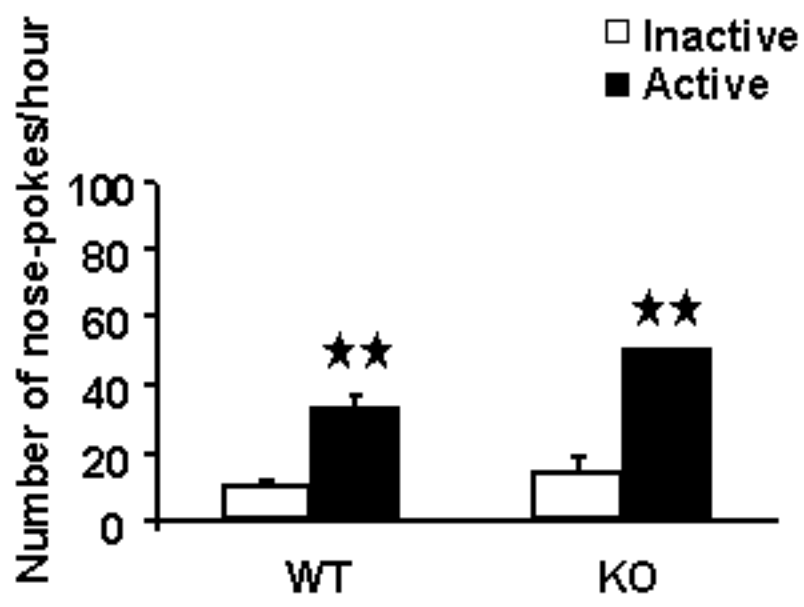


Fig. 1 Soria et al.

a



b

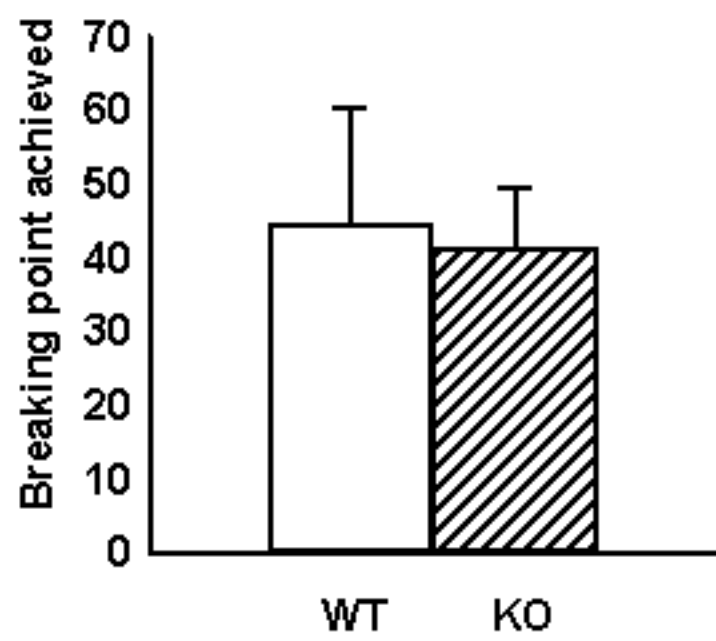
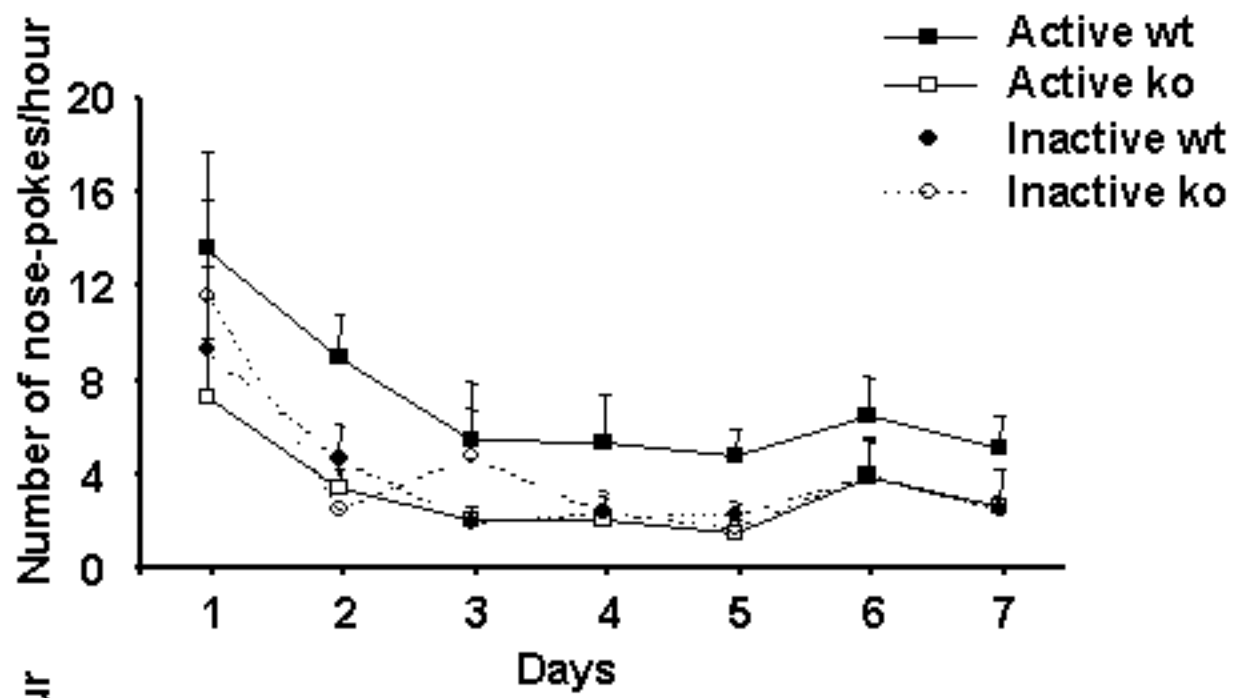
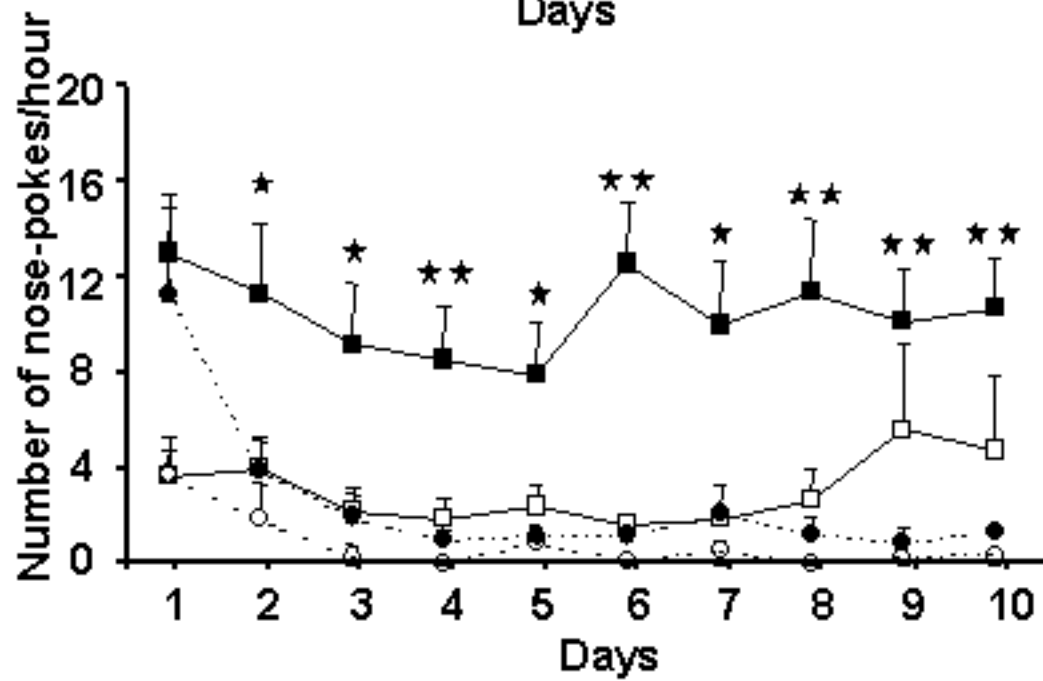


Fig. 2 Soria et al.

a



b



c

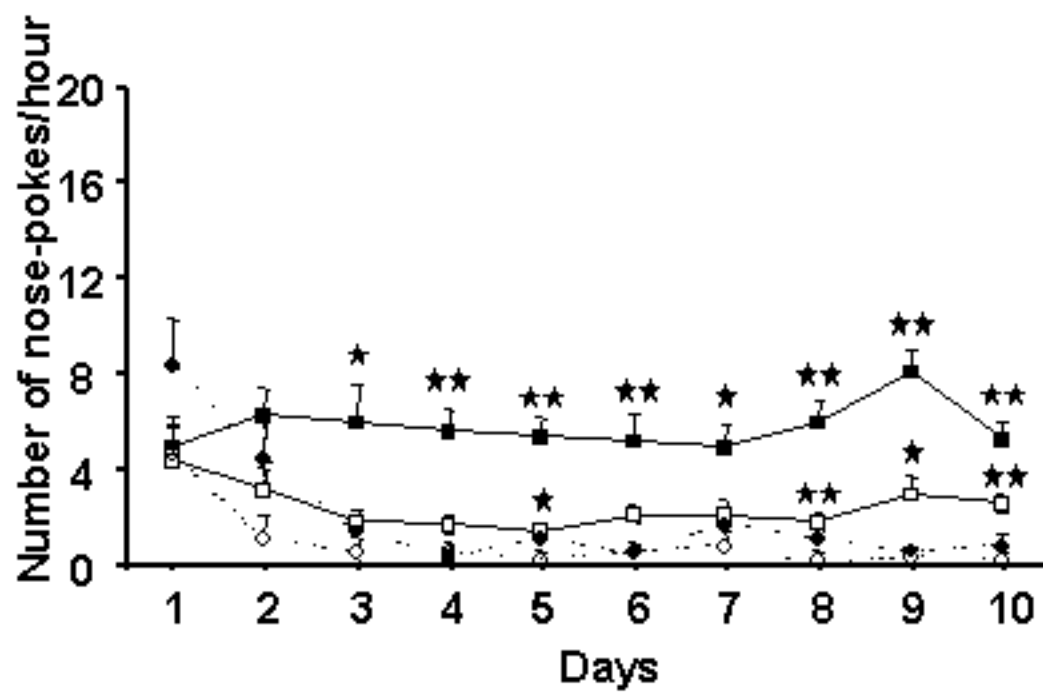
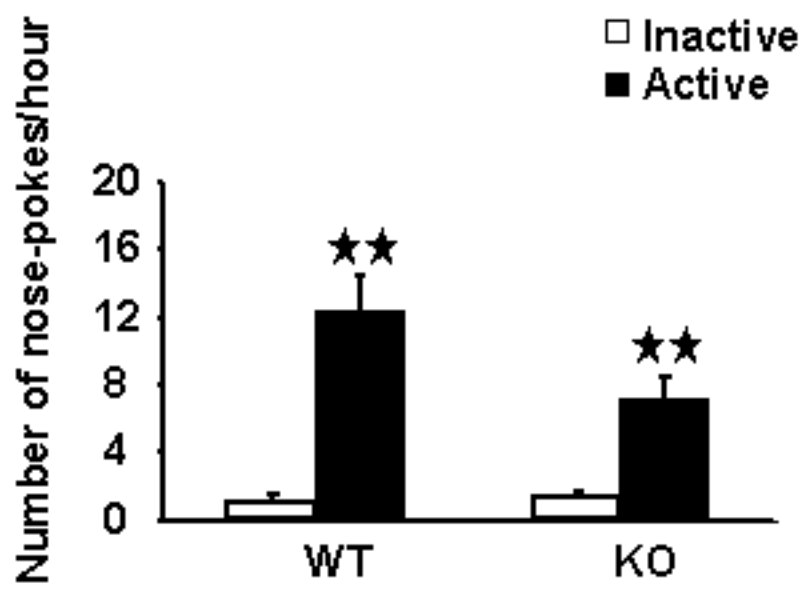


Fig. 3 Soria et al.

a



b

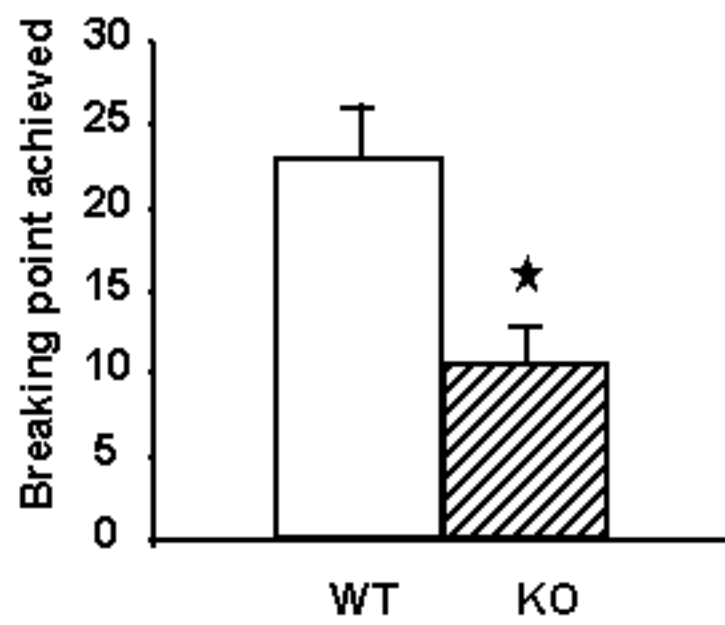


Fig. 4 Soria et al.

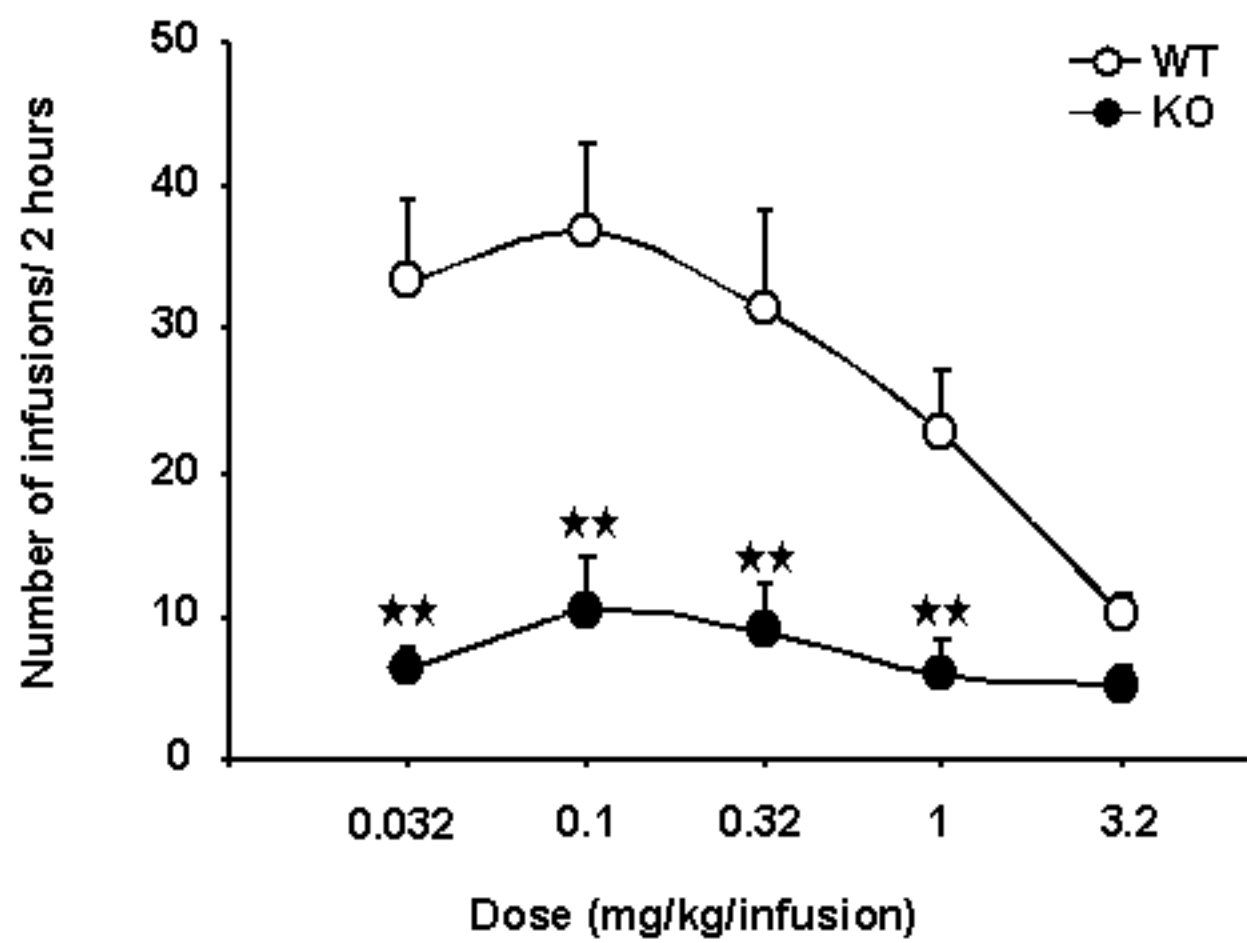


Fig. 5 Soria et al.

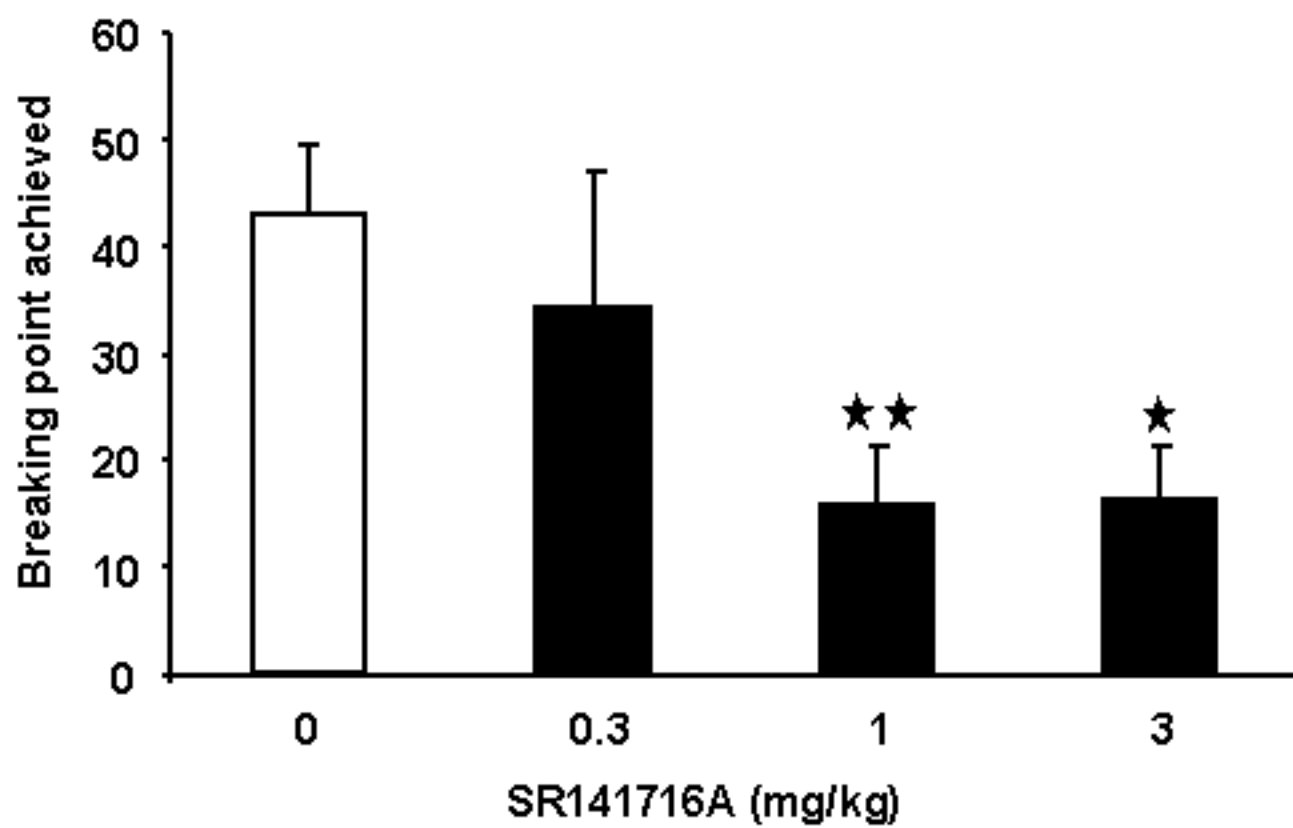
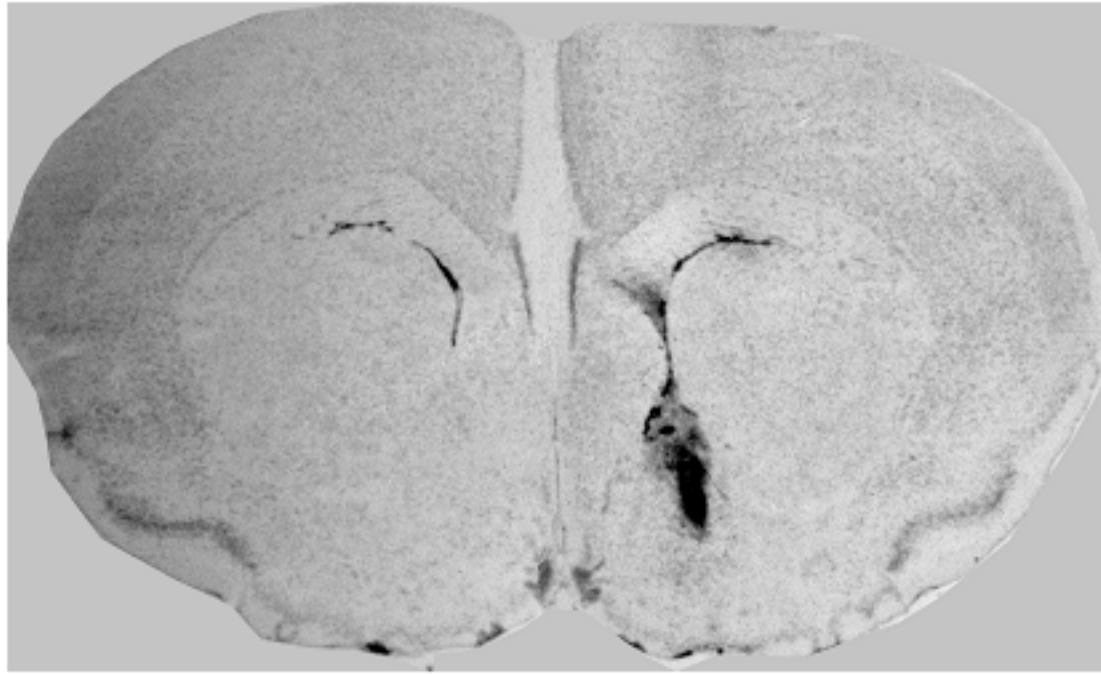


Fig. 6 Soria et al.

a



b

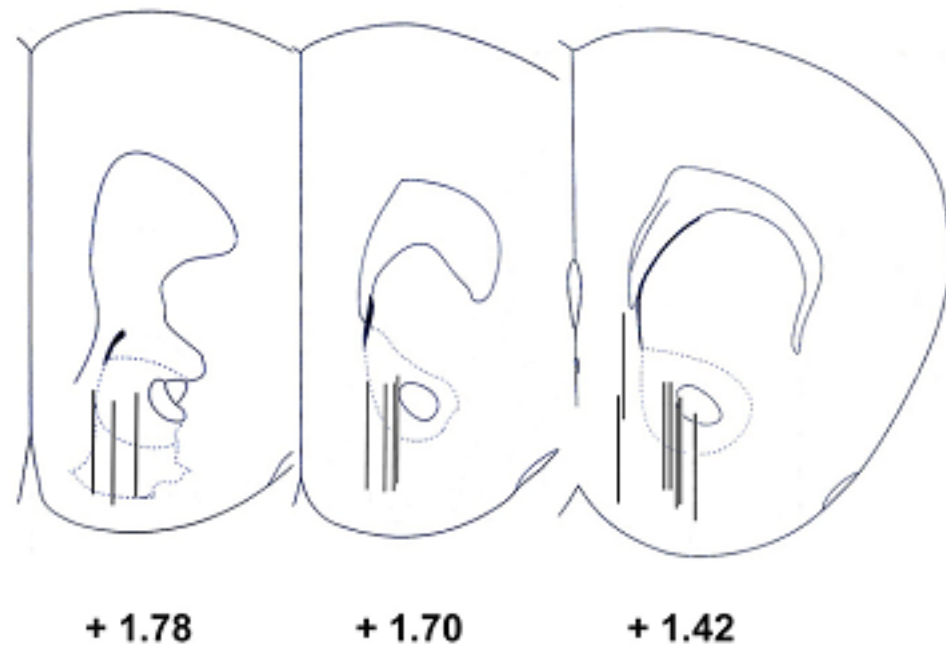


Fig. 7 Soria et al.

Dopamine

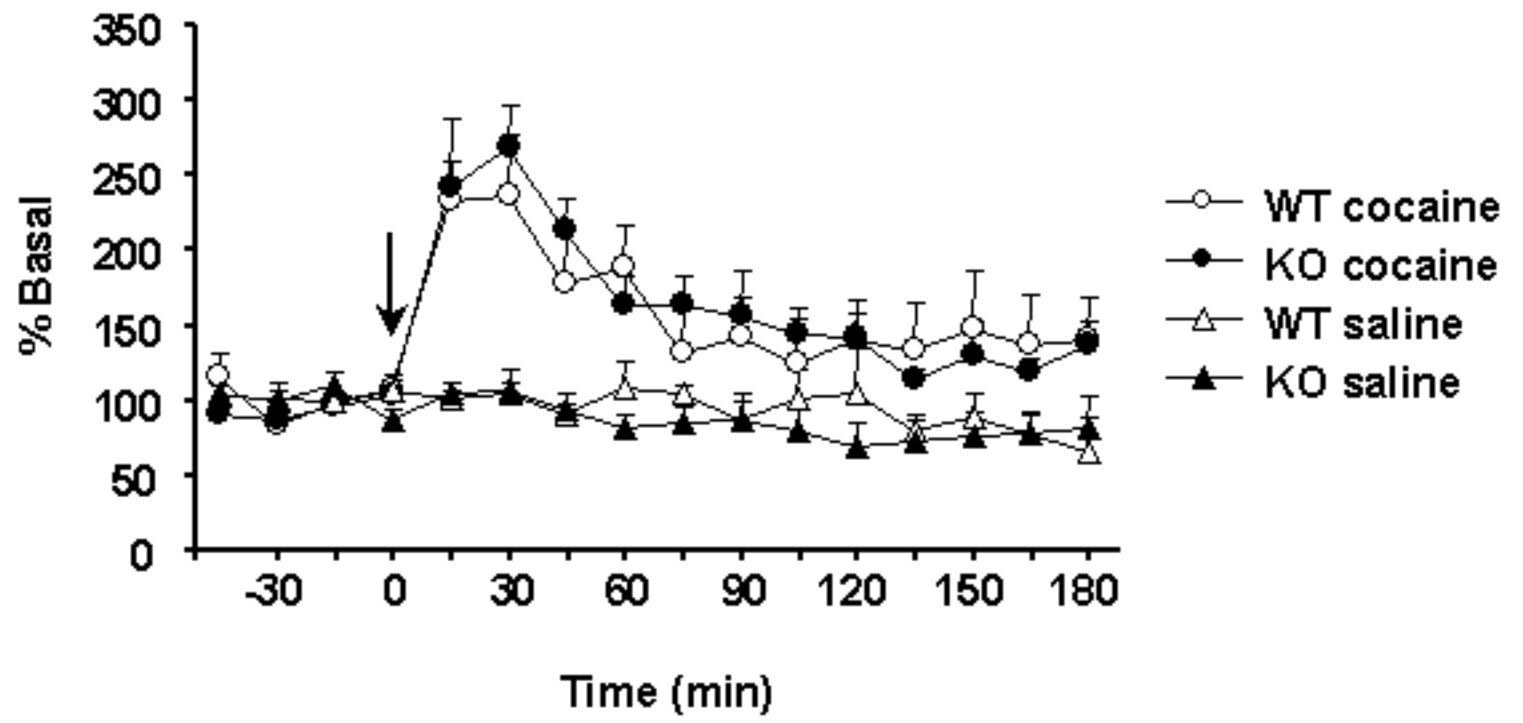


Fig. 8 Soria et al.

Artículo 2

The Lack of A(2A) Adenosine Receptors Diminishes the Reinforcing Efficacy of Cocaine. Soria G, Castañé A, Ledent C, Parmentier M, Maldonado R, Valverde O. 2005 *Neuropsychopharmacology*. 31(5):978-87.

OBJETIVOS

- Estudiar la participación de los receptores de adenosina A2A en las propiedades adictivas de la cocaína. Para ello se evaluaron diferentes respuestas comportamentales inducidas por cocaína en animales deficientes en el receptor A2A knockout y wild-type.
- Evaluar los efectos agudos de la cocaína sobre la actividad locomotora y la sensibilización a estos efectos tras un tratamiento crónico.
- Investigar el efecto reforzante de la cocaína en un paradigma de condicionamiento espacial y de autoadministración intravenosa.

RESULTADOS

- Los animales deficientes en el receptor de adenosina A2A fueron capaces de adquirir y mantener una conducta operante mantenida por infusiones intravenosas de cocaína, pero el consumo de la misma fue significativamente menor que el de los animales wild-type.
- El máximo esfuerzo para obtener una infusión de cocaína realizado por los animales A2A knockout fue significativamente menor en comparación con el grupo wild-type.
- La curva dosis respuesta de cocaína en los animales A2A knockout mostró una desviación vertical respecto a la de los animales wild-type.
- La sensibilización a los efectos locomotores y el condicionamiento espacial producidos por cocaína fueron similares en los animales wild-type y A2A knockout.

CONCLUSIÓN

- La eficacia reforzante de la cocaína está regulada por los receptores de adenosina A2A participando de esta manera en las propiedades adictivas de dicha droga.

- Los sustratos neurobiológicos que regulan la sensibilización de los efectos locomotores de la cocaína no son idénticos a los que regulan sus propiedades reforzantes en un paradigma de condicionamiento operante.

The lack of A_{2A} adenosine receptors diminishes the reinforcing efficacy of cocaine

Guadalupe Soria¹, Anna Castañé¹, Catherine Ledent², Marc Parmentier², Rafael Maldonado¹ and Olga Valverde^{1#}

To whom correspondence should be addressed: ovalverde@imim.es

¹ Laboratori de Neurofarmacologia, Departament de Ciències Experimentals i de la Salut, Universitat Pompeu Fabra, C/Doctor Aiguader 80, 08003 Barcelona, Spain

² IRIBHM, Université Libre de Bruxelles, N-1070 Bruxelles, Belgium

Abstract

Adenosine is an endogenous purine nucleoside which acts as a neuromodulator in the central nervous system. A_{2A} adenosine and D_2 dopamine receptors are co-localized in the same neurons in discrete brain areas, and the dopaminergic transmission plays a crucial role in the addictive properties of drugs of abuse, such as cocaine. In the present study, we have investigated the specific role of A_{2A} adenosine receptors in cocaine-induced behavioral responses related to its addictive properties. For this purpose, we have evaluated the acute locomotor effects produced by cocaine and the development of locomotor sensitization by repeated cocaine administration. In addition, we have also examined cocaine acute rewarding properties by using the conditioned place preference. Finally, we used the intravenous drug self-administration paradigm to investigate the acquisition of an operant response maintained by cocaine self-administration and the reinforcing efficacy of the drug in these knockout animals. Acute cocaine induced a similar increase of locomotor activity in mice lacking A_{2A} adenosine receptors and wild-type littermates. Cocaine-induced locomotor sensitization and conditioned place preference were also maintained in A_{2A} knockout mice. Nevertheless, these knockout mice showed a lower rate of cocaine self-administration than wild-type mice in both fixed ratio 1 and 3 schedules of reinforcement. Moreover, a reduction in the maximal effort to obtain a cocaine infusion was found in A_{2A} knockout mice under a progressive ratio schedule. In addition, a vertical-shift of the cocaine dose-response curve was observed in mice lacking A_{2A} adenosine receptors in comparison with wild-type littermates. Our study demonstrates that A_{2A} adenosine receptors play an important role in cocaine addictive properties, and these receptors seem to be required to develop the addictive effects of this drug.

Olga Valverde

Keywords: mouse, knockout, cocaine reinforcement, self-administration, conditioned place preference, reward, sensitization, A_{2A} adenosine receptors.

Introduction

Adenosine is an endogenous purine nucleoside which acts as a neuromodulator in the central nervous system (CNS). The physiological effects of adenosine are produced through the activation of four receptor types: A₁, A_{2A}, A_{2B} and A₃. A_{2A} adenosine receptors are found at high concentrations in the olfactory tubercle, the striatum and the nucleus accumbens (Nac) (Moreau *et al*, 1999). In the striatum, A_{2A} adenosine receptors are particularly expressed in the GABAergic striatopallidal neurons where they are co-localized with D₂ dopamine receptors (Ferré *et al*, 1997). Adenosine regulates dopamine transmission through antagonistic interactions between adenosine A₁/dopamine D₁ receptors and adenosine A_{2A}/dopamine D₂ receptors (Franco *et al*, 2000). Dopaminergic transmission in the mesocorticolimbic system plays a crucial role in the modulation of reward related process (Koob, 1996; Di Chiara, 2002), as well as in the addictive properties of drugs of abuse.

There is evidence to support a role for adenosine in mediating different responses induced by several drugs of abuse such as opioids, cannabinoids and psychostimulants. Thus, adenosine agonists inhibit the expression of morphine withdrawal while adenosine antagonists increase the incidence of withdrawal signs (Kaplan and Sears, 1996; Salem and Hope, 1997). In agreement, mice lacking A_{2A} adenosine receptors showed an increased morphine withdrawal in comparison with wild-type mice (Berrendero *et al*, 2003). On the other hand, we have recently shown that A_{2A} knockout mice exhibited a significant reduction of THC-induced rewarding and aversive effects, as well as rimonabant-precipitated THC withdrawal syndrome (Soria *et al*, 2004). However, there are controversial results about the possible involvement of A_{2A} adenosine receptors in the reinforcing effects induced by psychostimulant drugs. It has been demonstrated that the A_{2A} receptor antagonist 3, 7-

dimethyl-1-propargylxanthine (DMPX) and the non selective adenosine antagonist caffeine decreased cocaine-induced-conditioned place preference in rats (Poleszak and Malec, 2002), and that the A_2 agonist 5'-N-ethylcarboxamido-adenosine (NECA) reduced cocaine self-administration in rats (Knapp *et al*, 2001). A role for adenosine in reinstatement of cocaine-seeking behavior has been also suggested since caffeine and CGS15943 reinstated this behavior (Weerts and Griffiths, 2003). In addition, the selective A_{2A} receptor agonist CGS21680 attenuated the rewarding impact of brain stimulation whereas the A_2 adenosine antagonist DMPX reversed the reward impairment produced by cocaine withdrawal (Baldo *et al*, 1999). Furthermore, CGS21680 also potentiated the discriminative-stimulus actions of cocaine as shown by the leftward shift of the cocaine dose-response curve (Justinova *et al*, 2003). Therefore, the specific role of A_{2A} adenosine receptors in the processes underlying cocaine addiction remains unclear.

The generation of A_{2A} receptor knockout mice with complete and specific inactivation of the A_{2A} receptor (Ledent *et al*, 1997) provides a useful genetic model to clarify the role of A_{2A} receptors on cocaine pharmacological responses *in vivo*. The aim of the present study was to investigate the specific role of A_{2A} adenosine receptors in cocaine-induced behavioral responses related to its addictive properties. For this purpose, we have evaluated the acute locomotor effects produced by cocaine and the development of locomotor sensitization by repeated cocaine administration. In addition, we have also examined cocaine acute rewarding properties by using the conditioned place preference. Finally, we used the intravenous drug self-administration paradigm in order to evaluate the acquisition of an operant response maintained by cocaine self-administration and the reinforcing efficacy of the drug in these knockout animals.

Materials and Methods

Animals

Mice lacking A_{2A} adenosine receptors were generated as previously reported (Ledent *et al*, 1997). In order to homogenize the genetic background of the mice, the first generation heterozygotes were bred for 30 generations on a CD1 background (Charles River, France) with selection for the mutant A_{2A} gene at each generation. The A_{2A} receptor knockout mice derived from the backcrossing of chimeric CD1-A_{2A} receptor knockout mice developed by Ledent *et al*, (1997) with wild-type CD1 females (Charles River, France). Beginning with the 30th generation of backcrossed mice, heterozygote-heterozygote matings of A_{2A} knockout mice produced wild-type and knockout littermates for subsequent experiments. Breeding couples were periodically renovated by crossing heterozygote mice with wild-type CD1 females (Charles River, France) in order to maintain a genetically diverse outbred background.

Fourteen weeks old A_{2A} knockout mice and wild-type littermates (30-35 g) were housed five per cage in temperature (21 ± 1°C) and humidity (55 ± 10%) controlled rooms, with a 12-h light/12-h dark cycle (light between 8:00 AM and 8:00 PM). For the self-administration study mice were exposed to a 12 hours light:dark reversed cycle (light on between 8:00 PM and 8:00 AM), and the experiments took place during the dark phase. Food and water were available *ad libitum* during all experiments except during the exposure to the different behavioural paradigms. Mice were handled for one week before starting the experiments.

Animal procedures were conducted in accordance with the guidelines of the European Communities Directive 86/609/EEC regulating animal research and approved by the local ethical committee (CEEA-IMAS-UPF). All experiments were performed under blind conditions.

Drugs

Cocaine hydrochloride was obtained from Ministerio Sanidad y Consumo (Spain) and dissolved in sterile 0.9 % physiological saline.

Locomotor effects induced by cocaine

Locomotor activity responses induced by an acute injection of cocaine (5, 10 and 20 mg/kg, i.p.) or vehicle were evaluated by using locomotor activity boxes (9 x 20 x 11 cm) (Imetronic, Bordeaux, France). The boxes were provided with two lines of 14 photocells each, one 2 cm above the floor to measure horizontal activity, and the other located 6 cm above the floor to measure vertical activity (rears), in a low luminosity environment (5 lux). Mice were habituated to the locomotor cages during 10 min for 3 consecutive days. On the day 4, mice were placed in the locomotor activity boxes immediately after cocaine (5, 10 and 20 mg/kg, i.p.) or vehicle injection, and their locomotor activity was recorded during 10 min. Locomotor activity was measured as number of beam breaks, and two different measures were evaluated: directional or ambulatory movements and small local movements.

“Context-specific” sensitization to the locomotor responses induced by chronic cocaine treatment. Mice treated with 10 mg/kg of cocaine or saline on the acute test, received chronically the same treatment during the following 12 days. These animals received cocaine (10 mg/kg, i.p.) or vehicle once daily and were then immediately confined into the locomotor activity boxes to record locomotion during 10 min. After finishing chronic cocaine administration on day 12, mice remained without any treatment from day 13 to 18. On day 19, animals received a challenge of cocaine (10 mg/kg, i.p.) or vehicle and locomotor activity was measured for 10 min in order to

evaluate the sensitization maintenance. On day 20, all the mice received a saline injection and locomotor activity was evaluated again for 10 min. As above, locomotor activity was measured as number of beam breaks, and two different measures were evaluated: directional or ambulatory movements and small local movements.

Cocaine-induced conditioned place preference

The acute rewarding properties of cocaine (5, 10 and 20 mg/kg, i.p.) were measured using a place conditioning paradigm. The apparatus consisted of two main square conditioning compartments (15 x 15 x 15 cm), with differences in visual and tactile cues, separated by a triangular central area (Maldonado *et al*, 1997). The light intensity within the conditioning chambers was 30 lux. During the pre-conditioning phase, drug-naive mice were placed in the middle of the central area and had free access to both compartments of the apparatus for 18 min. The time spent in each compartment was recorded by computerized monitoring software (Smart; Panlab, Barcelone, Spain). During the conditioning phase, mice received alternating injections of cocaine (5, 10 or 20 mg/kg) or vehicle and were immediately confined into one of the two conditioning compartments during 20 min. Three pairings were performed with cocaine and three pairings with vehicle on alternate days. Treatments were counterbalanced as closely as possible between compartments. Control animals received vehicle every day. The post-conditioning phase was conducted exactly as the pre-conditioning phase, i.e. free access to each compartment for 18 min. A score value was calculated for each mouse as the difference between times spent in the drug-paired compartment during the post-conditioning and pre-conditioning phases.

Cocaine maintained operant self-administration

Apparatus. The self-administration experiments were conducted in mouse operant chambers (Model ENV-307A-CT, Medical Associates, Georgia, VT, USA) equipped with two holes, one was selected as active hole for delivering the reinforcer and the other as inactive hole. Nose-poking on the active hole resulted in a reinforcer (cocaine infusion) while nose-poking on the inactive hole had no consequences. The chambers were housed in sound- and light-attenuated boxes equipped with fans to provide ventilation and white noise. A stimulus light, located above the active hole, was paired contingently with the delivery of the reinforcer.

Surgery for drug self-administration study. Mice were anaesthetized under isoflurane anaesthesia (1.5-2.0 %) and then, implanted with indwelling i.v. silastic catheters as previously described (Caine *et al*, 1999) with minor modifications. Briefly, a 6 cm length of silastic tubing (0.3 mm inner diameter, 0.6 mm outer diameter) (Silastic®, Dow Corning, Houdeng-Goegnies, Belgium) was fitted to a 22 gauge steel cannula (Semat, Herts, England) that was bent at a right angle and then embedded in a cement disk (Dentalon Plus, Heraeus Kulzer, Germany) with an underlying nylon mesh. The catheter tubing was inserted 1.3 cm into the right jugular vein and anchored with suture. The remaining tubing run subcutaneously to the cannula, which exited at the midscapular region. All incisions were sutured and coated with antibiotic ointment (Bactroban, GlaxoSmithKline, Spain). After surgery, animals were allowed to recover for 3 days prior to initiation of self-administration sessions. The catheter was flushed daily with a saline solution containing heparin (30 UI/mL) in order to maintain its patency. The patency of intravenous catheters was evaluated periodically (approximately every 6 days) and whenever drug self-administration behavior appeared to deviate dramatically from that observed previously, by the infusion of 0.1 ml of

tiobarbital (5mg/ml) through the catheter. If prominent signs of anesthesia were not apparent within 3 sec of the infusion, the mouse was removed from the experiment.

Drug self-administration procedure. Cocaine self-administration sessions were performed as previously described (Soria *et al*, 2005). Briefly, sessions started 3 days after surgery. Responding was maintained by cocaine (1 mg/kg per injection) delivered in 23.5 μ l over 2 sec. Cocaine was infused via a syringe that was mounted on a microinfusion pump (PHM-100A, Med-Associates, Georgia, VT, USA) and connected, via Tygon tubing (0.96 mm o.d., Portex Fine Bore Polythene Tubing, Portex Limited, Kent, England) to a single channel liquid swivel (375/25, Instech Laboratories, Plymouth Meeting, PA, USA) and to the mouse intravenous catheters. The swivel was mounted on a counter-balanced arm above the operant chamber. One hour daily self-administration sessions were conducted 6 days per week. The house light was on at the beginning of the session for 3 sec and off during the remaining time of the session. Each daily session started with a priming injection of the drug. First, mice were trained under a fixed ratio 1 (FR1) schedule of reinforcement. A 30 sec time-out period was established after each reinforcement. During this 30 sec period, the cue light was off and no reward was provided on the active hole. Responses on the inactive hole and all the responses during the 30 sec time-out period were also recorded. The session was terminated after 50 reinforcers were delivered or after 1 hour, whichever occurred first. The stimulus light signaled delivery of the reinforcer. The criteria for the acquisition was achieved when mice maintained a stable responding with less than 20% deviation from the mean of the total number of reinforcers earned in three consecutive sessions (80% of stability), with at least 75% responding on the active hole, and a minimum of 10 reinforcers per session. Once achieved the acquisition criteria, the reinforcement schedule was changed to fixed ratio 3 (FR3). The same criteria as above was used to

move mice from FR3 to a progressive ratio (PR) schedule in which the response requirement to earn an injection escalate according to the following serie: 1 - 2 - 3 - 5 - 12 - 18 - 27 - 40 - 60 - 90 - 135 - 200 - 300 - 450 - 675 - 1000. The PR session lasted for 2 hours or until mice did not complete the ratio for delivery of one reinforcer within 1 hour, and was performed only once. The breaking point to extinguish self-administration behavior was determined in each animal. After each session, mice were returned to their home-cages.

A cocaine dose response curve was performed in new group of naive animals which were operated and trained to self-administer cocaine (1 mg/kg/infusion) under a FR1 schedule of reinforcement on the same conditions as described before. After acquisition (same criteria as above), self-administration of various doses of cocaine (0.032, 0.1, 0.32, 1, 3.2 mg/kg/infusion) was tested during 2 hours using a Latin square design: a single dose was presented each session, and the order of presentation was counterbalanced between mice.

Statistical analysis

Acute effects of cocaine administration and cocaine-induced conditioned place preference scores were compared by using two-way ANOVA (genotype and treatment as factors of variation) between subjects, followed by one-way ANOVA and Tukey post-hoc test when required. Data of sensitization study were compared by using three-way ANOVA (genotype and treatment as between factors and day as within-group factor of variation). Tukey post-hoc test were made when required. For cocaine maintained operant responding, two-way ANOVA was calculated on the mean of nose-pokes performed during the last 3 days required to reach the stability criteria, with hole (active vs inactive) and genotype (knockout vs wild-type) as factors of variation. This

statistical analysis was performed for FR1 and FR3 schedules of reinforcement in cocaine operant responding experiments. One-way ANOVA and Dunnet post-hoc test were made when required. The breaking point values obtained on the PR schedule for cocaine self-administration were compared by calculating Mann-Whitney U test between genotypes. For the cocaine dose-response curve, the number of infusions was compared by repeated measures two-way ANOVA (dose as within subject factor and genotype as between subject factor). Subsequent one-way ANOVA were made to calculate differences between genotypes at each dose. Additionally, one-way ANOVA within subjects was performed to discard a day effect for the Latin square design in the dose-response curve. Differences were considered significant if the probability of error was less than 5%.

Results

Acute locomotor effects induced by cocaine

On days 1, 2 and 3, animals were exposed to the locomotor activity boxes in order to be habituated to the test environment (data not shown). **Acute cocaine administration (5, 10 and 20 mg/kg) increased ambulatory movements in a dose-dependent manner in both genotypes, as shown in figure 1a. Two-way ANOVA and subsequent one-way ANOVA are shown in table 1. Post-hoc analysis revealed a significant increase in locomotor activity in cocaine-treated wild-type mice at the doses of 10 ($p < 0.01$) and 20 mg/kg ($p < 0.01$) compared to saline-treated mice. Similarly, cocaine-treated knockout mice showed a significant increase in locomotor activity at the doses of 10 ($p < 0.05$) and 20 mg/kg ($p < 0.01$) compared to saline-treated mice (Figure 1a).**

Acute cocaine administration (5, 10 and 20 mg/kg) also increased local small movements in a dose-dependent manner in both genotypes, as shown in figure 1b. Two-way ANOVA and subsequent one-way ANOVA are shown in table 1. Post-hoc analysis revealed a significant increase in local small movements in cocaine-treated wild-type mice at the doses of 10 ($p < 0.01$) and 20 mg/kg ($p < 0.01$) compared to saline-treated animals. Similarly, cocaine-treated knockout mice increased local small movements at the doses of 5 ($p < 0.05$) and 10 mg/kg ($p < 0.01$) compared to saline-treated animals (Figure 1b).

Sensitization to the locomotor responses induced by chronic cocaine treatment

Chronic cocaine treatment induced a sensitization to its locomotor effects in both genotypes as shown in figure 2a. Three-way ANOVA is shown in Table 2. Subsequent post-hoc analysis showed significant differences between day 1 and days 19 ($p = 0.05$)

and 20 ($p < 0.05$) in cocaine-treated wild-type mice. Significant differences were also observed between day 1 and day 19 ($p = 0.05$) in cocaine-treated knockout mice (Figure 2a).

Three-way ANOVA calculated for small local movements is shown in Table 2. Subsequent post-hoc analysis showed significant differences between day 1 and 20 ($p < 0.01$) in cocaine-treated wild-type mice. (Figure 2b).

Cocaine-induced conditioned place preference

Acute rewarding responses induced by cocaine were investigated in A_{2A} knockout and wild-type mice using the place conditioning paradigm. A similar conditioned place preference was observed in wild-type and knockout mice treated with cocaine (5, 10 and 20 mg/kg) (Figure 3). Indeed, two-way ANOVA revealed a significant effect of cocaine treatment ($F [3.123] = 12.637$; $p < 0.01$), but not effect of genotype ($F [1.123] = 0.233$; n.s.) nor interaction between these two factors ($F [3.123] = 0.399$; n.s.). Subsequent one-way ANOVA calculated for each genotype to compare treatment effects in each dose showed significant effect in both wild-type ($F [3.64] = 5.553$; $p < 0.01$) and knockout ($F [3.64] = 7.081$; $p < 0.01$) mice. Post-hoc analysis revealed significant differences between saline- and cocaine-treated mice at doses of 5, 10 and 20 mg/kg in both genotypes ($p < 0.01$ for all the cases) (Figure 3).

Cocaine maintained operant self-administration

The effects of the A_{2A} receptor mutation on the reinforcing properties of cocaine were evaluated by using the operant self-administration procedure. Nose-poke behavior maintained by cocaine infusions (1 mg/kg/infusion) was acquired by both wild-type (86%) and A_{2A} knockout (76.9%) mice. Knockout mice reached the acquisition criteria

faster than wild-type mice (7.8 ± 0.88 days and 4.4 ± 0.57 days, respectively) ($F [1.13] = 10.601$; $p < 0.01$). Despite the fact that A_{2A} knockout mice showed a lower cocaine intake ($F [1.13] = 9.227$; $p < 0.01$), both genotypes maintained active nose-poke preference during the whole experiment, as shown in figure 4a. Thus, two-way ANOVA showed in FR1 a significant effect of nose-poke preference ($F [1.24] = 50.231$; $p < 0.01$), genotype ($F [1.24] = 4.692$; $p < 0.05$) and interaction between genotype and nose-poke ($F [1.24] = 12.481$; $p < 0.01$). Nose-poke responding by cocaine in FR3 schedule of reinforcement was maintained by both genotypes, with a clear preference for the active vs the inactive nose-poke, and no differences between genotypes in the time spent to reach the FR3 criteria ($F [1.13] = 0.038$; n.s.). However, cocaine intake was again reduced in knockouts in comparison with wild-type mice ($F [1.13] = 10.912$; $p < 0.01$). Two-way ANOVA showed a significant effect of nose-poke ($F [1.24] = 50.305$; $p < 0.01$), genotype ($F [1.24] = 10.925$; $p < 0.01$) and interaction between these two factors ($F [1.24] = 10.474$; $p < 0.01$). Subsequent one-way ANOVA revealed significant preference for the active vs the inactive nose-poke in wild-type during FR1 ($F [1.13] = 35.801$; $p < 0.01$) and FR3 ($F [1.13] = 32.203$; $p < 0.01$) schedules of reinforcement, and also in A_{2A} knockout mice during FR1 ($F [1.13] = 14.872$; $p < 0.01$) and FR3 ($F [1.13] = 21.643$; $p < 0.01$) schedules of reinforcement. The infusion pattern of the cocaine self-administration sessions was also evaluated (Figure 4b). **A regular and consistent pattern of response** was observed in both wild-type and A_{2A} knockout mice during the whole duration of the self-administration session, which excludes a possible random nose-poking behavior. In the case of PR schedule, the breaking point values were significantly reduced in mice lacking the A_{2A} adenosine receptor when compared to wild-type littermates (Mann-Whitney U test, $p < 0.01$) (Figure 4c). A limit of two hours was established to terminate the PR session in both wild-type and knockout mice. The

decreased breaking point values observed in knockout mice were not due to the relative short time period of the PR session since the analysis of infusion patterns revealed that most of the knockout mice stopped nose-poking before than wild-type animals (data not shown). Furthermore, 43% of knockout mice showed an inter-infusion interval longer than 1 hour while this pattern was not observed in any of wild-type mice.

As shown in Figure 5a, a bell shaped dose-response curve was obtained when different doses of cocaine were tested in wild-type and in A_{2A} knockout mice. Nevertheless, a vertical-shift of this dose-response curve was observed in the knockout group. Two-way ANOVA with repeated measures revealed a main effect of the dose ($F [4.40] = 11.552; p < 0.01$), genotype ($F [1.10] = 11.882; p < 0.01$), but no interaction between these two factors ($F [4.40] = 1.607; n.s.$). One-way ANOVA for genotype revealed significant differences at the doses of 0.032 ($F [1.11] = 9.012; p < 0.05$), 0.1 ($F [1.11] = 7.592; p < 0.05$) and 1 ($F [1.11] = 12.024; p < 0.01$). One-way ANOVA revealed no effect of the day in the Latin square design ($F [4.59] = 0.534; n.s.$). Figure 5b shows the total cocaine intake received when different doses were tested. Two-way ANOVA revealed main effects of genotype ($F [1.50] = 12.627; p < 0.01$), dose ($F [4.50] = 22.174; p < 0.01$), but no interaction between these two factors ($F [4.50] = 2.408; n.s.$). One-way ANOVA revealed significant differences between genotypes at the doses of 0.032 ($p < 0.01$), 0.1 ($p < 0.01$) and 1 mg/kg ($p < 0.01$).

Discussion

The present study demonstrates the involvement of A_{2A} adenosine receptors in the addictive properties of cocaine. Mice lacking A_{2A} adenosine receptors showed a decreased rate of self-administration and motivation for cocaine, as well as reduced efficacy of cocaine reinforcing effects. Nevertheless, the increased locomotor activity produced by an acute injection of cocaine, the development of locomotor sensitization by repeated cocaine administration and cocaine-induced conditioned place preference were maintained in these A_{2A} knockout mice.

Deletion of A_{2A} adenosine receptors did not modify acute effects induced by cocaine. Thus, acute cocaine (5, 10 and 20 mg/kg)-induced hyperlocomotion was similar in wild-type and knockout mice, suggesting that A_{2A} adenosine receptors do not mediate these acute effects of cocaine. Our data also confirm the hypolocomotor phenotype described in A_{2A} knockout mice (Ledent *et al*, 1997) since locomotor basal activity of knockout mice was decreased versus wild-type littermates. However, this hypolocomotion did not impair the acute effects induced by cocaine administration. On the other hand, a similar locomotor sensitization was observed when A_{2A} adenosine receptors knockout mice and wild-type littermates were chronically treated with cocaine (10 mg/kg). In contrast, other authors have shown that locomotor responses to acute cocaine administration were attenuated in mice lacking A_{2A} receptors (Chen *et al*, 2000). In addition, a recent study demonstrates that conditional A_{2A} knockout mice showed no sensitization to locomotor effects of amphetamine (Bastia *et al*, 2004). Although the discrepancies between these findings could be due to the different genetic background used to generate each line of A_{2A} knockout mice, C57Bl/6 vs CD1, the different experimental conditions employed in each study could probably better explain this divergence. Indeed, locomotor activity was measured during a longer period in the

previous studies (120-480 min) whereas a the 10 min period was used in the present work. Repeated drug exposure is known to induce sensitization to its behavioral stimulant effects (Koob, 1996; Vanderschuren and Kalivas, 2000). The mesocorticolimbic dopaminergic system has been proposed as the neural substrate underlying this phenomenon (Kalivas *et al*, 1992), which is also involved in the reinforcing properties of all drugs of abuse (Koob and LeMoal, 2001; Nestler, 2004). Locomotor sensitization has been proposed to reflect the increase of the expectation or “wanting” for drug reward produced by the repeated exposure to drugs of abuse and that would be the result of increasing the basic responsiveness of dopaminergic neurons to stimuli (Robinson and Berridge, 1993). The locomotor activity displayed by animals in a novel environment has been positively correlated with the sensitivity to both the locomotor and reinforcing effects of psychostimulants such as cocaine (Piazza *et al*, 1989; Hooks *et al*, 1991a, b). In the present study, A_{2A} knockout mice showed similar acute cocaine locomotor effects and cocaine-induced locomotor sensitization than wild-types, although cocaine self-administration behavior was different in both genotypes, suggesting separate neuronal substrates for these behavioral responses induced by cocaine.

Acute rewarding properties of cocaine were indirectly evaluated by using the place conditioning procedure. Mice lacking A_{2A} adenosine receptors showed similar conditioned place preference to different doses of cocaine (5, 10 and 20 mg/kg) than wild-type littermates. In agreement with this result, the amount of cocaine self-administered in the first session of the operant self-administration paradigm was similar in both wild-type (9.69 ± 1.70 mg/kg) and knockout mice (11.08 ± 2.03 mg/kg). Although acute rewarding effects are important to initiate the drug addictive process,

other factors are also needed to develop this complex behavior (Koob and LeMoal, 2001).

A_{2A} adenosine receptor knockout mice acquired an operant behavior maintained by intravenous cocaine infusions and showed a reliable cocaine self-administration. However, the cocaine intake under FR1 and FR3 schedules was significantly lower in A_{2A} knockout mice comparing with wild-type littermates (40%-50% approximately). This result is in agreement with the reduction in the maximal effort required to obtain a cocaine infusion in A_{2A} knockout mice under a PR schedule of reinforcement. In animal drug self-administration studies, response rates usually show an inverted U-shaped function of drug dose where rate of responding is inversely related to the injection dose (Meisch and Lemaire, 1993). In the present study, typical inverted U-shaped dose-response curves were obtained in both wild-type and A_{2A} knockout mice. The possibility that A_{2A} knockout mice would experience increased reinforcing effects of cocaine, and therefore a reduction in cocaine-self-administration, can be ruled out since knockout mice did not show a leftward shift in the dose-response curve. Indeed, the vertical shift obtained indicates a difference in the efficacy, but not in the potency of the reinforcing effects of cocaine. In agreement, A_{2A} adenosine knockout mice showed a decreased breaking point in the PR schedule and did not exhibit a higher sensitivity to cocaine-induced behavioral effects in the other models evaluated (locomotion, sensitization and CPP). There is evidence showing that vertical shifts in self-administration dose-response curve predict a drug-vulnerable phenotype predisposed to addiction (Piazza *et al*, 2000). Thus, it could be hypothesized that A_{2A} knockout mice represent a low-vulnerable phenotype to cocaine addiction and the lack of A_{2A} adenosine receptors could provide resistance against the addictive properties of cocaine. The lower reinforcing efficacy of cocaine found in A_{2A} adenosine knockout mice that

have acquired a stable cocaine self-administration behavior was not due to an impairment of the acute rewarding properties of cocaine since cocaine-induced conditioned place preference and the cocaine intake in the first session of the self-administration paradigm were not modified in these knockouts. Differences in conditioned place preference and self-administration results are not surprising since the behavior responses evaluated in these two paradigms are not equivalent. While conditioned place preference evaluates the expression of indirect reward, self-administration paradigm is used to directly study the reinforcing effects of a drug.

Adenosine and its receptors have been involved in learning and memory processes (de Mendonça and Ribeiro, 1997; Svenningsson *et al*, 1999; Hauber and Baireiss, 2001; Justinova *et al*, 2003). However, the lower rate of cocaine self-administration found in A_{2A} knockout mice does not appear to be a consequence of learning impairment since operant responding for food is maintained in these animals (Soria *et al*, 2004). In addition, A_{2A} adenosine receptor knockout mice achieved the FR1 acquisition criteria for cocaine self-administration faster than wild-type littermates (7.8 ± 0.88 days and 4.4 ± 0.57 days respectively). Moreover, the similar results obtained on cocaine-induced conditioned place preference in both genotypes also support a normal learning and memory response in these knockout mice.

Dopamine D₂-like receptors are known to be particularly important in mediating the abuse-related effects of cocaine (Caine *et al*, 2002). Adenosine A_{2A} receptors are co-localized with dopamine D₂ receptors in striatopallidal GABAergic neurons and stimulation of A_{2A} adenosine receptors decreases the affinity of D₂-dopamine receptors (Ferré *et al*, 1997). Our study do not show this antagonistic interaction since the reinforcing efficacy of cocaine was diminished in A_{2A} knockout mice. However, other indirect interactions between A_{2A} and D₂ receptors have been also reported at

intracellular levels, which may account to explain our results. DARPP-32, a downstream effector molecule of D₂-like receptors, has been reported to play an important role in mediating the pharmacological effects of a variety of drugs of abuse (Nairn *et al*, 2004). In this sense, mice lacking DARPP-32 showed attenuated conditioned place preference to cocaine without involving alteration of dopamine release or reuptake (Zachariou *et al*, 2002). DARPP-32 phosphorylation could also be directly regulated by A_{2A} adenosine receptors (Svenningsson *et al*, 2004). Dopamine D1 receptors are also involved in cocaine effects (Hummel and Unterwald, 2002). In this sense, D1 and A_{2A} adenosine receptors have an additive effect on DARPP-32 phosphorylation (Svenningsson *et al*, 2004), raising the possibility that D1 receptors could compensate the consequences of the absence of A_{2A} on intracellular signals implicated in cocaine reward. On the other hand, extracellular signal-regulated kinase (ERK) pathway activation has been involved in synaptic plasticity related to long-term effects of psychoestimulants addiction (Valjent *et al*, 2000; 2003). More recently, the control of ERK pathway by DARPP-32 in the shell of the Nac has been demonstrated, suggesting a critical role for DARPP-32 in long-term effects of psychostimulants (Valjent *et al*, 2005). Interestingly, DARPP-32 has been reported to be altered in mice lacking A_{2A} adenosine receptors (Svenningsson *et al*, 2000). Therefore, a possible explanation for our findings could be that intracellular cascades downstream of dopamine release could be impaired in mice lacking A_{2A} adenosine receptors producing an alteration in the brain reward function. Thus, recent studies reported the existence of a synergy between A₂ and D₂ dopamine receptors in protein kinase A signaling mediated by $\beta\gamma$ dimmers of G-proteins (Yao *et al*, 2002, 2003). Therefore, this synergy might be absent in A_{2A} knockout mice, which would have a negative effect in drug reinforcement properties.

In conclusion, the present study demonstrates the important role played by A_{2A} adenosine receptors in cocaine addictive properties, as revealed by the decreased rate of self-administration and motivation for cocaine, and the lower efficacy of cocaine reinforcing effects found in mice lacking A_{2A} adenosine receptors. However, acute locomotor effects of cocaine, repeated cocaine-induced locomotor sensitization and conditioned place preference were preserved in these animals. These findings support the hypothesis that separate neuronal substrates mediate cocaine-induced locomotor effects and the self-administration in an operant behavior paradigm. Therefore, pharmacological manipulation of these receptors may be a possible target in the treatment of cocaine addiction.

Acknowledgements

This study was supported by grants from Spanish MCYT (SAF 2001/0745) (SAF 2004/568) and (GEN2003-20651-C06-04), HFSP (RG007/200-B), Redes del Instituto de Salud Carlos III (C03/06 and G03/005) and European Communities (NEWMOOD OJ2003/C164-05166). GS is a fellowship from Spanish MCYT. AC is a fellowship from DURSI (Generalitat de Catalunya).

References

- Baldo, B. A., Koob, G. F., & Markou, A. (1999). Role of adenosine A2 receptors in brain stimulation reward under baseline conditions and during cocaine withdrawal in rats. *J Neurosci* **19**, 11017-11026.
- Bastia, E., Xu, Y. H., Scibelli, A. C., Day, Y. J., Linden, J., Chen, J. F. & Schwarzschild, M. A. (2004). A crucial role for forebrain adenosine A(2A) receptors in amphetamine sensitization. *Neuropsychopharmacology*. doi:10.1038
- Berrendero, F., Castañe, A., Ledent, C., Parmentier, M., Maldonado, R., & Valverde, O. (2003). Increase of morphine withdrawal in mice lacking A2a receptors and no changes in CB1/A2a double knockout mice. *Eur J Neurosci* **17**, 315-324.
- Caine, S. B., Negus, S. S., & Mello, N. K. (1999). Method for training operant responding and evaluating cocaine self-administration behavior in mutant mice. *Psychopharmacology* **147**, 22-24.
- Caine, S. B., Negus, S. S., Mello, N. K., Patel, S., Bristow, L., Kulagowski, J., Vallone, D., Saiardi, A., & Borrelli, E. (2002). Role of dopamine D2-like receptors in cocaine self-administration: studies with D2 receptor mutant mice and novel D2 receptor antagonists. *J Neurosci* **22**, 2977-2988.
- Chen, J. F., Beilstein, M., Xu, Y. H., Turner, T. J., Moratalla, R., Standaert, D. G., Aloyo, V. J., Fink, J. S., & Schwarzschild, M. A. (2000). Selective attenuation of psychostimulant-induced behavioral responses in mice lacking A(2A) adenosine receptors. *Neuroscience* **2000** **97**, 195-204.
- de Mendonca, A. & Ribeiro, J. A. (1997). Adenosine and neuronal plasticity. *Life Sci* **60**, 245-251.

- Di Chiara, G. (2002). Nucleus accumbens shell and core dopamine: differential role in behavior and addiction. *Behav Brain Res* **137**, 75-114.
- Ferré, S. (1997). Adenosine-dopamine interactions in the ventral striatum. Implications for the treatment of schizophrenia. *Psychopharmacology* **133**, 107-120.
- Franco, R., Ferré, S., Agnati, L., Torvinen, M., Gines, S., Hillion, J., Casado, V., Lledo, P., Zoli, M., Lluís, C., & Fuxe, K. (2000). Evidence for adenosine/dopamine receptor interactions: indications for heteromerization. *Neuropsychopharmacology* **23**, S50-S59.
- Hauber, W. & Bareiss, A. (2001). Facilitative effects of an adenosine A1/A2 receptor blockade on spatial memory performance of rats: selective enhancement of reference memory retention during the light period. *Behav Brain Res* **118**, 43-52.
- Hooks, M. S., Jones, G. H., Smith, A. D., Neill, D. B., & Justice, J. B., Jr. (1991). Response to novelty predicts the locomotor and nucleus accumbens dopamine response to cocaine. *Synapse* **9**, 121-128.
- Hooks, M. S., Jones, G. H., Smith, A. D., Neill, D. B., & Justice, J. B., Jr. (1991). Individual differences in locomotor activity and sensitization. *Pharmacol Biochem Behav* **38**, 467-470.
- Hummel, M. & Unterwald, E. M. (2002). D1 dopamine receptor: a putative neurochemical and behavioral link to cocaine action. *J Cell Physiol* **191**, 17-27.
- Justinova, Z., Ferré, S., Segal, P. N., Antoniou, K., Solinas, M., Pappas, L. A., Highkin, J. L., Hockemeyer, J., Munzar, P., & Goldberg, S. R. (2003). Involvement of adenosine A1 and A2A receptors in the adenosinergic modulation of the

- discriminative-stimulus effects of cocaine and methamphetamine in rats. *J Pharmacol Exp Ther* **307**, 977-986.
- Kalivas, P. W., Striplin, C. D., Steketee, J. D., Klitenick, M. A., & Duffy, P. (1992). Cellular mechanisms of behavioral sensitization to drugs of abuse. *Ann N Y Acad Sci* **654**, 128-135.
- Kaplan, G. B. & Sears, M. T. (1996). Adenosine receptor agonists attenuate and adenosine receptor antagonists exacerbate opiate withdrawal signs. *Psychopharmacology* **123**, 64-70.
- Knapp, C. M., Foye, M. M., Cottam, N., Ciraulo, D. A., & Kornetsky, C. (2001). Adenosine agonists CGS 21680 and NECA inhibit the initiation of cocaine self-administration. *Pharmacol Biochem Behav* **68**, 797-803.
- Koob, G. F. & Le Moal, M. (2001). Drug addiction, dysregulation of reward, and allostasis. *Neuropsychopharmacology* **24**, 97-129.
- Koob, G. F. (1996). Hedonic valence, dopamine and motivation. *Mol Psychiatry* **1**, 186-189.
- Ledent, C., Vaugeois, J. M., Schiffmann, S. N., Pedrazzini, T., El Yacoubi, M., Vanderhaeghen, J. J., Costentin, J., Heath, J. K., Vassart, G., & Parmentier, M. (1997). Aggressiveness, hypoalgesia and high blood pressure in mice lacking the adenosine A2a receptor. *Nature* **388**, 674-678.
- Maldonado, R., Saiardi, A., Valverde, O., Samad, T. A., Roques, B. P., & Borrelli, E. (1997). Absence of opiate rewarding effects in mice lacking dopamine D2 receptors. *Nature* **388**, 586-589.

- Meisch R.A., Lemaire G.A. (1993): *Methods in Behavioral Pharmacology*. Ed. Haaren F., Elsevier Science Publishers B.V., pp 257–300.
- Moreau, J. L. & Huber, G. (1999). Central adenosine A(2A) receptors: an overview. *Brain Res Brain Res Rev* **31**, 65-82.
- Nairn, A. C., Svenningsson, P., Nishi, A., Fisone, G., Girault, J. A., & Greengard, P. (2004). The role of DARPP-32 in the actions of drugs of abuse. *Neuropharmacology* **47 Suppl 1**, 14-23.
- Nestler, E. J. (2004). Molecular mechanisms of drug addiction. *Neuropharmacology* **47 Suppl 1**, 24-32.
- Piazza, P. V., Deminiere, J. M., Le Moal, M., & Simon, H. (1989). Factors that predict individual vulnerability to amphetamine self-administration. *Science* **245**, 1511-1513.
- Piazza, P. V., Deroche-Gamonet, V., Rouge-Pont, F., & Le Moal, M. (2000). Vertical shifts in self-administration dose-response functions predict a drug-vulnerable phenotype predisposed to addiction. *J Neurosci* **20**, 4226-4232.
- Poleszak, E. & Malec, D. (2003). Effects of adenosine receptor agonists and antagonists in amphetamine-induced conditioned place preference test in rats. *Pol J Pharmacol* **55**, 319-326.
- Ribeiro, J. A., Sebastiao, A. M. & de Mendonca A. (2002). Adenosine receptors in the nervous system: pathophysiological implications. *Prog Neurobiol* **68**, 377-92.
- Robinson, T. E. & Berridge, K. C. (1993). The neural basis of drug craving: an incentive-sensitization theory of addiction. *Brain Res Brain Res Rev* **18**, 247-291.

- Salem, A. & Hope, W. (1997). Effect of adenosine receptor agonists and antagonists on the expression of opiate withdrawal in rats. *Pharmacol Biochem Behav* **57**, 671-679.
- Soria, G., Mendizábal, V., Touriño, C., Robledo, P., Maldonado, R. & Valverde, O. (2005). Lack of CB1 cannabinoid receptor impairs cocaine self-administration. *Neuropsychopharmacology* (In press).
- Soria, G., Castañé, A., Berrendero, F., Ledent, C., Parmentier, M., Maldonado, R., & Valverde, O. (2004). Adenosine A2A receptors are involved in physical dependence and place conditioning induced by THC. *Eur J Neurosci* **20**, 2203-2213.
- Svenningsson, P., Le Moine, C., Fisone, G., & Fredholm, B. B. (1999). Distribution, biochemistry and function of striatal adenosine A2A receptors. *Prog Neurobiol* **59**, 355-396.
- Svenningsson, P., Lindskog, M., Ledent, C., Parmentier, M., Greengard, P., Fredholm, B. B., & Fisone, G. (2000). Regulation of the phosphorylation of the dopamine- and cAMP-regulated phosphoprotein of 32 kDa in vivo by dopamine D1, dopamine D2, and adenosine A2A receptors. *Proc. Natl Acad Sci U S A* **97**, 1856-1860.
- Svenningsson, P., Nishi, A., Fisone, G., Girault, J. A., Nairn, A. C., & Greengard, P. (2004). DARPP-32: an integrator of neurotransmission. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **44**, 269-296.
- Vanderschuren, L.J. & Kalivas, P.W. (2000). Alterations in dopaminergic and glutamatergic transmission in the induction and expression of behavioral sensitization: a critical review of preclinical studies. *Psychopharmacology* **151**, 99-120.

- Valjent, E., Corvol, J.C., Pages, C., Besson, M.J., Maldonado, R. & Caboche, J. (2000). Involvement of the extracellular signal-regulated kinase cascade for cocaine-rewarding properties. *J Neurosci* **20**, 8701-8709.
- Valjent, E., Herve, D., Caboche, J. & Girault, J.A. (2003). Possible Role of the Extracellular Signal-Regulated Kinase (ERK) in Reward-Controlled Learning and Addiction. *Curr Neuropharmacol* **1**, 165-174.
- Valjent, E., Pascoli, V., Svenningsson, P., Paul, S., Enslen, H., Corvol, J.C., Stipanovich, A., Caboche, J., Lombroso, P.J., Nairn, A.C., Greengard, P., Herve, D. & Girault, J.A. (2005). From The Cover: Regulation of a protein phosphatase cascade allows convergent dopamine and glutamate signals to activate ERK in the striatum. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 491-496.
- Weerts, E.M. & Griffiths, R.R. (2003). The adenosine receptor antagonist CGS15943 reinstates cocaine-seeking behavior and maintains self-administration in baboons. *Psychopharmacology* **168**, 155-163
- Yao, L., Arolfo, M.P., Dohrman, D.P., Jiang, Z., Fan, P., Fuchs, S., Janak, P.H., Gordon, A.S. & Diamond I. (2002) betagamma Dimers mediate synergy of dopamine D2 and adenosine A2 receptor-stimulated PKA signaling and regulate ethanol consumption. *Cell* **109**, 733-43
- Yao, L., Fan, P., Jiang, Z., Mailliard, W.S., Gordon, A.S. & Diamond, I. (2003) Addicting drugs utilize a synergistic molecular mechanism in common requiring adenosine and Gi-beta gamma dimers. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 14379-84
- Zachariou, V., Benoit-Marand, M., Allen, P. B., Ingrassia, P., Fienberg, A. A., Gonon, F., Greengard, P., & Picciotto, M. R. (2002). Reduction of cocaine place preference

in mice lacking the protein phosphatase 1 inhibitors DARPP 32 or Inhibitor 1. *Biol Psychiatry* **51**, 612-620.

Figure legends

Figure 1. Acute locomotor effects induced by cocaine in A_{2A} knockout and wild-type mice. Mice were exposed to the locomotor activity boxes immediately after cocaine injection (0, 5, 10 and 20 mg/kg, i.p.). Measurements of (a) ambulatory movements and (b) local small movements were performed during 10 min. Data are expressed as mean \pm SEM of the percentage of increase versus last day of habituation (n = 16 for each group). White columns represent wild-type mice and black columns represent A_{2A} adenosine receptor knockout mice. Stars over the bars mean differences versus vehicle group. ★ $P < 0.05$; ★★ $P < 0.01$ (Tukey post-hoc test).

Figure 2. Locomotor sensitization to the effects induced by chronic cocaine administration in A_{2A} knockout and wild-type mice. Mice received chronic cocaine during 12 days and were exposed to the locomotor activity boxes immediately after the injection (10 mg/kg, i.p.). Mice remained without any treatment from day 13 to 18. On day 19, animals received a challenge of cocaine (10 mg/kg, i.p.) or vehicle and locomotor activity was measured in order to evaluate the sensitization maintenance. On day 20, all the mice received a saline injection and locomotor activity was evaluated again. Figure 2 shows locomotor activity on days 1, 12, 19 and 20. Measurements of (a) ambulatory movements and (b) local small movements were performed during 10 min. Data are expressed as mean \pm SEM of the percentage of increase versus last day of habituation (n = 15-16). White columns represent saline treated mice and black columns represent cocaine treated mice. ★ $P \leq 0.05$ (Tukey post-hoc test cocaine-treated group versus day 1).

Figure 3. Cocaine (5, 10 and 20 mg/kg, i.p.)-induced conditioned place preference in A_{2A} knockout and wild-type mice. Results are expressed as mean \pm SEM of the place preference score, calculated as the time spent in the drug-paired compartment on the test day minus the time spent in the same compartment on the pre-conditioning day. Wild-type (WT) vehicle (n = 25), knockout (KO) vehicle (n = 25), WT cocaine 5 mg/kg (n = 10), KO cocaine 5 mg/kg (n = 10), WT cocaine 10 mg/kg (n = 11), KO cocaine 10 mg/kg (n = 11), WT cocaine 20 mg/kg (n = 20), KO cocaine 20 mg/kg (n = 19). ★★ $P < 0.01$ versus vehicle (Dunnett test).

Figure 4. Cocaine self-administration (1 mg/kg/infusion) in A_{2A} knockout and wild-type mice. (a) Average of the number of nose-pokes in both the active and the inactive holes made in the three consecutive sessions (1 hour each) required to achieve the acquisition criteria in FR1 and FR3 schedule of reinforcement. (b) Patterns of cocaine self-administration in FR1 and FR3 schedules of reinforcement in A_{2A} knockout (KO) and wild-type (WT) mice. Each vertical line represents a cocaine infusion (1 mg/kg/infusion). (c) Breaking points achieved in PR schedule. Data are expressed as mean \pm SEM (n = 7 per group). ★ $P < 0.05$; ★★ $P < 0.01$ comparison between either holes (one-way ANOVA). ☆☆ $P < 0.01$ comparison between genotypes (one-way ANOVA).

Fig. 5 Cocaine self-administration (0.032, 0.1, 0.32, 1 and 3.2 mg/kg/infusion) dose-response curve in A_{2A} knockout and wild-type mice. (a) Number of infusions during the two-hour self-administration session performed at different doses of cocaine (see material and methods for details). (b) Cocaine intake (mg/kg) received per session in the

dose-response curve. Data are expressed as mean \pm SEM (n = 6 per group). ☆ $P < 0.05$;

☆☆ $P < 0.01$ comparison between genotypes (one-way ANOVA).

Table 1. Two-way and one-way ANOVAs for acute locomotor effects induced by cocaine in A_{2A} knockout mice (ambulatory movements and local small movements).

	Ambulatory movements		Local small movements	
	<i>F</i> -value	<i>P</i> -value	<i>F</i> -value	<i>P</i> -value
<i>Two-way ANOVA</i>				
Genotype (G)	$F_{1,108} = 1.412$	n.s.	$F_{1,107} = 6.127$	$P < 0.01$
Treatment (T)	$F_{3,108} = 19.122$	$P < 0.01$	$F_{3,107} = 10.024$	$P < 0.01$
G x T	$F_{1,108} = 0.567$	n.s.	$F_{3,107} = 1.984$	n.s.
<i>One-way ANOVA for treatment effect</i>				
Wild-type	$F_{3,52} = 11.070$	$P < 0.01$	$F_{3,51} = 6.824$	$P < 0.01$
Knockout	$F_{3,55} = 8.974$	$P < 0.01$	$F_{3,55} = 5.109$	$P < 0.01$

Two-way ANOVA with treatment and genotype as factors of variations, and subsequent one-way ANOVA for treatment effect in each genotype. See material and methods for details.

Table 2. Three-way ANOVA for locomotor effects of chronic cocaine treatment in A_{2A} knockout mice (ambulatory movements and local small movements).

	Ambulatory movements		Local small movements	
	<i>F</i> -value	<i>P</i> -value	<i>F</i> -value	<i>P</i> -value
Genotype (G)	$F_{1,48} = 2.915$	n.s.	$F_{1,48} = 11.051$	$P < 0.01$
Treatment (T)	$F_{1,48} = 53.635$	$P < 0.01$	$F_{1,48} = 28.075$	$P < 0.01$
Day (D)	$F_{4,192} = 27.406$	$P < 0.01$	$F_{4,192} = 15.247$	$P < 0.01$
G x T	$F_{1,48} = 0.317$	n.s.	$F_{1,48} = 0.518$	n.s.
G x D	$F_{3,48} = 0.774$	n.s.	$F_{4,192} = 1.219$	n.s.
T x D	$F_{4,192} = 29.167$	$P < 0.01$	$F_{4,192} = 26.787$	$P < 0.01$
G x T x D	$F_{4,192} = 0.341$	n.s.	$F_{4,192} = 1.243$	n.s.

Three-way ANOVA with treatment and genotype (between subjects) and day (within subjects) as factors of variations. See material and methods for details.

Table 1. Two-way and one-way ANOVAs for acute locomotor effects induced by cocaine in A_{2A} knockout mice (ambulatory movements and local small movements).

	Ambulatory movements		Local small movements	
	<i>F</i> -value	<i>P</i> -value	<i>F</i> -value	<i>P</i> -value
<i>Two-way ANOVA</i>				
Genotype (G)	$F_{1,108} = 1.412$	n.s.	$F_{1,107} = 6.127$	$P < 0.01$
Treatment (T)	$F_{3,108} = 19.122$	$P < 0.01$	$F_{3,107} = 10.024$	$P < 0.01$
G x T	$F_{1,108} = 0.567$	n.s.	$F_{3,107} = 1.984$	n.s.
<i>One-way ANOVA for treatment effect</i>				
Wild-type	$F_{3,52} = 11.070$	$P < 0.01$	$F_{3,51} = 6.824$	$P < 0.01$
Knockout	$F_{3,55} = 8.974$	$P < 0.01$	$F_{3,55} = 5.109$	$P < 0.01$

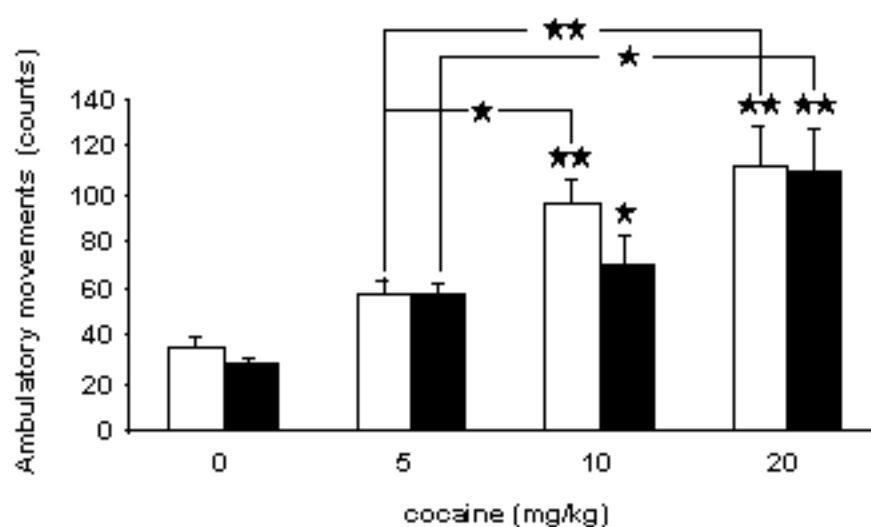
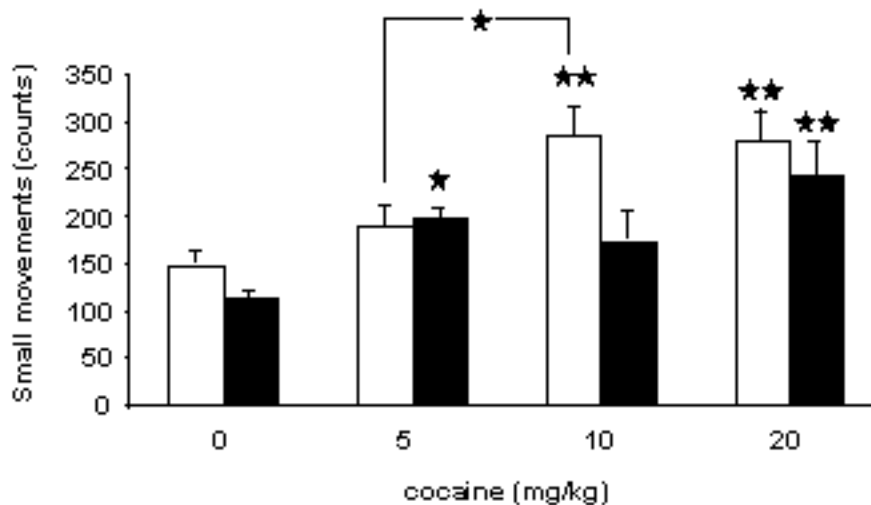
Two-way ANOVA with treatment and genotype as factors of variations, and subsequent one-way ANOVA for treatment effect in each genotype. See material and methods for details.

Table 2. Three-way ANOVA for locomotor effects of chronic cocaine treatment in A_{2A} knockout mice (ambulatory movements and local small movements).

Three-way ANOVA with treatment and genotype (between subjects) and day (within subjects) as factors of

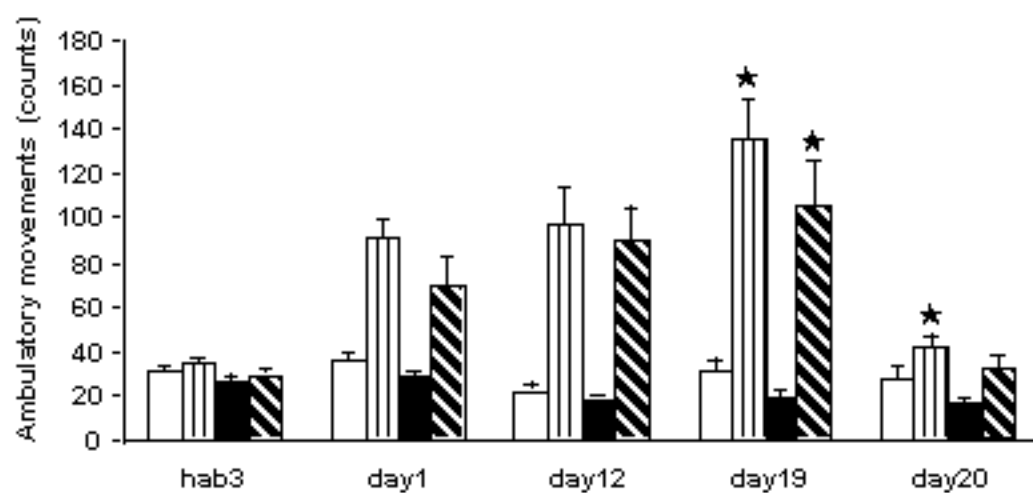
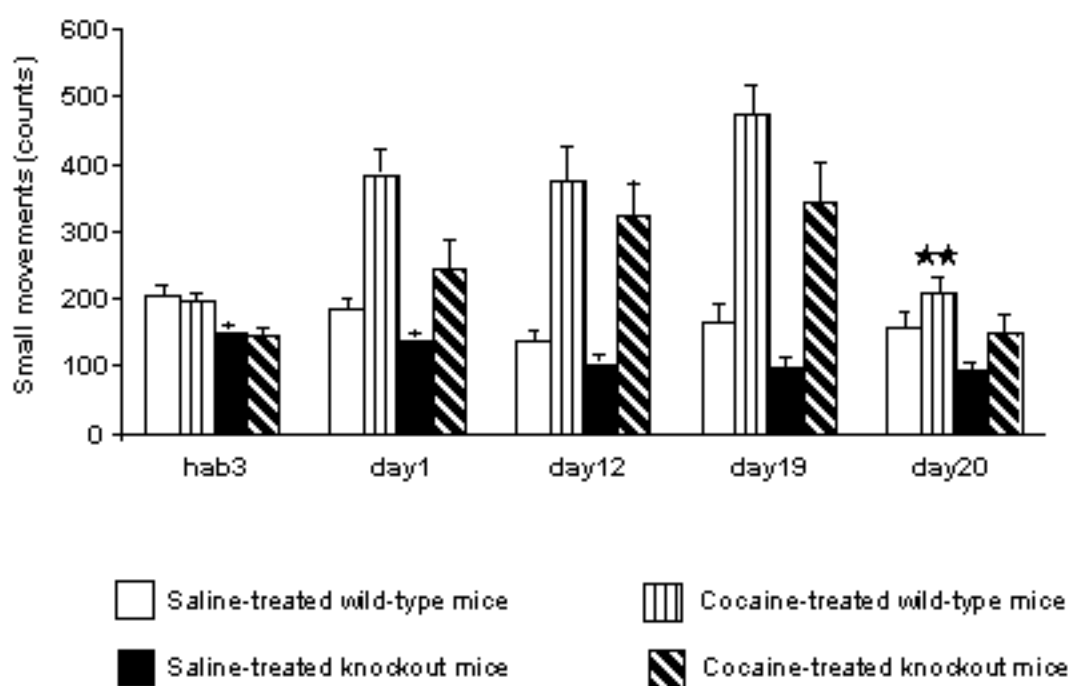
	Ambulatory movements		Local small movements	
	<i>F</i> -value	<i>P</i> -value	<i>F</i> -value	<i>P</i> -value
Genotype (G)	$F_{1,48} = 2.915$	n.s.	$F_{1,48} = 11.051$	$P < 0.01$
Treatment (T)	$F_{1,48} = 53.635$	$P < 0.01$	$F_{1,48} = 28.075$	$P < 0.01$
Day (D)	$F_{4,192} = 27.406$	$P < 0.01$	$F_{4,192} = 15.247$	$P < 0.01$
G x T	$F_{1,48} = 0.317$	n.s.	$F_{1,48} = 0.518$	n.s.
G x D	$F_{3,48} = 0.774$	n.s.	$F_{4,192} = 1.219$	n.s.
T x D	$F_{4,192} = 29.167$	$P < 0.01$	$F_{4,192} = 26.787$	$P < 0.01$
G x T x D	$F_{4,192} = 0.341$	n.s.	$F_{4,192} = 1.243$	n.s.

variations. See material and methods for details.

a**b**

□ Wild-type mice ■ A_{2A} adenosine knockout mice

Figure 1. Soria et al.

a**b****Figure 2. Soria et al.**

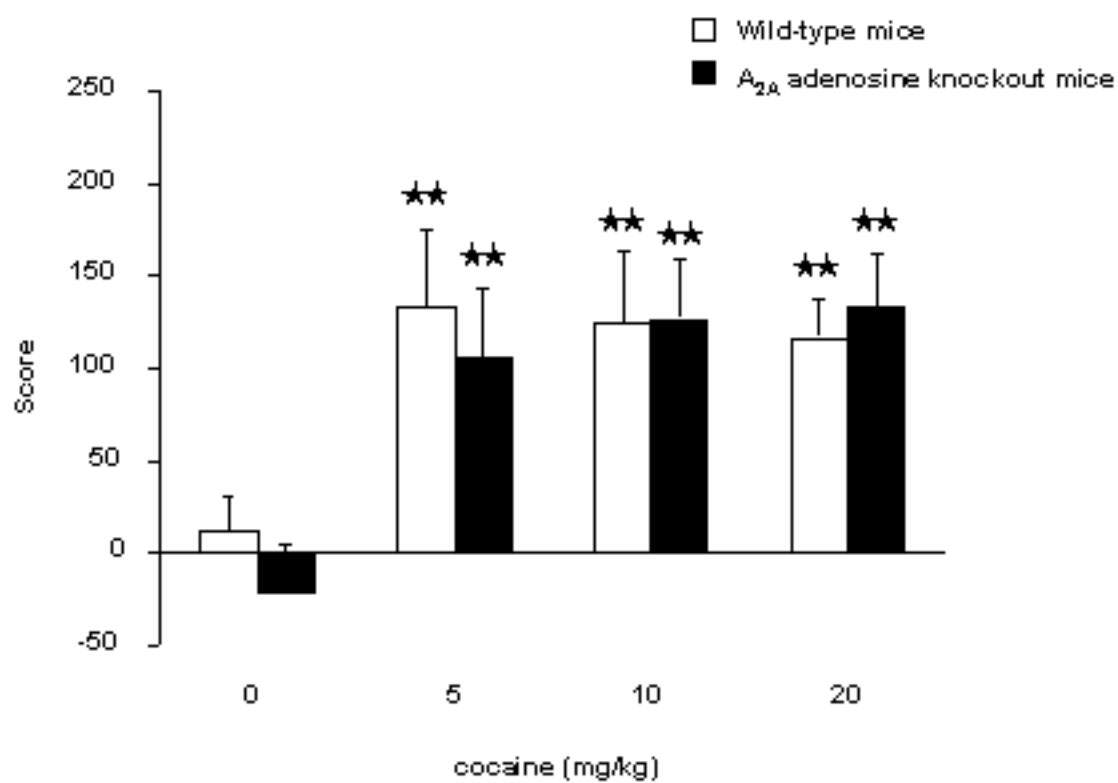
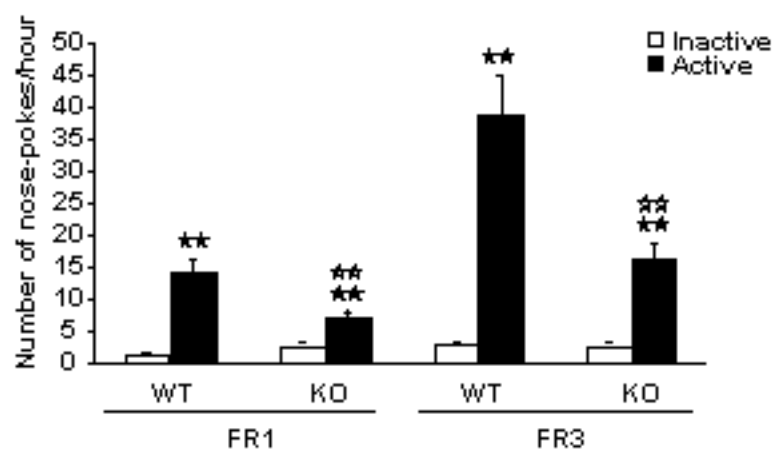
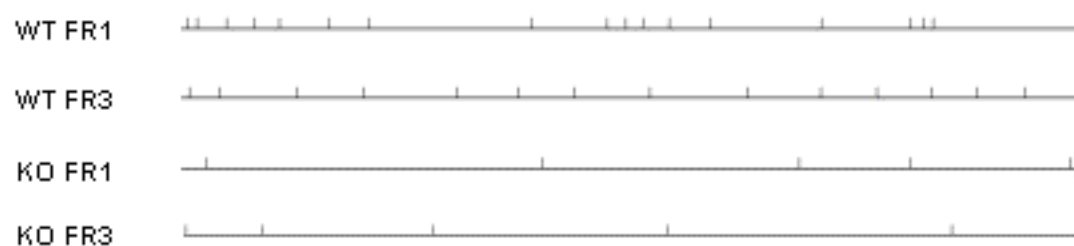
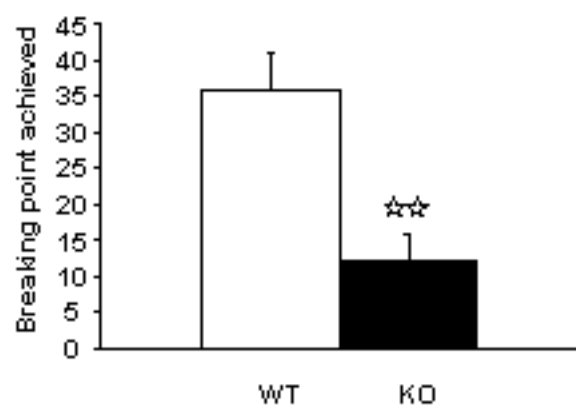
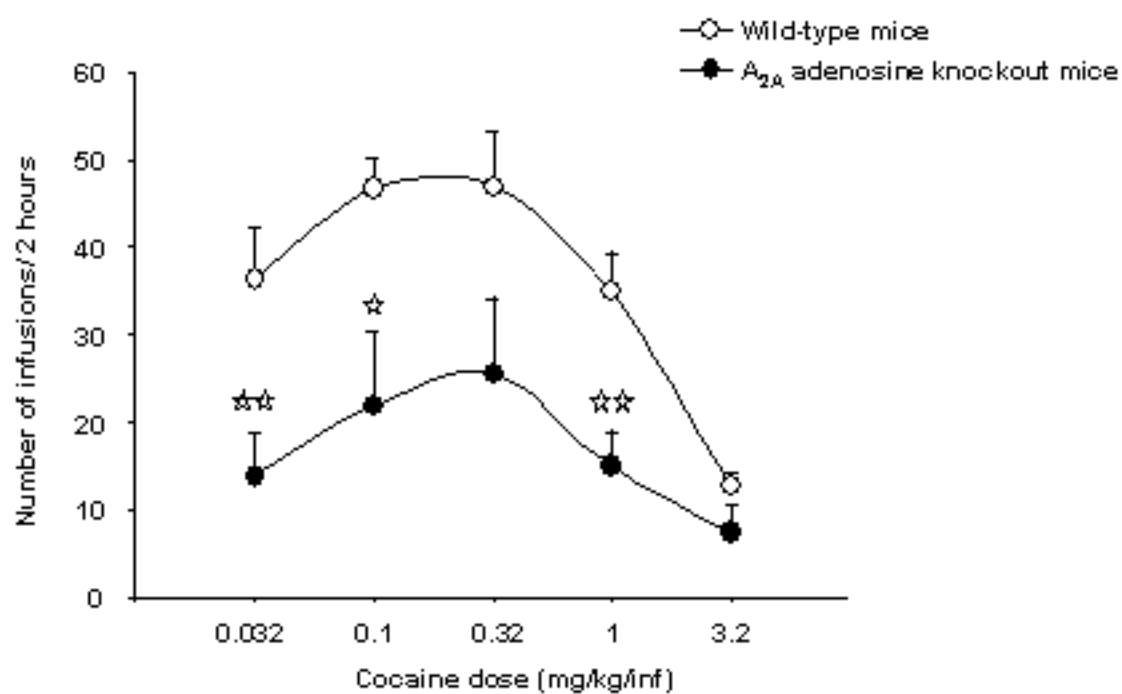
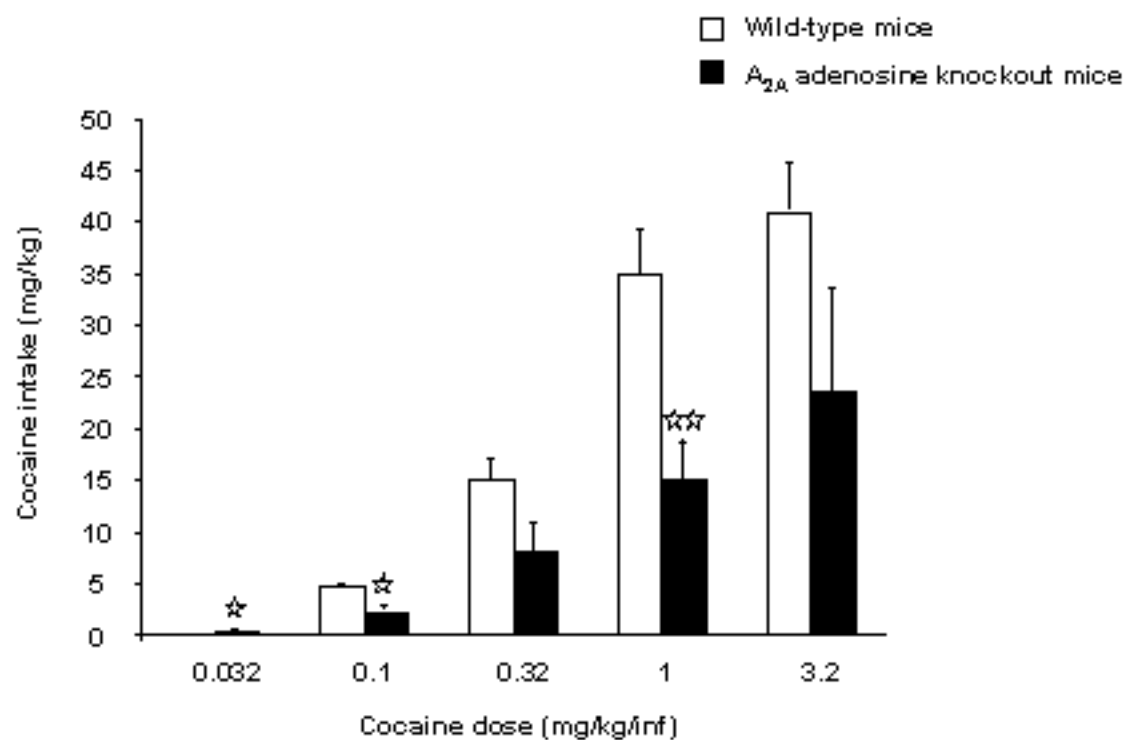


Figure 3. Soria et al.

a**b****c****Figure 4. Soria et al.**

a**b****Figure 5. Soria et al.**

Artículo 3

Adenosine A2A receptors are involved in physical dependence and place conditioning induced by THC. Soria G, Castañé A, Berrendero F, Ledent C, Parmentier M, Maldonado R, Valverde O. 2004 *European Journal of Neuroscience*. 20 (8), 2203-2213.

OBJETIVOS

- Investigar la participación del receptor purinérgico A2A en los efectos farmacológicos del THC en animales A2A knockout.
- Estudiar las propiedades motivacionales del THC en estos animales mediante el paradigma de condicionamiento espacial.
- Evaluar la implicación del receptor A2A en los fenómenos de dependencia física y tolerancia al THC.

RESULTADOS

- No se observaron cambios significativos en los efectos agudos del THC sobre la actividad locomotora ni sobre la nocicepción entre los animales knockout deficientes en el receptor adenosina A2A y los wild-type.
- Los animales wild-type mostraron una preferencia de plaza inducida por THC que no fue observada en los animales A2A knockout.
- Los efectos aversivos del THC, evaluados mediante el paradigma de aversión de plaza, resultaron bloqueados en los animales A2A knockout en comparación con los animales wild-type.
- La adquisición de una conducta operante mantenida por comida y agua fue similar en ambos genotipos.
- El tratamiento crónico con THC desarrolló tolerancia a los efectos antinociceptivos e hipolocomotores de forma similar en ambos genotipos. Sin embargo, durante dicho tratamiento se observaron diferencias en el patrón de peso corporal de los animales A2A knockout en comparación con los animales wild-type.
- La expresión del síndrome de abstinencia al THC fue atenuada en los animales knockout deficientes en el receptor adenosina A2A.

- El estudio autorradiográfico para cuantificar la densidad de receptores CB1 no mostró cambios compensatorios en los niveles de receptores CB1 en ausencia del receptor adenosina A2A.
- La actividad funcional de los receptores cannabinoides CB1, evaluada mediante la unión de $\text{GTP}\gamma^{35}\text{S}$ estimulado por el agonista cannabinoide CB1 WIN55212-2, fue similar en los animales deficientes en el receptor A2A y en los animales wild-type.

CONCLUSIÓN

- Por primera vez se demuestra que los receptores de adenosina A2A participan en las propiedades motivacionales de los cannabinoides, aunque no están implicados en los fenómenos de tolerancia y dependencia física inducidos por el THC.
- Los receptores A2A podrían participar en el efecto del THC sobre el comportamiento de ingesta.

Copyright. Federation of European Neuroscience Societies and Blackwell Publishing.
The definitive version is available at www.blackwell-synergy.com

Adenosine A_{2A} receptors are involved in physical dependence and place-conditioning induced by THC

Guadalupe Soria^{1*}, Anna Castañé^{1*}, Fernando Berrendero¹, Catherine Ledent², Marc Parmentier², Rafael Maldonado¹ and Olga Valverde^{1#}

* These authors contributed equally to this work

To whom correspondence should be addressed: ovalverde@imim.es

¹ Laboratori de Neurofarmacologia, Departament de Ciències Experimentals i de la Salut, Universitat Pompeu Fabra, C/Doctor Aiguader 80, 08003 Barcelona, Spain

² IRIBHM, Université Libre de Bruxelles, N-1070 Bruxelles, Belgium

Running title: A_{2A} receptor and THC dependence

Number of pages: 42; **Number of figures:** 5; **Number of tables:** 3

Number of words: whole manuscript: 8604; **Abstract:** 240; **Introduction:** 575

Keywords: mice, knockout, THC withdrawal, conditioned place preference, reward

Abstract

A_{2A} adenosine and CB1 cannabinoid receptors are highly expressed in the central nervous system where they modulate numerous physiological processes, including adaptive responses to drugs of abuse. Both, purinergic and cannabinoid systems interact with dopamine neurotransmission through A_{2A} and CB1 receptors respectively. Changes in dopamine neurotransmission play an important role in the addictive-related behaviours. In this study, we investigated the contribution of A_{2A} adenosine receptors in several behavioural responses of Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC) related to its addictive properties, including tolerance, physical dependence and motivational effects. For this purpose, we first investigated acute THC responses in mice lacking A_{2A} adenosine receptors. Antinociception, hypolocomotion and hypothermia induced by acute THC administration remained unaffected in mutant mice. Chronic THC treatment developed similar tolerance to these acute effects in wild-type and A_{2A} knockout mice. However, differences in the body weight pattern were found between genotypes during such a chronic treatment. Interestingly, the somatic manifestations of SR141716A-precipitated THC withdrawal were significantly attenuated in mutant mice. The motivational responses of THC were also evaluated by using the place conditioning paradigm. A significant reduction of THC-induced rewarding and aversive effects was found in mice lacking A_{2A} adenosine receptors in comparison with wild-type littermates. Binding studies revealed that these behavioural changes were not associated with any modification in the distribution and/or functional activity of CB1 receptors in knockout mice. Therefore, this study shows, for the first time, a specific involvement of A_{2A} receptors in the addictive-related properties of cannabinoids.

Introduction

Adenosine is an endogenous nucleoside acting as a neuromodulator in the central nervous system (CNS). Four receptor subtypes that specifically bind to adenosine have been identified, namely A₁, A_{2A}, A_{2B} and A₃ (Fredholm *et al.*, 1994). A_{2A} and A_{2B} receptors are positively coupled to adenylate cyclase activity whereas A₁ and A₃ receptors are negatively coupled to this enzyme. Adenosine modulates numerous physiological processes and participates in mediating different responses induced by several drugs of abuse, such as psychostimulants and opioids (Sweeney *et al.*, 1991; Chen *et al.*, 2000; Berrendero *et al.*, 2003). Thus, amphetamine-mediated hyperlocomotion is potentiated by adenosine antagonists and attenuated by adenosine agonists (Turgeon *et al.*, 1996; Ferré, 1997). In addition, genetic inactivation of A_{2A} receptors attenuates amphetamine and cocaine-induced locomotion (Chen *et al.*, 2000). Pharmacological studies have also suggested a role of adenosine in opioid dependence. Indeed, the blockade of adenosine metabolism by adenosine kinase inhibitors decreases the severity of morphine withdrawal (Kaplan & Coyle, 1998). Furthermore, the adenosine agonist CGS 21680 inhibits the expression of morphine withdrawal whereas adenosine antagonists or the deletion of A_{2A} gene increase the severity of morphine abstinence (Kaplan & Sears, 1996; Salem & Hope, 1997; Berrendero *et al.*, 2003; Bailey *et al.*, 2004).

Endocannabinoids have been described as important neuromodulators in the brain (Di Marzo *et al.*, 1998) that **regulate** several behavioural and physiological responses (Maldonado & Rodríguez de Fonseca, 2002; Piomelli, 2003). Cannabinoid effects in the CNS are mediated through the activation of CB1 cannabinoid receptors (Ledent *et al.*, 1999), which are negatively coupled to the adenylate cyclase activity. A_{2A} and CB1 receptors have been found in common areas in the CNS including the

striatum, cerebellum, hippocampus and cerebral cortex (Herkenham *et al.*, 1991; Svenningsson *et al.*, 1999). Both adenosine and cannabinoids participate in the modulation of **different** physiopathological processes such as nociception, anxiety, aggressiveness, motor activity, and drug addiction (Fredholm & Svenningsson, 2003; Piomelli, 2003).

There is evidence that dopamine transmission in the mesolimbic system plays a crucial role in the modulation of the rewarding processes (Koob, 1996; Di Chiara, 2002) and, therefore, in the addictive properties of drugs of abuse. Adenosine regulates dopamine transmission through antagonistic interactions of adenosine A₁/dopamine D₁ receptors and adenosine A_{2A}/dopamine D₂ receptors (Franco *et al.*, 2000). A close relationship between cannabinoid and dopamine system has also been described (Nava *et al.*, 2000; Hermann *et al.*, 2002). Thus, THC and other cannabinoid agonists increase dopamine levels in limbic areas related to reward (Tanda *et al.*, 1997), and the D₂ agonist quinpirole is able to decrease some behavioural responses induced by the cannabinoid agonist CP 55,940 (Sañudo-Peña *et al.*, 1998). Furthermore, chronic treatment with D₂ receptor antagonists results in an up-regulation of CB1 receptor mRNA in the striatum (Mailleux & Vanderhaeghen, 1993). However, the role of adenosine receptors in the behavioural effects of cannabinoids and in cannabinoid addiction has not been yet investigated. Therefore, the aim of the present study was to investigate the specific role of A_{2A} adenosine receptors in the behavioural responses of THC that are related to its addictive properties. For this purpose, we have investigated the acute pharmacological responses of THC, the development of tolerance and physical dependence after chronic THC administration, and the different motivational effects induced by this drug in mice lacking A_{2A} adenosine receptors. In addition, the possible existence of compensatory changes in CB1 cannabinoid receptors was investigated in

these knockout mice by using autoradiography of cannabinoid receptor binding and cannabinoid-agonist-stimulated [³⁵S]-GTPγS binding.

Materials and Methods

Animals

Mice lacking A_{2A} adenosine receptors were generated as previously reported (Ledent *et al.*, 1997), and **were bred on a CD1 background. Fourteen weeks old** A_{2A} knockout mice and wild-type littermates (30-35 g) were housed five per cage in temperature (21 ± 1° C) and humidity (55 ± 10 %) controlled rooms, with a 12-h light/12-h dark cycle (light between 8:00 AM and 8:00 PM). Food and water were available *ad libitum* during all experiments except for the food self-administration study. Mice were handled for one week before starting the experiments.

Animal procedures were conducted in accordance with the guidelines of the European Communities Directive 86/609/EEC regulating animal research and approved by the local ethical committee (CEEA-IMAS-UPF). All experiments were performed under blind conditions.

Drugs

THC was purchased from THC Pharm (**Frankfurt**, Germany), Cremophor EL was provided by Sigma Chemical Co. (Madrid, Spain). THC was dissolved in vehicle as follows: 5 % ethanol, 5 % Cremophor EL, 90% distilled water. The volume of injection was 0.1 ml per 10 g body weight and the administration route was intraperitoneal (i.p.). SR141716A, kindly provided by SANOFI, was dissolved in vehicle based on: 10 % ethanol, 10 % Cremophor EL, 80 % distilled water. The volume of injection was 0.2 ml per 10 g body weight and the administration route was subcutaneous (s.c.).

Acute THC effects after the first administration

Locomotor activity responses induced by THC (20 mg/kg, i.p.) or vehicle were evaluated by using locomotor activity boxes (9 x 20 x 11 cm) (Imetronic, Bordeaux, France). The boxes were provided with two lines of photocells, one 2 cm above the floor to measure horizontal activity, and the other located 6 cm above the floor to measure vertical activity (rears), in a low luminosity environment (5 lux). Mice were habituated to the locomotor cages during 10 min for three consecutive days. On the fourth day, 20 min after THC or vehicle injection, mice were placed in the locomotor activity boxes during 10 min.

Antinociceptive effects induced by an acute administration of THC (20 mg/kg, i.p.) or vehicle were evaluated 30 min after injection by using the tail-immersion test, as previously described (Simonin *et al.*, 1998). The latency to a rapid tail-flick in the bath ($50 \pm 0.5^\circ \text{C}$) was registered with a cut-off latency of 15 s in order to prevent tissue damage. Subsequently, the hot-plate test was performed 35 min after THC or vehicle injection in the same experimental sequence, as previously reported (Simonin *et al.*, 1998). A glass cylinder was used to maintain the heated surface of the plate, which was kept at a temperature of $52 \pm 0.5^\circ \text{C}$ (Columbus Instruments, Columbus Ohio, USA). The nociceptive threshold evaluated was the jumping and the licking response, and a 240-s cut-off was used to prevent tissue damage.

Rectal temperature was measured before and 1 hour after the injections by using a digital thermometer (TMP 812, Letica, Barcelona, Spain) with an electronic thermocouple flexible rectal probe. The probe was lubricated and introduced 3 cm into the rectum of the mice for 20 s (Valverde *et al.*, 2000).

THC tolerance and withdrawal

Mice were injected twice daily at 9:00 a.m. and 7:00 p.m. during 5 days with THC (20 mg/kg, i.p.) or vehicle. On day 6, mice received only the morning injection. For the tolerance study, three different parameters were measured each day during THC chronic treatment: nociception, rectal temperature, and body weight. Antinociceptive responses were evaluated on the tail-immersion test (50° C), 30 min after morning and evening injections from day 1 to 5. Rectal temperature was measured before and 1 hour after the injection on days 1, 2 and 3, after both morning and evening injections of THC, and on days 4 and 5 only after the morning injection. Body weight was recorded for each animal twice a day using an electronic balance (Mettler PM 4800, sensitive to 0.01 g), before morning and evening injections. Body weight changes were calculated by subtracting each weight value from the preceding value.

On the 6th day of THC chronic treatment, the THC withdrawal syndrome was precipitated by injecting the CB1 cannabinoid receptor antagonist SR141716A (10 mg/kg, s.c.) **or its corresponding vehicle**, 4 hours after the THC **or the corresponding vehicle** morning injection. Each mouse was placed in identical test chambers consisting of round boxes (30 cm diameter x 35 cm high) with white floor and moderate lighting (30 lux), and was evaluated for any somatic manifestation of abstinence during 15 min before the antagonist injection. After SR141716A administration, the somatic signs of abstinence were measured during 45 min, as described previously (Hutcheson *et al.*, 1998). The number of bouts of writhing, wet dog shakes, and forepaw tremor were counted. Penile licking or erection, hunched posture, tremor, ptosis, and piloerection were scored 1 for appearance and 0 for non-appearance within each 5 min during the observation time period. A quantitative value was calculated in each animal for the different checked signs by adding the scores obtained in each 5 min time period. A

global withdrawal score, ranging from 0 to 100, was calculated for each animal by giving to each individual sign a relative weight, as previously described (Valverde *et al.*, 2000).

Rewarding and aversive effects of THC in the place conditioning paradigm

The rewarding and the aversive properties of THC (1 and 5 mg/kg, i.p., respectively) were measured using a place conditioning paradigm, as previously described (Valjent & Maldonado, 2000). The apparatus consisted of two main square conditioning compartments (15 x 15 x 15 cm), with differences in texture and colours, separated by a triangular central area (Matthes *et al.*, 1996). The light intensity within the conditioning chambers was 30 lux. During the pre-conditioning phase, drug-naïve mice were placed in the middle of the central area and had free access to both compartments of the apparatus for 20 min. The time spent in each compartment was recorded by computerized monitoring software (Videotrack; View Point, Lyon, France). During the conditioning phase, mice received alternating injections of THC (1 or 5 mg/kg) or vehicle and were immediately confined into one of the two conditioning compartments during 45 min. Five pairings were carried out with THC and five pairings with vehicle on alternate days. Treatments were counterbalanced as closely as possible between compartments. Control animals received vehicle every day. The post-conditioning phase was conducted exactly as the pre-conditioning phase, i.e. free access to each compartment for 20 min. When evaluating the rewarding properties of THC (1 mg/kg, i.p.), the possible negative motivational effects of the first drug exposure were avoided by administering mice a single injection of THC (1 mg/kg, i.p.) in their home cage 24 hours before starting the conditioning phase, as previously reported (Valjent &

Maldonado, 2000). This **THC pre-exposure** was not administered when aversive properties of THC (5 mg/kg, i.p.) were evaluated.

Operant paradigm for food self-administration

The food self-administration experiment was conducted in mouse operant chambers (Model ENV-307A-CT, Medical Associates, Georgia, VT, USA) equipped with two holes, one was selected as active hole for delivering the reinforcer and the other as inactive hole. Nose-poking on the active hole resulted in a reinforcer (food pellet) while nose-poking on the inactive hole had no consequences. The chambers were housed in sound- and light-attenuated boxes equipped with fans to provide ventilation and ambient noise. A removable food dispenser equidistant between the two nose-pokes permitted delivery of food pellets when required. A stimulus light, located above each hole, signalled the delivery of the reinforcer. Mice were deprived of food (3.5 g of food were provided daily) during four days, in order to obtain 95 % of their initial weight. The same food deprivation regime was maintained during the whole evaluation of food-maintained operant behaviour. Water was available *ad libitum* during the whole study. Four days after starting food deprivation, mice were trained in the operant chambers to nose-poke for food pellets (Noyes Precision Pellets, Research Diets, Inc., New Brunswick, NJ, USA). One hour daily self-administration sessions were conducted 6 days per week. The house light was on at the beginning of the session for 3 sec and then remained off during all the complete session. First, mice were trained under a FR1 schedule of reinforcement. A 10 sec time-out period was established after each reinforcement. During this 10 sec period, the cue light was off and no reward was provided on the active hole. Responses on the inactive hole

and all the responses during the 10 sec time-out period were also recorded. The session was terminated after 100 reinforcers were delivered or after 1 hour, whichever occurred first. The criteria for the acquisition of FR1 was achieved when mice maintained a stable responding with less than 20 % deviation from the mean of the total number of reinforcers earned in three consecutive sessions (80 % of stability). Then, the response requirement to earn a reward was changed to a FR3 schedule. When the 80 % stability criteria was reached in FR3, the experiment was finished. After each session, mice were returned to their home-cages.

Brain slicing

Coronal sections 20 µm-thick were cut in a cryostat according to the Paxinos & Franklin atlas (1997). Sections were thaw-mounted on gelatin/chrome-coated slides, dried briefly at 30° C and stored at -80° C until used. For the identification of the different brain nuclei, adjacent sections to those used for autoradiographic analysis were stained with cresyl-violet and analyzed according to the Paxinos & Franklin atlas (1997).

Autoradiography of cannabinoid receptor binding

The protocol used was basically the method described by Herkenham *et al.* (1991). Slide-mounted brain sections were incubated for 2.5 h at 37° C in a buffer containing 50 mM TRIS with 5 % bovine serum albumin (fatty acid-free), pH 7.4, and 10 nM [³H]CP-55, 940 (Perkin Elmer Life Sciences, Madrid, Spain) prepared in the same buffer, in the absence or presence of 10 µM unlabeled CP-55,940 (Tocris, Madrid, Spain) to determine total and nonspecific binding, respectively. Following this

incubation, slides were washed in 50 mM TRIS buffer with 1 % bovine serum albumin (fatty acid-free), pH 7.4, for 4 h (2 x 2 h) at 0° C, dipped in ice-cold distilled water, then dried under a stream of cool dried air. Autoradiograms were generated by apposing the labeled tissues, together with autoradiographic standards ($[^3\text{H}]$ micro-scales, Amersham, Barcelona, Spain), to tritium-sensitive film (Biomax MS, Amersham, Barcelona, Spain) for a period of 4 weeks and developed for 4 min at 20° C.

Analysis of WIN 55,212-2-stimulated $[^{35}\text{S}]$ -GTP γ S binding

The protocol used was the method described by Sim *et al.* (1995). Briefly, slide-mounted brain sections were rinsed in assay buffer (50 mM TRIS, 3 mM MgCl_2 , 0.2 mM EGTA, 100 mM NaCl, and 0.5 % bovine serum albumin fatty acid-free, pH 7.4) at 25° C for 10 min, then pretreated for 15 min with an excess concentration (2 mM) of GDP (Sigma Chemical Co., Madrid, Spain) in assay buffer. Afterwards, sections were incubated at 25° C for 2 h in assay buffer containing 0.04 nM $[^{35}\text{S}]$ -GTP γ S (Amersham, Barcelona, Spain), 2 mM GDP, and 5 μM WIN-55,212-2 (Sigma Chemical Co., Spain). Basal activity was assessed in the absence of agonist, whereas nonspecific binding was measured in the presence of 10 μM unlabeled GTP γ S. In pilot experiments, additional brain sections were incubated in the presence of the cannabinoid receptor antagonist SR141716A (1.5 μM) (Rinaldi-Carmona *et al.*, 1994) in addition to 0.04 nM $[^{35}\text{S}]$ -GTP γ S, 2 mM GDP, and 5 μM WIN-55,212-2. SR141716A significantly antagonized the increase in WIN-55,212-2-stimulated $[^{35}\text{S}]$ -GTP γ S binding, thus supporting that this increase was specifically caused through activation of CB1 cannabinoid receptors (data not shown). Slices were rinsed twice in 50 mM TRIS buffer, pH 7.4, at 4° C and deionized once in water, then dried under a stream of cool dry air. Autoradiograms were generated by apposing the labelled tissues to film (Biomax MR, Amersham, Barcelona,

Spain) for a period of 3 days and developed for 4 min at 20° C. For all autoradiographic studies, developed film was analyzed and quantified in a computerized image analysis system (MCID, St. Catharines, Ontario, Canada).

Statistical analysis

Acute effects of THC administration, body weight loss and withdrawal data were compared by using two-way ANOVA (genotype and treatment as factors of variation) between subjects, followed by one-way ANOVA and Scheffé *post-hoc* comparisons when required. Data of tolerance study were compared by using three-way ANOVA (genotype and treatment as between factors and day as within-group factor of variation). Subsequent two-way and one-way ANOVA were made when required. For the conditioned place preference and place aversion experiments, paired two-tailed Student's t-tests were made between the post-conditioning and pre-conditioning time spent in the drug paired compartment. **For food maintained operant responding, two-way ANOVA was calculated on the mean of nose-pokes performed during the last 3 days required to reach the stability criteria, with hole (active vs inactive) and genotype (knockout vs wild-type) as factors of variation. This statistical analysis was performed for FR1 and FR3 schedules of reinforcement. One-way ANOVA was made when required. Biochemical studies were analyzed by using one-way ANOVA. Differences were considered significant if the probability of error was less than 5%. The level of significance was corrected by Bonferroni when consecutive analysis were made.**

Results

Acute THC effects after the first administration

The acute administration of THC (20 mg/kg) induced antinociceptive responses in the hot-plate and tail-immersion tests, a decrease of body temperature and a decrease of locomotor activity in both wild-type and knockout animals. No differences between genotypes were found for any of the acute responses evaluated. Antinociceptive responses in the jumping threshold of the hot-plate test were similar in wild-type (vehicle-treated: 73.48 ± 11.57 , THC-treated: 176.99 ± 18.59) and knockout mice (vehicle-treated: 60.58 ± 5.46 , THC-treated: 154.73 ± 10.89). Indeed, two-way ANOVA showed a significant effect of THC treatment ($F [1.46] = 55.699$; $p < 0.01$) without effect of genotype ($F [1.46] = 1.763$; n.s.) nor interaction between these two factors ($F [1.49] = 0.125$; n.s.). Antinociceptive effects on the licking threshold of the hot-plate test were also similar in wild-type (vehicle-treated: 11.30 ± 1.52 , THC-treated: 21.14 ± 2.04) and knockout mice (vehicle-treated: 9.57 ± 0.75 , THC-treated: 25.18 ± 1.53). Thus, two-way ANOVA revealed a significant effect of THC treatment ($F [1.47] = 63.764$; $p < 0.01$), but no genotype effect ($F [1.47] = 0.527$; n.s.), nor interaction between genotype and treatment ($F [1.47] = 3.255$; n.s.). In the tail-immersion test, THC also induced similar antinociceptive effects in both wild-type and knockout mice (Fig 1a, **a.m.** D1). Two-way ANOVA revealed a significant effect of the treatment ($F [1.47] = 70.936$; $p < 0.01$), without genotype effect ($F [1.47] = 0.481$; n.s.) nor interaction between genotype and treatment ($F [1.47] = 1.507$; n.s.). The body temperature was also similarly decreased by THC (20 mg/kg) treatment in both genotypes (Fig 1b, **a.m.** D1). Two-way ANOVA indicated a significant effect of the THC treatment ($F [1.47] = 237.336$; $p < 0.01$), without genotype effect ($F [1.47] = 0.008$; n.s.) nor interaction between these two factors ($F [1.47] = 0.024$; n.s.).

Locomotor activity was reduced in a similar way by the acute injection of THC (20 mg/kg) in both genotypes (photobeam counts mean values \pm SEM in vehicle-treated wild-type: 61.38 ± 10.52 , vehicle-treated knockout: 57.4 ± 6.24 , THC-treated wild-type: 11.5 ± 3.28 , THC-treated knockout: 15.30 ± 5.29). Two-way ANOVA revealed a significant effect of treatment ($F [1.47] = 52.769$; $p < 0.01$) no effect of genotype ($F [1.47] = 0.103$; n.s.) nor the interaction between these two factors ($F [1.47] = 36.310$; n.s.). **The level of significance was $p < 0.025$ for all the cases after applying Bonferroni's correction.**

Tolerance to the effects of THC after repeated administration

Repeated administration of THC (20 mg/kg) developed tolerance as revealed by a progressive decrease in the antinociceptive, and hypothermic effects of the drug during the treatment (Fig 1). Development of tolerance to THC antinociceptive effects was observed in the tail-immersion test in both genotypes (Fig 1a). Three-way ANOVA revealed a significant effect of day, treatment, genotype and interaction between day and treatment (Table 1). Subsequent two-way ANOVA calculated for each genotype showed for wild-type animals a significant effect of day ($F [9.225] = 7.159$; $p < 0.01$), treatment ($F [1.25] = 38.511$; $p < 0.01$) and interaction between these two factors ($F [9.225] = 8.029$; $p < 0.01$). Two-way ANOVA for knockout mice also revealed a significant effect of day ($F [9.198] = 6.237$; $p < 0.01$), treatment ($F [1.22] = 24.845$; $p < 0.01$) and interaction between these two factors ($F [9.198] = 6.841$; $p < 0.01$). One-way ANOVA to compare treatment effects on each day showed significant differences between vehicle- and THC-treated mice, until the 4th day in wild-type mice and until the 3rd day in knockout animals. **The level of significance was $p < 0.016$ for all the cases after applying Bonferroni's correction.**

Tolerance to the hypothermic effects developed similarly in both genotypes (Fig 1b) reaching the initial body temperature baseline at the end of the chronic treatment. Three-way ANOVA revealed a significant effect of day, treatment and interaction between these two factors (Table 1). Subsequent two-way ANOVA on each genotype showed for wild-type animals a significant effect of the day ($F [6.150] = 9.868$; $p < 0.01$), treatment ($F [1.25] = 97.317$; $p < 0.01$) and interaction between these two factors ($F [6.150] = 17.737$; $p < 0.01$). Two-way ANOVA for knockout mice revealed a significant effect of the day ($F [6.132] = 6.753$; $p < 0.01$), treatment ($F [1.22] = 74.214$; $p < 0.01$) and interaction between these two factors ($F [6.132] = 18.853$; $p < 0.01$). One-way ANOVA to compare treatment effects on each day indicated significant differences between vehicle- and THC-treated mice until the 3rd day in wild-type mice and until the 2nd day in knockout animals. **The level of significance was $p < 0.016$ for all the cases after applying Bonferroni's correction.**

Effects of THC on body weight after repeated administration

A decrease of body weight during chronic treatment was observed in the THC-treated groups (Fig 2a). Thus, three-way ANOVA showed a significant effect of treatment (Table 1).

We have also analyzed the loss of body weight observed between each injection of the chronic treatment. The chronic administration of THC in wild-type mice revealed a different pattern of food intake compared to A_{2A} adenosine receptor knockout mice (Fig 2b). Indeed, THC-treated wild-type animals presented an homogeneous and progressive loss of weight during day and night periods. This pattern was not observed in the other groups of animals, including THC-treated knockout mice, whose body weight changes were dependent on the circadian activity and the loss of weight was

mainly observed during the light period. Three-way ANOVA revealed a significant effect of day ($F [3.47] = 28.708; p < 0.01$), no effect of treatment ($F [1.47] = 2.389; n.s.$) but the interaction between these two factors ($F [3.47] = 7.246; p < 0.01$). However, no effect of genotype ($F [1.47] = 3.659; n.s.$), nor interaction between treatment and genotype ($F [1.47] = 0.733; n.s.$), day and genotype ($F [3.47] = 2.155; n.s.$) and day, genotype and treatment ($F [3.47] = 1.196; n.s.$) were observed. Subsequent two-way ANOVA performed for each genotype, showed for wild-type animals, a significant effect of the day ($F [8.200] = 12.030; p < 0.01$), no effect of the treatment ($F [1.25] = 0.163; n.s.$) and interaction between these two factors ($F [8.200] = 6.571; p < 0.01$). Two-way ANOVA for knockout mice revealed an effect of day ($F [8.176] = 18.232; p < 0.01$), treatment ($F [1.22] = 7.353; p < 0.01$) and no interaction between the two factors ($F [8.176] = 2.210; n.s.$). One-way ANOVA calculated for wild-type animals to compare treatment effects on each day indicated significant differences between vehicle- and THC-treated mice until the 4th day. **The level of significance was $p < 0.016$ for all the cases after applying Bonferroni's correction.**

SR141716A-precipitated THC withdrawal

The severity of THC withdrawal was evaluated in A_{2A} knockout and wild-type mice. Thus, mice chronically treated with THC (20 mg/kg, i.p., twice daily) or the corresponding vehicle for 6 consecutive days were challenged with the cannabinoid antagonist SR141716A (10 mg/kg, s.c.) or its corresponding vehicle. No signs of withdrawal were observed in any group of mice during the behavioural observation performed 15 min before the antagonist injection (data not shown). A significant expression of different behavioural signs of withdrawal was observed in both genotypes after the antagonist injection during the 45 min of observation

period (Fig 3). Two-way ANOVA was performed for each individual sign of withdrawal. A significant effect of treatment was observed in wet dog shakes ($F [3.90] = 19.314; p < 0.01$), paw tremor ($F [3.90] = 33.622; p < 0.01$), tremor ($F [3.90] = 19.371; p < 0.01$), ptosis ($F [3.90] = 23.489; p < 0.01$), piloerection ($F [3.90] = 40.515; p < 0.01$), genital licks ($F [3.90] = 5.413; p < 0.01$) and mastication ($F [3.90] = 9.138; p < 0.01$). A significant effect of genotype was observed in wet dog shakes ($F [1.90] = 14.659; p < 0.01$), paw tremor ($F [1.90] = 7.626; p < 0.01$) and ptosis ($F [1.90] = 7.240; p < 0.01$). A significant interaction between genotype and treatment was observed in paw tremor ($F [3.90] = 4.340; p < 0.01$) and piloerection ($F [3.90] = 4.318; p < 0.01$). For the global withdrawal score, two-way ANOVA revealed a significant effect of treatment ($F [3.90] = 92.346; p < 0.01$), a significant effect of genotype ($F [1.90] = 13.815; p < 0.01$) and the interaction between these two factors ($F [3.90] = 4.126; p < 0.01$). One-way ANOVA for wild-type animals revealed a significant effect of treatment in paw tremor ($F [3.48] = 18.830; p < 0.01$), piloerection ($F [3.48] = 14.007; p < 0.01$) and the global withdrawal score ($F [3.48] = 49.881; p < 0.01$). Subsequent *post-hoc* comparisons revealed a significant difference between THC-SR group and VEH-VEH group in paw tremor, piloerection and the global withdrawal score. One-way ANOVA for knockout animals revealed a significant effect of treatment in paw tremor ($F [3.48] = 19.574; p < 0.01$), piloerection ($F [3.48] = 32.903; p < 0.01$) and the global withdrawal score ($F [3.48] = 45.078; p < 0.01$). Subsequent *post-hoc* comparisons revealed a significant difference between THC-SR group and VEH-VEH group in paw tremor, piloerection and the global withdrawal score. The level of significance was $p < 0.016$ for all the cases after applying Bonferroni's correction. No significant differences were observed between VEH-VEH, VEH-SR and THC-VEH groups in

both wild-type and mutant mice. One-way ANOVA calculated for THC-VEH-treated mice revealed a significant difference between genotypes in piloerection and global withdrawal score. One-way ANOVA calculated for THC-SR-treated mice revealed a significant difference between genotypes in paw tremor and global withdrawal score. The level of significance was $p < 0.025$ for all the cases after applying Bonferroni's correction.

Rewarding and aversive effects induced by different doses of THC in the place conditioning paradigm

Motivational responses induced by THC were investigated in A_{2A} knockout and wild-type mice using the place conditioning paradigm. We first investigated the rewarding properties of THC (1 mg/kg, i.p.), by using a protocol that minimizes the dysphoric consequences of the first THC exposure (Valjent & Maldonado, 2000). Under these experimental conditions, a significant conditioned place preference was observed in wild-type mice treated with THC, as revealed by a significant increase in the time spent in the drug-paired compartment in the post-conditioning versus the pre-conditioning phase ($t [1.12] = -2.89; p < 0.05$). In contrast, A_{2A} knockout mice did not show any significant difference in the time spent in the drug-paired compartment in the post-conditioning versus the pre-conditioning phase, demonstrating the absence of THC rewarding effects of THC in these mutant mice ($t [1.16] = 1.21; n.s.$) (Fig 4a). To evaluate the aversive effects of THC (5 mg/kg i.p.), we used a similar place conditioning protocol without **pre-exposing mice to THC**, as previously reported (Valjent & Maldonado, 2000). In these experimental conditions, THC induced a significant decrease in the time spent in the drug-paired compartment in the post-conditioning versus the pre-conditioning phase in wild-type mice, revealing an aversive

effect of THC in this genotype ($t [1.12] = 2.40; p < 0.05$) (Fig 4b). However, this aversive response was not observed in A_{2A} knockout mice, as revealed by the similar time spent in the drug-paired compartment during post-conditioning and pre-conditioning phases ($t [1.16] = -0.14; n.s.$) (Fig 4b).

Food maintained operant behaviour

As shown in figure 5, nose-poke behaviour maintained by food pellets was similarly acquired by both wild-type and A_{2A} knockout mice. All the wild-type and A_{2A} knockout mice reached the stability criteria in FR1 and FR3, and both genotypes maintained active nose-poke discrimination during the whole experiment. Thus, two-way ANOVA showed in FR1 a significant effect of nose-poke discrimination ($F [1.26] = 122.903; p < 0.01$), no effect of genotype ($F [1.26] = 2.991; n.s.$) nor interaction between genotype and nose-poke ($F [1.26] = 0.880; n.s.$). The maintenance of nose-poke responding by food in FR3 schedule of reinforcement was also similar in both genotypes, with a clear discrimination between the active and the inactive nose-pokes. Two-way ANOVA showed a significant effect of nose-poke ($F [1.26] = 60.598; p < 0.01$) and no effect of genotype ($F [1.26] = 0.000; n.s.$) nor interaction between genotype and nose-poke ($F [1.26] = 0.342; n.s.$). Subsequent one-way ANOVAs revealed significant discrimination between the active and the inactive holes in wild-type and A_{2A} knockout mice during FR1 and FR3 schedules of reinforcement. The level of significance was $p < 0.025$ for all the cases after applying Bonferroni's correction.

Autoradiography of cannabinoid receptor binding

The distribution of CB1 cannabinoid receptors labeled with [³H]CP-55,940 in coronal sections of brain of control mice was similar to those previously reported (Herkenham *et al.*, 1991). Thus, a high density of CB1 cannabinoid receptors was found in several brain structures including basal ganglia, cerebellum, hippocampus and cerebral cortex. There were no significant differences between wild-type and A_{2A} knockout mice in the levels of CB1 cannabinoid receptor in any of the brain structures analyzed (Table 2).

Autoradiography of WIN 55,212-2-stimulated [³⁵S]-GTPγS binding

The anatomical distribution of WIN 55,212-2-stimulated [³⁵S]-GTPγS binding qualitatively paralleled receptor distribution as determined in the previous experiment by receptor binding autoradiography. The highest functional activity of CB1 cannabinoid receptor was revealed in several nuclei of the basal ganglia such as globus pallidus, entopeduncular nucleus and substantia nigra, as previously reported (Sim *et al.*, 1995). As shown in table 3, no differences between A_{2A} adenosine receptor knockout mice and wild-type animals were detected in the stimulation of [³⁵S]-GTPγS binding in any of the brain areas investigated.

Discussion

The aim of the present study was to investigate the behavioural responses related to THC addictive properties in A_{2A} adenosine receptor knockout mice. The deletion of A_{2A} adenosine receptors abolished both rewarding and aversive responses produced by THC in the place conditioning paradigm and attenuated the severity of THC withdrawal. These effects were produced without any compensatory change in the distribution and functional activity of CB1 cannabinoid receptors in the brain.

Deletion of A_{2A} adenosine receptors did not modify several acute effects induced by THC. Thus, THC (20 mg/kg) acute antinociceptive responses in both the tail-immersion and hot-plate tests were similar in wild-type and knockout mice. A hypoalgesic phenotype has been previously reported when using stronger thermal stimuli than that used in the present study (Ledent *et al.*, 1997; Bailey *et al.*, 2002). Changes in basal nociceptive responses in A_{2A} knockout mice do not seem reliable when using the tail-immersion test at 50° C. THC administration induced a similar decrease in both locomotor activity and rectal temperature in wild-type and knockout animals. Lower doses of THC (5 and 10 mg/kg) also induced the same effects on nociceptive thresholds, locomotion and rectal temperature in both genotypes (data not shown). These data demonstrate that A_{2A} receptors do not participate in the acute effects induced by THC.

Chronic treatment with THC developed a similar degree of tolerance to antinociceptive, hypothermic and body weight loss effects of the drug in wild-type and A_{2A} knockout mice, although tolerance developed slightly faster in the knockout group. Interestingly, the analysis of body weight changes for the different experimental groups revealed that THC treatment modified the pattern of daily weight oscillation in wild-type but not in knockout mice. Both groups of vehicle-treated mice showed the

expected weight pattern based on the light/dark cycle, and exhibited an increase of body weight during the dark phase, corresponding to the normal eating period in rodents, and a decrease during the light phase. THC-treatment modified this pattern in wild-type mice, which exhibited a stable line of body weight loss without the rhythmic oscillations observed in vehicle-treated mice. Interestingly, chronic treatment with THC did not modify the daily oscillation pattern of body weight in A_{2A} knockout mice. Cannabinoid receptors and their endogenous ligands have been implicated in the control of feeding and body weight regulation (Di Marzo *et al.*, 2001; Williams & Kirkham, 2002; Kirkham *et al.* 2002). Thus, THC treatment interfered with the satiety threshold in rodents (Williams *et al.*, 1998). It is important to note that the dose of THC used in this study was high in order to induce a reliable degree of tolerance and dependence, and does not correspond to the doses currently used to reveal THC hyperphagic effects (Williams & Kirkham, 2002). Several studies have also proposed a role for A_{2A} adenosine receptors in the regulation of feeding behaviour (Kittner *et al.*, 2004; Nagel *et al.*, 2003). Thus, our findings provide evidence that A_{2A} adenosine receptors could regulate the effects of THC on feeding behaviour.

We have evaluated the involvement of A_{2A} adenosine receptors in THC-induced physical dependence. SR141716A precipitated a withdrawal syndrome in THC-dependent wild-type and A_{2A} adenosine knockout mice. However, in mice lacking A_{2A} adenosine receptors the withdrawal syndrome was attenuated as revealed by the significant decrease of the global withdrawal score. Both A_{2A} adenosine and CB1 cannabinoid receptors are present in common brain areas related to the control of motor activity such as the cerebellum and the striatum (Herkenham *et al.*, 1991; Svenningsson *et al.*, 1999). Cannabinoid withdrawal syndrome is accompanied by a strong motor impairment (Hutcheson *et al.*, 1998; Tzavara *et al.*, 2000) and the cerebellum has been

reported to play an important role in the somatic manifestations of THC withdrawal (Tzavara *et al.*, 2000). A_{2A} adenosine receptors are positively coupled to adenylyl cyclase, and the activity of this enzyme was selectively increased in the cerebellum during SR141716A-precipitated cannabinoid withdrawal. Therefore, we postulate that A_{2A} receptors may contribute to the increased cAMP levels during THC withdrawal and the deletion of these purinergic receptors would then result in an attenuation in the severity of cannabinoid withdrawal. However, other second messenger systems coupled to CB1 receptors, such as MAP-kinase pathway, could be also implicated in the somatic manifestations of cannabinoid withdrawal, which would justify the moderate magnitude of the behavioural effect in A_{2A} knockout mice.

Motivational responses to THC were explored by using the place conditioning procedure. Rewarding and aversive effects of THC were revealed in wild-type mice, as previously reported (Valjent & Maldonado, 2000), but these effects were suppressed in mice lacking A_{2A} receptors. **To exclude the possibility of a general learning impairment in knockout mice lacking A_{2A} receptors, food maintained operant behaviour was investigated in a self-administration paradigm. Both wild-type and A_{2A} knockout mice acquired and maintained operant self-administration for food in a similar way in FR1 and FR3 schedules of reinforcement, which suggests that learning processes were not impaired in mutant mice. Previous pharmacological studies using adenosine agonists and antagonists have provided confusing data about the contribution of A_{2A} receptors in reward-related processes (Brockwell & Beninger, 1996; Baldo *et al.*, 1999; Sahraei *et al.* 1999; Poleszak & Malec, 2003). The use of different behavioural paradigms and compounds makes the interpretation of these pharmacological studies difficult. Our study represents the first direct evidence showing an interaction between A_{2A} adenosine receptors and**

THC motivational effects in the place conditioning paradigm. A_{2A} receptors are mainly located in striatal neurons where interact with multiple neurotransmitter systems. Thus, A_{2A} receptors are coexpressed with postsynaptic D2 receptors in GABAergic neurons in this brain structure (Fink *et al.*, 1992). CB1 cannabinoid receptors are also highly expressed in the striatum where interact with A_{2A} adenosine receptors in the control of different behavioural responses (Berrendero *et al.*, 2003). Taking into account the participation of the opioid system in the responses induced by cannabinoids (for review see Manzanares *et al.*, 1999; Valverde *et al.*, 2000; Ghozland *et al.*, 2002) and the regulation of proenkephalin gene expression by A_{2A} adenosine receptors (Ledent *et al.*, 1997), we cannot exclude a possible involvement of the endogenous opioid system in the modification of THC responses in A_{2A} knockout mice. Indeed, THC place preference was abolished in mice lacking mu-opioid receptors (Ghozland *et al.*, 2002), whereas THC-induced place aversion was suppressed in both mice deficient of kappa-opioid receptors (Ghozland *et al.*, 2002) and dynorphin gene (Zimmer *et al.*, 2001). However, no changes in the binding properties of the different opioid receptors were detected in the brains of A_{2A} knockout mice (Bailey *et al.*, 2002). On the other hand, the suppression of A_{2A} adenosine receptors leads to a functional hypodopaminergic state in the striatum and cerebral cortex (Dassesse *et al.*, 2001), and dopamine neurotransmission plays a crucial role in the regulation of the rewarding effects of drugs of abuse (Koob, 1996; Di Chiara, 2002). The activation of CB1 cannabinoid receptors has been suggested to disinhibit dopaminergic neurons producing an increase of dopamine release (Van der Stelt & Di Marzo, 2003), and it could be hypothesized a possible modulatory role of A_{2A} receptors on cannabinoid-induced dopamine release. Thus, DARPP-32, a potent endogenous inhibitor of Protein

Phosphatase 1 which plays an obligatory role in dopaminergic transmission, is altered in mice lacking A_{2A} adenosine receptors (Svenningsson *et al.*, 2000). Interestingly, a deficit in DARPP-32 is sufficient to decrease the conditioned place preference for cocaine, indicating that modulation of downstream processes of dopamine release appears to be critical for cocaine rewarding properties (Zachariou *et al.*, 2002). A recent study reported the existence of an important synergy in protein kinase A signaling between CB1 cannabinoid and D_2 dopamine receptors in the nucleus accumbens. Adenosine A_2 receptor activation is required for this synergy (Yao *et al.*, 2003). These authors proposed that colocalization of D_2 and CB1 receptors on the same neurons confers hypersensitivity to cannabinoids. All these complex interactions between A_{2A} adenosine receptors and the dopamine system may explain that the effects of THC on dopamine transmission could be impaired in the absence of A_{2A} receptors, thereby producing a suppression of both THC-induced rewarding and aversive responses.

Finally, the distribution and the functional activity of CB1 cannabinoid receptors was measured in several brain structures related to cannabinoid behavioural effects, such as cerebellum, hippocampus, cortex, and different nuclei of the basal ganglia (Ameri, 1999). The distribution of CP 55,940 binding sites was similar in A_{2A} knockout mice and wild-type littermates. Similarly, WIN 55,212-2 produced a similar stimulation of [35 S]-GTP γ S binding in both genotypes in all the brain areas evaluated indicating that the functional activity of CB1 cannabinoid receptors was not modified in A_{2A} knockout mice. These results indicate the absence of compensatory changes in CB1 cannabinoid receptors in A_{2A} knockout mice that could have been of relevance to explain the modification of THC behavioural responses.

In summary, the present study shows that A_{2A} adenosine receptors do not participate in the acute effects induced by THC, nor in the development of THC

tolerance to these effects. However, A_{2A} adenosine receptors seem to play a role in THC control of feeding behaviour. Furthermore, A_{2A} adenosine receptors are involved in the motivational properties of THC and the somatic expression of THC withdrawal. These behavioural changes were not due to a learning impairment nor to compensatory changes in the distribution or functional activity of CB1 cannabinoid receptors in A_{2A} knockout mice. Therefore, these results demonstrate for the first time the participation of A_{2A} adenosine receptors in the behavioural manifestations of THC addictive properties and provide a further advance in understanding the complex neurobiological processes underlying cannabinoid addiction.

Acknowledgements

This work was supported by grants from Spanish MCYT (SAF 2001/0745), HFSP (RG007/200-B), Generalitat de Catalunya (Research Distinction and 2002SGR00193), Redes de centros y grupos del Instituto de Salud Carlos III (C03/06) and (G03/005) and European Communities QLRT 2001-01691. AC is a fellowship from DURSI (Generalitat de Catalunya). FB is researcher from Ramón y Cajal Programme (MCYT). We thank Dr G. Mengod and Dr. R. Cortés for their help in image analysis.

Abbreviations

central nervous system (CNS), Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC).

References

- Ameri, A. (1999) The effects of cannabinoids on the brain. *Prog. Neurobiol.*, **58**, 315-348.
- Bailey, A., Davis, L., Lesscher, H.M., Kelly, M.D., Ledent, C., Hourani, S.M. & Kitchen, I. (2004) Enhanced morphine withdrawal and mu-opioid receptor G-protein coupling in A_{2A} adenosine receptor knockout mice. *J. Neurochem.*, **88**, 827-834.
- Bailey, A., Ledent, C., Kelly, M., Hourani, S.M. & Kitchen, I. (2002) Changes in spinal delta and kappa opioid systems in mice deficient in the A_{2A} receptor gene. *J. Neurosci.*, **22**, 9210-9220.
- Baldo, B.A., Koob, G.F. & Markou, A. (1999) Role of adenosine A₂ receptors in brain stimulation reward under baseline conditions and during cocaine withdrawal in rats. *J. Neurosci.*, **19**, 11017-11026.
- Berrendero, F., Castañé, A., Ledent, C., Parmentier, M., Maldonado, R. & Valverde, O. (2003) Increase of morphine withdrawal in mice lacking A_{2A} receptors and no changes in CB1/A_{2A} double knockout mice. *Eur. J. Neurosci.*, **17**, 315-324.
- Brockwell, N.T. & Beninger, R.J. (1996) The differential role of A₁ and A₂ adenosine receptor subtypes in locomotor activity and place conditioning in rats. *Behav. Pharmacol.*, **7**, 373-383.
- Chen, J.F., Beilstein, M., Xu, Y.H., Turner, T.J., Moratalla, R., Standaert, D.G., Aloyo, V.J., Fink, J.S. & Schwarzschild, M.A. (2000) Selective attenuation of

- psychostimulant-induced behavioral responses in mice lacking A_{2A} adenosine receptors. *Neuroscience*, **97**, 195-204.
- Dassesse, D., Massie, A., Ferrari, R., Ledent, C., Parmentier, M., Arckens, L., Zoli, M. & Schiffmann, S.N. (2001) Functional striatal hypodopaminergic activity in mice lacking adenosine A_{2A} receptors. *J. Neurochem.*, **78**, 183-198.
- Di Chiara, G. (2002) Nucleus accumbens shell and core dopamine: differential role in behavior and addiction. *Behav. Brain Res.*, **137**, 75-114.
- Di Marzo, V, Goparaju, S.K., Wang, L., Liu, J., Batkai, S., Jarai, Z., Fezza, F., Miura, G.I., Palmiter, R.D., Sugiura, T. & Kunos, G. (2001) Leptin-regulated endocannabinoids are involved in maintaining food intake. *Nature*, **410**, 822-825.
- Di Marzo, V, Melck, D., Bisogno, T. & De Petrocellis, L. (1998) Endocannabinoids: endogenous cannabinoid receptor ligands with neuromodulatory action. *Trends Neurosci.*, **21**, 521-528.
- Ferré S (1997) Adenosine-dopamine interactions in the ventral striatum. Implications for the treatment of schizophrenia. *Psychopharmacology*, **133**, 107-120.
- Fink, J.S., Weaver, D.R., Rivkees, S.A., Peterfreund, R.A., Pollack, A.E., Adler, E.M., Reppert, S.M. (1992) Molecular cloning of the rat A₂ adenosine receptor: selective co-expression with D₂ dopamine receptors in rat striatum. *Brain Res. Mol. Brain Res.*, **14**, 186-95.**
- Franco, R., Ferré, S., Agnati, L., Torvinen, M., Gines, S., Hillion, J., Casado, V., Lledo, P., Zoli, M., Lluís, C. & Fuxe, K. (2000) Evidence for adenosine/dopamine receptor

interactions: indications for heteromerization. *Neuropsychopharmacology*, **23**, S50-S59.

Fredholm, B.B., Abbracchio, M.P., Burnstock, G., Daly, J.W., Harden, T.K., Jacobson, K.A., Leff, P. & Williams, M. (1994) Nomenclature and classification of purinoceptors. *Pharmacol. Rev.*, **46**, 143-156.

Fredholm, B.B. & Svenningsson, P. (2003) Adenosine-dopamine interactions: development of a concept and some comments on therapeutic possibilities. *Neurology*, **61**, S5-S9.

Ghozland, S., Matthes, H.W., Simonin, F., Filliol, D., Kieffer, B.L. & Maldonado, R. (2002) Motivational effects of cannabinoids are mediated by mu-opioid and kappa-opioid receptors. *J. Neurosci.*, **22, 1146-1154.**

Herkenham, M., Lynn, A.B., Johnson, M.R., Melvin, L.S., de Costa, B.R. & Rice, K.C. (1991) Characterization and localization of cannabinoid receptors in rat brain: a quantitative in vitro autoradiographic study. *J. Neurosci.*, **11**, 563-583.

Hermann, H., Marsicano, G. & Lutz, B. (2002) Coexpression of the cannabinoid receptor type 1 with dopamine and serotonin receptors in distinct neuronal subpopulations of the adult mouse forebrain. *Neuroscience*, **109**, 451-460.

Hutcheson, D.M., Tzavara, E.T., Smadja, C., Valjent, E., Roques, B.P., Hanoune, J. & Maldonado, R. (1998) Behavioural and biochemical evidence for signs of abstinence in mice chronically treated with delta-9-tetrahydrocannabinol. *Br. J. Pharmacol.*, **125**, 1567-1577.

- Kaplan, G.B. & Coyle, T.S. (1998) Adenosine kinase inhibitors attenuate opiate withdrawal via adenosine receptor activation. *Eur. J. Pharmacol.*, **362**, 1-8.
- Kaplan, G.B. & Sears, M.T. (1996) Adenosine receptor agonists attenuate and adenosine receptor antagonists exacerbate opiate withdrawal signs. *Psychopharmacology*, **123**, 64-70.
- Kirkham, T.C., Williams, C.M., Fezza, F. & Di Marzo, V (2002) Endocannabinoid levels in rat limbic forebrain and hypothalamus in relation to fasting, feeding and satiation: stimulation of eating by 2-arachidonoyl glycerol. *Br. J. Pharmacol.*, **136**, 550-557.
- Kittner, H., Krugel, U., Hoffmann, E. & Illes, P. (2004) Modulation of feeding behaviour by blocking purinergic receptors in the rat nucleus accumbens: a combined microdialysis, electroencephalographic and behavioural study. *Eur. J. Neurosci.*, **19**, 396-404.
- Koob, G.F. (1996) Hedonic valence, dopamine and motivation. *Mol. Psychiatry*, **1**, 186-189.
- Ledent, C., Valverde, O., Cossu, G., Petitet, F., Aubert, J.F., Beslot, F., Bohme, G.A., Imperato, A., Pedrazzini, T., Roques, B.P., Vassart, G., Fratta, W. & Parmentier, M. (1999) Unresponsiveness to cannabinoids and reduced addictive effects of opiates in CB1 receptor knockout mice. *Science*, **283**, 401-404.
- Ledent, C., Vaugeois, J.M., Schiffmann, S.N., Pedrazzini, T., El Yacoubi, M., Vanderhaeghen, J.J., Costentin, J., Heath, J.K., Vassart, G. & Parmentier, M. (1997) Aggressiveness, hypoalgesia and high blood pressure in mice lacking the adenosine A_{2A} receptor. *Nature*, **388**, 674-678.

- Mailleux, P. & Vanderhaeghen, J.J. (1993) Dopaminergic regulation of cannabinoid receptor mRNA levels in the rat caudate-putamen: an in situ hybridization study. *J. Neurochem.*, **61**, 1705-1712.
- Maldonado, R. & Rodríguez de Fonseca, F. (2002) Cannabinoid addiction: behavioral models and neural correlates. *J. Neurosci.*, **22**, 3326-3331.
- Manzanas, J., Corchero, J., Romero, J., Fernandez-Ruiz, J.J., Ramos & J.A., Fuentes, J.A. (1999) Pharmacological and biochemical interactions between opioids and cannabinoids. *Trends. Pharmacol. Sci.*, **20**, 287-294.
- Matthes, H.W., Maldonado, R., Simonin, F., Valverde, O., Slowe, S., Kitchen, I., Befort, K., Dierich, A., Le Meur, M., Dolle, P., Tzavara, E., Hanoune, J., Roques, B.P. & Kieffer, B.L. (1996) Loss of morphine-induced analgesia, reward effect and withdrawal symptoms in mice lacking the mu-opioid-receptor gene. *Nature*, **383**, 819-823.
- Nagel, J., Schladebach, H., Koch, M., Schwienbacher, I., Muller, C.E. & Hauber, W. (2003) Effects of an adenosine A_{2A} receptor blockade in the nucleus accumbens on locomotion, feeding, and prepulse inhibition in rats. *Synapse*, **49**, 279-286.
- Nava, F., Carta, G., Battasi, A.M. & Gessa, G.L. (2000) D(2) dopamine receptors enable delta(9)-tetrahydrocannabinol induced memory impairment and reduction of hippocampal extracellular acetylcholine concentration. *Br. J. Pharmacol.*, **130**, 1201-1210.
- Paxinos, G. & Franklin, K.B.J. (1997) *The mouse brain in stereotaxic coordinates*. Academic Press, San Diego.

- Piomelli, D. (2003) The molecular logic of endocannabinoid signalling. *Nat. Rev. Neurosci.*, **4**, 873-884.
- Poleszak, E. & Malec, D. (2003) Effects of adenosine receptor agonists and antagonists in amphetamine-induced conditioned place preference test in rats. *Pol. J. Pharmacol.*, **55**, 319-326.
- Rinaldi-Carmona, M., Barth, F., Heaulme, M., Shire, D., Calandra, B., Congy, C., Martinez, S., Maruani, J., Neliat, G., Caput, D., Ferrara, P., Soubrie, P., Breliere, J.C., & Le Fur, G. (1994) SR141716A, a potent and selective antagonist of the brain cannabinoid receptor. *FEBS Lett.*, **350**, 240-244.
- Sahraei, H., Motamedi, F., Khoshbaten, A. & Zarrindast, M.R. (1999) Adenosine A(2) receptors inhibit morphine self-administration in rats. *Eur. J. Pharmacol.*, **383**, 107-113.
- Salem, A. & Hope, W. (1997) Effect of adenosine receptor agonists and antagonists on the expression of opiate withdrawal in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **57**, 671-679.
- Sañudo-Peña, M.C., Force, M., Tsou, K., Miller, A.S. & Walker, J.M. (1998) Effects of intrastriatal cannabinoids on rotational behavior in rats: interactions with the dopaminergic system. *Synapse*, **30**, 221-226.
- Sim, L.J., Selley, D.E. & Childers, S.R. (1995) In vitro autoradiography of receptor-activated G proteins in rat brain by agonist-stimulated guanylyl 5'-[gamma-[35S]thio]-triphosphate binding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 7242-7246.

- Simonin, F., Valverde, O., Smadja, C., Slowe, S., Kitchen, I., Dierich, A., Le Meur, M., Roques, B.P., Maldonado, R. & Kieffer, B.L. (1998) Disruption of the kappa-opioid receptor gene in mice enhances sensitivity to chemical visceral pain, impairs pharmacological actions of the selective kappa-agonist U-50,488H and attenuates morphine withdrawal. *EMBO J.*, **17**, 886-897.
- Svenningsson, P., Le Moine, C., Fisone, G. & Fredholm, B.B. (1999) Distribution, biochemistry and function of striatal adenosine A_{2A} receptors. *Prog. Neurobiol.*, **59**, 355-396.
- Svenningsson, P., Lindskog, M., Ledent, C., Parmentier, M., Greengard, P., Fredholm, B.B. & Fisone, G. (2000) Regulation of the phosphorylation of the dopamine- and cAMP-regulated phosphoprotein of 32 kDa in vivo by dopamine D1, dopamine D2, and adenosine A_{2A} receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 1856-1860.
- Sweeney, M.I., White, T.D. & Sawynok, J. (1991) Intracerebroventricular morphine releases adenosine and adenosine 3',5'-cyclic monophosphate from the spinal cord via a serotonergic mechanism. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **259**, 1013-1018.
- Tanda, G., Pontieri, F.E. & Di Chiara, G. (1997) Cannabinoid and heroin activation of mesolimbic dopamine transmission by a common mu1 opioid receptor mechanism. *Science*, **276**, 2048-2050.
- Turgeon, S.M., Pollack, A.E., Schusheim, L. & Fink, J.S. (1996) Effects of selective adenosine A1 and A_{2A} agonists on amphetamine-induced locomotion and c-Fos in striatum and nucleus accumbens. *Brain Res.*, **707**, 75-80.

- Tzavara, E.T., Valjent, E., Firmo, C., Mas, M., Beslot, F., Defer, N., Roques, B.P., Hanoune, J. & Maldonado, R. (2000) Cannabinoid withdrawal is dependent upon PKA activation in the cerebellum. *Eur. J. Neurosci.*, **12**, 1038-1046.
- Valjent, E. & Maldonado, R. (2000) A behavioural model to reveal place preference to delta 9-tetrahydrocannabinol in mice. *Psychopharmacology*, **147**, 436-438.
- Valverde, O., Maldonado, R., Valjent, E., Zimmer, A.M. & Zimmer, A. (2000) Cannabinoid withdrawal syndrome is reduced in pre-proenkephalin knockout mice. *J. Neurosci.*, **20**, 9284-9289.
- Van der Stelt, M. & Di Marzo, V (2003) The endocannabinoid system in the basal ganglia and in the mesolimbic reward system: implications for neurological and psychiatric disorders. *Eur. J. Pharmacol.*, **480**, 133-150.
- Williams, C.M. & Kirkham, T.C. (2002) Observational analysis of feeding induced by delta-9-THC and anandamide. *Physiol. Behav.*, **76**, 241-250.
- Williams, C.M., Rogers, P.J. & Kirkham, T.C. (1998) Hyperphagia in pre-fed rats following oral delta-9-THC. *Physiol. Behav.*, **65**, 343-346.
- Yao, L., Fan, P., Jiang, Z., Mailliard, W.S., Gordon, A.S., Diamond, I. (2003) Addicting drugs utilize a synergistic molecular mechanism in common requiring adenosine and Gi-beta gamma dimmers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **100**, 14379-14384.
- Zachariou, V., Benoit-Marand, M., Allen, P.B., Ingrassia, P., Fienberg, A.A., Gonon, F., Greengard, P. & Picciotto, M.R. (2002) Reduction of cocaine place preference in mice lacking the protein phosphatase 1 inhibitors DARPP 32 or Inhibitor 1. *Biol. Psychiatry*, **51**, 612-620.

Zimmer, A., Valjent, E., Konig, M., Zimmer, A.M., Robledo, P., Hahn, H., Valverde, O., Maldonado. R. (2001) Absence of delta -9-tetrahydrocannabinol dysphoric effects in dynorphin-deficient mice. *J. Neurosci.*, 21, 9499-9505.

Table 1. Three-way ANOVA of antinociception, hypothermia, hypolocomotion and loss of weight induced during chronic THC treatment in mice lacking A_{2A} adenosine receptor.

	Antinociception (TI)		Hypothermia		Loss of body weight	
	<i>F</i>	<i>p</i>	<i>F</i>	<i>p</i>	<i>F</i>	<i>p</i>
Day	$F_{(9,47)} = 13.14$	0.001	$F_{(6,47)} = 15.66$	0.001	$F_{(3,14)} = 2.74$	n.s.
Treatment	$F_{(1,47)} = 59.22$	0.001	$F_{(1,47)} = 169.68$	0.001	$F_{(1,47)} = 19.78$	0.001
Genotype	$F_{(1,47)} = 9.48$	0.01	$F_{(1,47)} = 0.01$	n.s.	$F_{(1,47)} = 0.42$	n.s.
DxT	$F_{(9,47)} = 14.40$	0.001	$F_{(6,47)} = 35.03$	0.001	$F_{(4,47)} = 1.55$	n.s.
DxG	$F_{(9,47)} = 0.38$	n.s.	$F_{(6,47)} = 0.71$	n.s.	$F_{(4,47)} = 0.44$	n.s.
TxG	$F_{(1,47)} = 0.97$	n.s.	$F_{(1,47)} = 0.48$	n.s.	$F_{(1,47)} = 0.78$	n.s.
DxTxG	$F_{(9,47)} = 0.55$	n.s.	$F_{(6,47)} = 1.94$	n.s.	$F_{(4,47)} = 0.75$	n.s.

Three-way ANOVA repeated measures with treatment (T) and genotype (G) as between subject factors and day (D) as within-subject factor. See Materials and Methods for details.

Table 2. CB1 receptor binding of [³H]CP-55,940 (fmol/mg of tissue) in several brain regions of A_{2A} knockout mice and wild-type littermates.

Brain regions		Wild-type	A_{2A} knockout
Cerebral cortex	superficial layer (I)	94.28 ± 14.54	93.39 ± 4.58
	deep layer (VI)	93.09 ± 15.47	86.22 ± 5.33
Basal ganglia	lateral caudate-putamen	97.38 ± 18.10	95.23 ± 15.38
	medial caudate-putamen	73.52 ± 12.97	74.00 ± 7.99
	globus pallidus	254.47 ± 40.57	289.02 ± 38.74
	entopeduncular nucleus	199.39 ± 43.90	270.65 ± 45.29
	substantia nigra	216.52 ± 8.12	200.38 ± 15.78
Cerebellum	molecular layer	193.97 ± 25.70	182.08 ± 29.39
Hippocampus		83.13 ± 14.58	81.44 ± 9.35
Periaqueductal grey matter		67.68 ± 9.50	71.62 ± 19.27

Values are mean ± S.E.M. of 6 determinations per group. No significant differences were found between genotypes (one-way ANOVA with genotype as between factor).

Table 3. WIN-55,212-2-stimulated [³⁵S] GTPγS binding (% of stimulation of basal binding) in several brain regions of A_{2A} knockout mice and wild-type littermates.

Brain regions		Wild-type	A_{2A} knockout
Cerebral cortex	superficial layer (I)	20.70 ± 4.26	24.30 ± 4.51
	deep layer (VI)	30.39 ± 5.06	28.55 ± 3.54
Basal ganglia	lateral caudate-putamen	22.00 ± 3.56	19.65 ± 4.80
	medial caudate-putamen	16.80 ± 2.92	14.16 ± 3.68
	globus pallidus	86.32 ± 8.55	103.05 ± 11.96
	entopeduncular nucleus	102.52 ± 19.54	76.22 ± 6.73
	substantia nigra	64.21 ± 12.20	64.42 ± 9.31
Cerebellum	molecular layer	52.33 ± 7.62	50.30 ± 9.25
Hippocampus		23.56 ± 5.10	24.61 ± 2.67

Values are mean ± S.E.M. of 7 determinations per group. No significant differences were found between genotypes (one-way ANOVA with genotype as between factor).

Legends of the figures

Figure 1. Development of THC tolerance in A_{2A} knockout (KO) and wild-type (WT) mice. Development of tolerance during chronic THC treatment (20 mg/kg, i.p., twice daily, 5 days) was evaluated by measuring antinociceptive responses in the tail-immersion test (a), and changes in body temperature (b). Data are expressed as mean ± SEM in WT vehicle (white squares, *n* = 11), WT THC (white circles, *n* = 14), KO vehicle (black squares, *n* = 12) and KO THC (black circles, *n* = 13) mice. ★ *p* < 0.01; comparison between treatments (one-way ANOVA).

Figure 2. Loss of weight in A_{2A} knockout (KO) and wild-type (WT) mice during a chronic treatment with THC. (a), Daily loss of body weight (g) during 5 days of THC or vehicle treatment. Data are expressed as mean ± SEM of the difference between daily am measurement of body weight and each previous pm determination in WT vehicle (white squares, *n* = 11), WT THC (white circles, *n* = 14), KO vehicle (black squares, *n* = 12) and KO THC (black circles, *n* = 13) mice. Three-way ANOVA showed a significant effect of treatment (*p* < 0.01). (b), Body weight differences (g) measured after each injection of THC (20 mg/kg, i.p., twice daily, 5 days). Data are expressed as mean ± SEM in the different groups. ★ *p* < 0.01; comparison between treatments (one-way ANOVA).

Figure 3. SR141716A-precipitated THC withdrawal signs in A_{2A} knockout (KO) and wild-type (WT) mice. Withdrawal syndrome was precipitated by the administration of SR141716A (10 mg/kg, s.c.) or the corresponding vehicle (VEH) in mice receiving a chronic treatment of either vehicle or THC (20 mg/kg, i.p.). Counted (wet dog shakes, paw tremor, and writhes) and checked (ptosis, body tremor, hunched posture, piloerection, mastication and penile licking) signs of withdrawal were observed

45 min immediately after the SR141716A administration. The global withdrawal score was calculated for each animal by giving each individual sign a relative weight. Data are expressed as mean \pm SEM in WT (white bars, VEH-VEH $n = 10$, VEH-SR $n = 16$, THC-VEH $n = 5$, THC-SR $n = 18$) and KO (black bars, VEH-VEH $n = 10$, VEH-SR $n = 14$, THC-VEH $n = 6$, THC-SR $n = 19$) mice. ★ $p < 0.01$ (post-hoc comparison vs VEH-VEH group). ☆ $p < 0.025$ comparison between genotypes (one-way ANOVA).

Figure 4. THC conditioned place preference and aversion in A_{2A} knockout (KO) and wild-type (WT) mice. Results are expressed as mean \pm SEM of the time spent in the drug-paired compartment (sec) during the pre-conditioning phase (white bars) and post-conditioning phase (black bars). Conditioned place preference experiment: WT vehicle ($n = 15$), KO vehicle ($n = 17$), WT THC ($n = 13$), KO THC ($n = 17$). Conditioned place aversion: WT vehicle ($n = 12$), KO vehicle ($n = 12$), WT THC ($n = 13$), KO THC ($n = 17$). ★ $p < 0.05$; comparison between the time spent in the drug-paired compartment during the pre-conditioning and post-conditioning phase (two tailed paired Student's t-test)

Figure 5. Food maintained operant behaviour in A_{2A} knockout (KO) and wild-type (WT) mice Average of the number of nose-pokes in both the active and the inactive holes made in the three consecutive sessions (1 hour each) required to achieve the stability criteria in FR1 and FR3 schedule of reinforcement ★ $p < 0.025$ comparison between holes (one-way ANOVA).

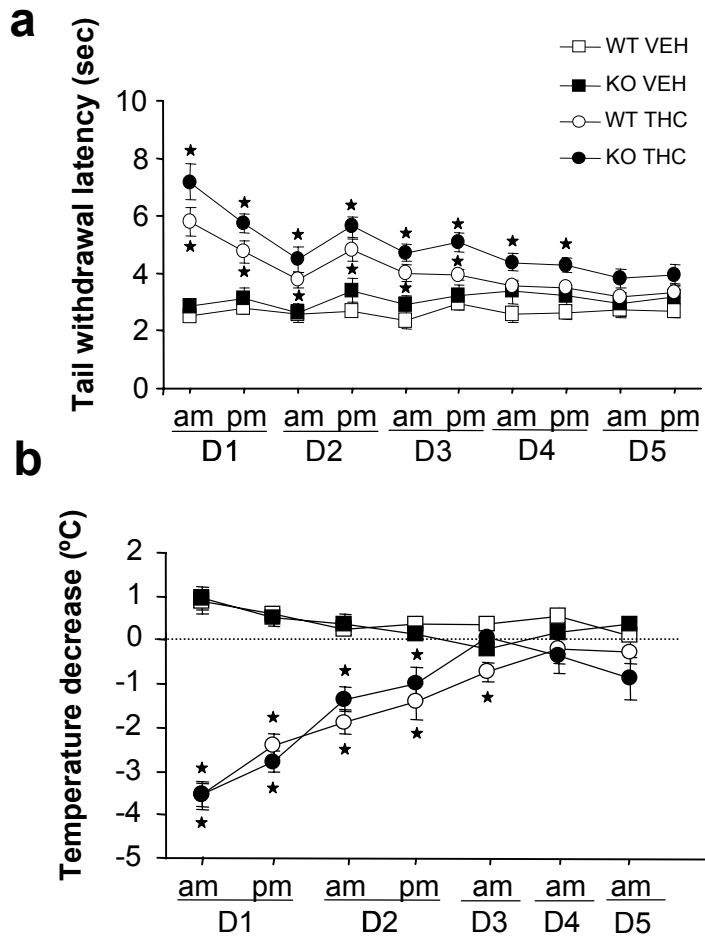
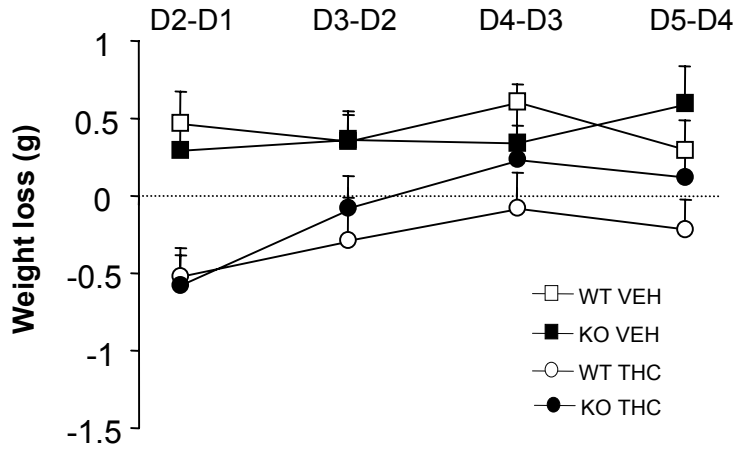


Figure 1. Soria et al.

a



b

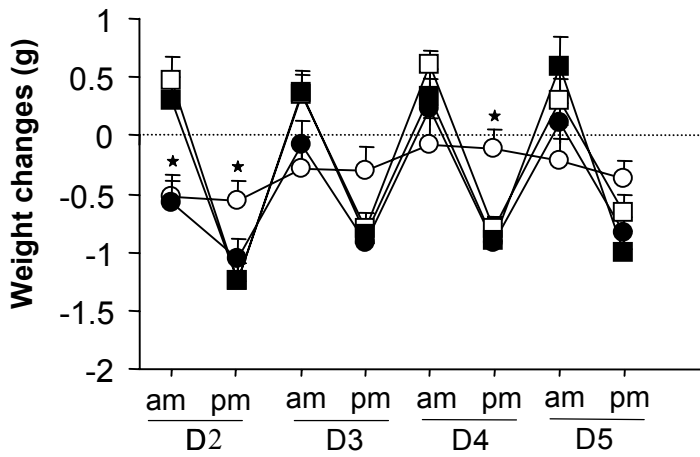


Figure 2. Soria et al.

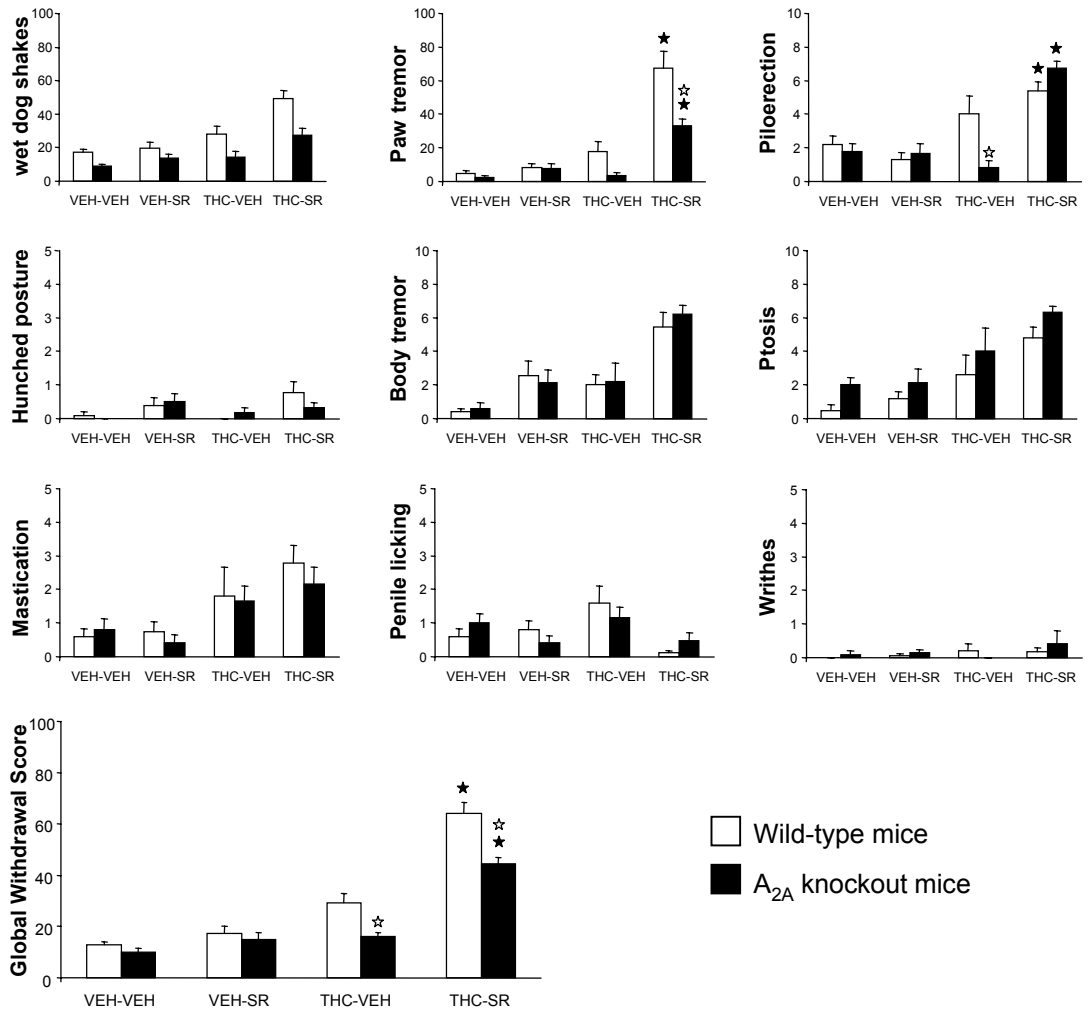


Figure 3. Soria et al.

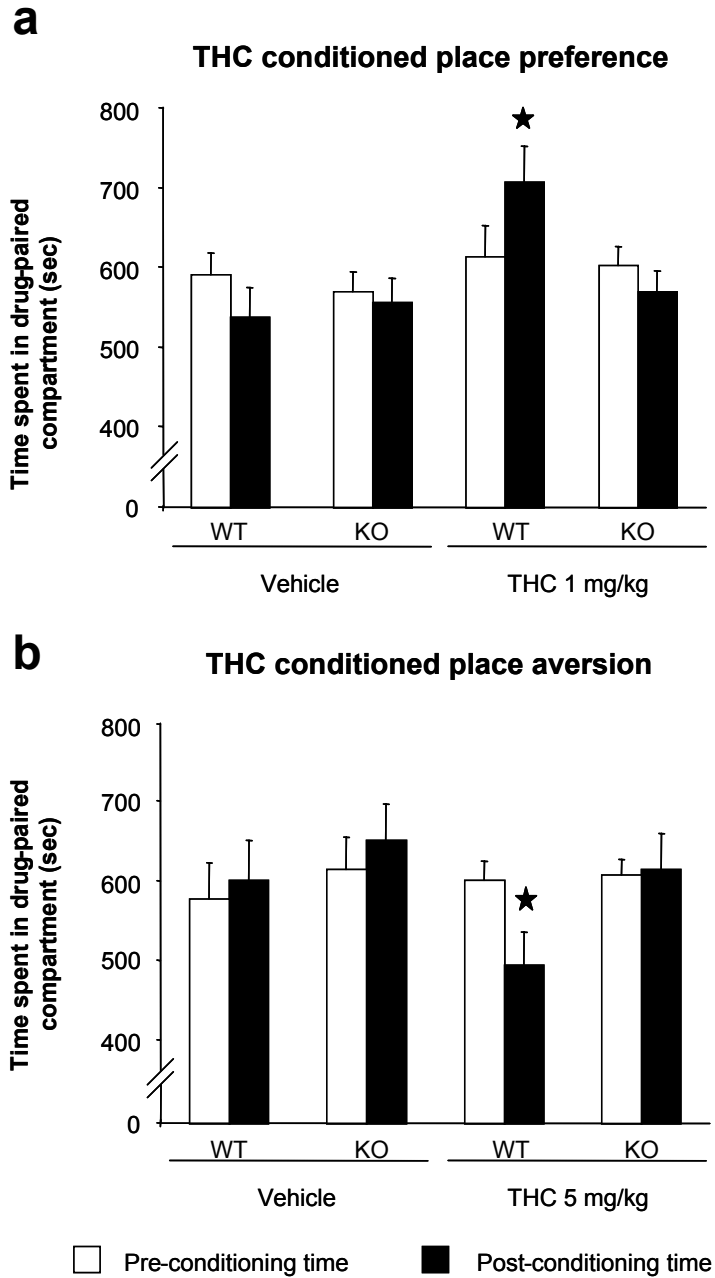


Figure 4. Soria et al.

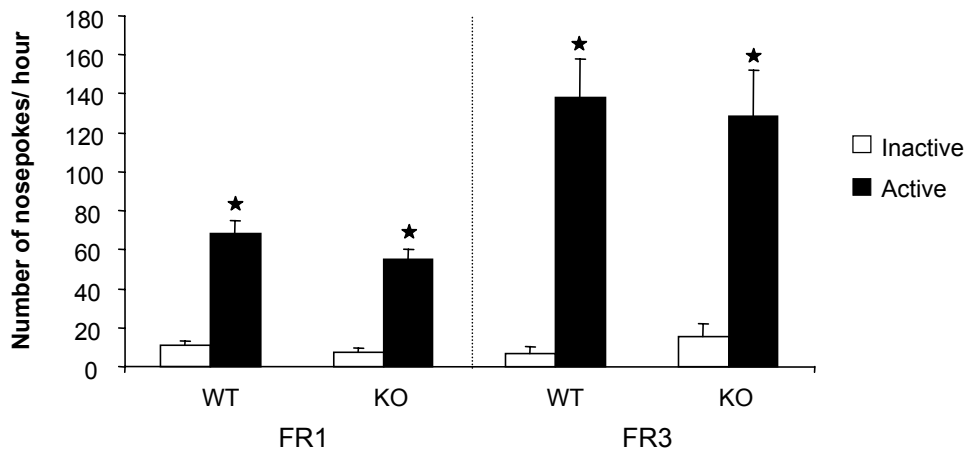


Figure 5. Soria et al.

Nicotina

"Un complemento habitual y sumamente importante en la vida del guerrillero es la fuma, ya sean tabacos, cigarros o picadura para la pipa, pues el humo que puede hechar en momentos de descanso es un gran compañero del soldado solitario".

Ernesto 'Che' Guevara

La nicotina es un alcaloide que se encuentra principalmente en plantas de la familia de las solanáceas tales como la patata, el tomate y el tabaco (Doolittle y cols., 1995). Este compuesto tiene un papel primordial en la iniciación y mantenimiento de la adicción del tabaco (Buisson y Bertrand, 2002). El potencial adictivo asociado al hábito de fumar es mayor que el de otras sustancias psicoactivas. No obstante, la nicotina ejerce otros efectos en el organismo. Así, se ha descrito que es capaz de modular la transmisión del dolor, el control del movimiento, los procesos cognitivos y las respuestas de tipo emocional (Picciotto y cols., 1995; File y cols., 2002; Decker y cols., 2004; Katner y cols., 2004; Sacco y cols., 2004).

La nicotina es un poderoso y potente agonista de varias subpoblaciones de receptores nicotínicos del sistema colinérgico (nAChRs) (Vidal, 1996; Paterson y Nordberg, 2000). Los receptores nicotínicos de acetilcolina pertenecen a la familia de canales iónicos que se activan mediante la unión de un ligando (Le Novère y Changeux, 1999). El ligando endógeno para los nAChRs es la acetilcolina. Existe una variedad de subtipos de nAChRs neuronales. Estos receptores se componen de cinco subunidades alrededor de un canal iónico. La unión del agonista hace que la conformación en reposo de las subunidades cambie y permita el flujo de iones de Na^+ , lo que causa despolarización de la célula (Corringer y cols., 2000).

En el cerebro, los receptores nicotínicos están situados principalmente en los terminales presinápticos y modulan la liberación de neurotransmisores. En consecuencia, los efectos de la nicotina pueden relacionarse con varios sistemas de neurotransmisión como los sistemas dopaminérgico, opioide, glutamatérgico, colinérgico y serotoninérgicos (Kenny y Markou, 2001; Malin, 2001). Asimismo, la nicotina promueve la síntesis de dopamina, al incrementar la expresión de tirosina hidroxilasa y su liberación, mediante la activación de AChRs somatodendríticos en las rutas dopaminérgicas nigroestriada y mesolímbica (Clarke y Pert, 1985; Panagis y cols., 2000).

Artículo 4

Attenuation of nicotine-induced rewarding effects in A_{2A} knockout mice. Castañé A, Soria G, Ledent C, Maldonado R, Valverde O. 2006. *Neuropharmacology*. (En prensa).

OBJETIVOS

- Investigar la participación del receptor purinérgico A_{2A} en los efectos farmacológicos de la nicotina en animales A_{2A} knockout.
- Estudiar las propiedades placenteras y discriminativas de la nicotina en estos animales, mediante el paradigma de condicionamiento espacial y la aversión condicionada al gusto, respectivamente.
- Evaluar la implicación del receptor A_{2A} en los efectos de la nicotina sobre el sistema dopaminérgico mediante la técnica de microdiálisis *in vivo* para determinar los niveles extracelulares de dopamina en el NAc.
- Estudiar el papel del receptor A_{2A} en los fenómenos de dependencia física de nicotina.

RESULTADOS

- No se observaron cambios significativos en la actividad locomotora, ni en la antinocicepción inducidas por la administración aguda de nicotina en los animales knockout deficientes en el receptor adenosina A_{2A} y wild-type.
- Los animales wild-type mostraron una preferencia de plaza inducida por nicotina que no fue observada en los animales A_{2A} knockout.
- Las propiedades discriminativas de la nicotina fueron preservadas en los ratones A_{2A} knockout.
- La expresión del síndrome de abstinencia de nicotina fue similar en los animales knockout deficientes en el receptor adenosina A_{2A} y en los animales wild-type.
- La administración aguda de nicotina indujo un aumento de los niveles extracelulares de dopamina en el núcleo accumbens en los animales wild-type que no fue observado en los ratones deficientes en el receptor de adenosina A_{2A}.

CONCLUSIÓN

- Los receptores de adenosina A2A regulan las propiedades de recompensa de la nicotina.
- Los receptores de adenosina A2A son requeridos para los efectos agudos de la nicotina sobre la transmisión dopaminérgica en el NAc.

Publicación definitiva:

Castane A, Soria G, Ledent C, Maldonado R, Valverde O.

[Attenuation of nicotine-induced rewarding effects in A\(2A\) knockout mice.](#)

Neuropharmacology. 2006 Sep;51(3):631-40. Epub 2006 Jun 21

http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6T0C-4K7FB4C-2&_coverDate=09%2F30%2F2006&_alid=457575454&_rdoc=1&_fmt=&_orig=search&_qd=1&_cdi=4859&_sort=d&view=c&_acct=C000053451&_version=1&_urlVersion=0&_userid=1517318&md5=01b880a2ed1cb0f6ad495c29617036bc

-----Mensaje original-----

De: Neuropharmacology [<mailto:neuropharm@elsevier.com>]

Enviado el: viernes, 05 de mayo de 2006 12:20

Para: VALVERDE, OLGA

Asunto: Your Submission

Ms. Ref. No.: NEUROPHARM-D-06-00066R1

Title: Attenuation of nicotine-induced rewarding effects in A2A knockout mice

Neuropharmacology

Dear OLGA VALVERDE, I am pleased to be able to tell you that your manuscript "Attenuation of nicotine-induced rewarding effects in A2A knockout mice" in its revised form is acceptable for publication in Neuropharmacology, and is being sent to press. We look forward to seeing your work in its final published form. Thank you for submitting this manuscript to Neuropharmacology, and I hope you will consider submitting future work of a similar nature to this Journal.

With kind regards,

Dawn Brittain

Journal Manager

Neuropharmacology

Elsevier Editorial System(tm) for Neuropharmacology

Manuscript Draft

Manuscript Number: NEUROPHARM-D-06-00066R1

Title: Attenuation of nicotine-induced rewarding effects in A2A knockout mice

Article Type: Research Paper

Section/Category:

Keywords: A2A adenosine receptors; knockout; nicotine; microdialysis; dopamine

Corresponding Author: OLGA VALVERDE,

Corresponding Author's Institution: Universitat Pompeu Fabra

First Author: Anna Castañé, PhD

Order of Authors: Anna Castañé, PhD; Guadalupe Soria; Catherine Ledent, PhD; Rafael Maldonado, MD PhD; Olga Valverde, MD PhD

Manuscript Region of Origin:

Attenuation of nicotine-induced rewarding effects in A_{2A} knockout mice

Anna Castañé^{1*}, Guadalupe Soria^{1*}, Catherine Ledent², Rafael Maldonado¹ and Olga Valverde^{1#}

To whom correspondence should be addressed: ovalverde@imim.es, telephone: 34 93 542 28 30, fax: 34 93 542 28 02

* These authors contributed equally to this work

¹ Laboratori de Neurofarmacologia, Departament de Ciències Experimentals i de la Salut, Universitat Pompeu Fabra, C/Doctor Aiguader 80, 08003 Barcelona, Spain

² IRIBHM, Université Libre de Bruxelles, B-1070 Bruxelles, Belgium

Keywords: A_{2A} adenosine receptors, knockout, nicotine, microdialysis, dopamine.

Abstract

The non-selective A_{2A} antagonist caffeine has been reported to modify nicotine-induced locomotor and reinforcing effects. In the present study, we have investigated the specific role of A_{2A} adenosine receptors in the behavioural responses induced by nicotine by using genetically modified mice lacking A_{2A} adenosine receptors. Acute nicotine administration induced a similar decrease of locomotor activity in A_{2A} knockout mice and wild-type littermates. Acute antinociceptive responses elicited by nicotine in the tail-immersion and hot-plate tests were unaffected in these mutant mice. The rewarding properties of nicotine were then investigated using the place-conditioning paradigm. Nicotine-induced conditioned place preference was suppressed in A_{2A} knockout mice. Accordingly, *in vivo* microdialysis studies revealed that the extracellular levels of dopamine in the nucleus accumbens were not increased after nicotine administration in mutant mice. Wild-type and A_{2A} knockout mice were trained in conditioned taste aversion procedure in which drinking a saccharin or saline solution was paired with nicotine or saline injections. A similar reduction in the intake of nicotine-paired solution in this paradigm was obtained in both genotypes. Finally, the administration of the nicotinic antagonist mecamylamine in nicotine-dependent mice precipitated a similar withdrawal syndrome in both genotypes. Together, the present results identify A_{2A} adenosine receptors as an important factor that contributes to the rewarding properties of nicotine.

Introduction

Nicotine is the main addictive component of tobacco smoke and the identification of the mechanisms involved in nicotine addictive effects is of particular relevance. Nicotine stimulates nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs), which are ligand-gated cation channels formed by the co-assembly of five different protein subunits (Le Novère et al., 2002). These receptors are widely expressed in the central and peripheral nervous system, and physiologically bind the neurotransmitter acetylcholine (ACh). In the central nervous system (CNS), nAChRs are mainly presynaptically located and facilitate the release of several important neurotransmitters such as ACh, dopamine (DA), noradrenaline, γ -aminobutyric acid (GABA) and glutamate (Wonnacott, 1997). Thus, nicotine by acting on nAChRs plays an important neuromodulatory role in the CNS and is involved in a large number of physiological and pathological processes including drug abuse (Wonnacott et al., 2005).

Adenosine is an inhibitory neuromodulator in the CNS that acts through four subtypes of G-protein-coupled adenosine receptors named A_1 , A_{2A} , A_{2B} and A_3 (Fredholm et al., 2001). Epidemiological data and pharmacological studies using caffeine, a non-selective adenosine antagonist at A_1 and A_{2A} receptors, have suggested the existence of possible interactions between the adenosine system and nicotine. Thus, smokers trend to consume more cigarettes while drinking coffee (Brown and Benowitz, 1989) and more caffeine than non-smokers (Swanson et al., 1994). Experimental data have revealed that caffeine enhances the motor stimulating effects of nicotine (Sudakov et al., 2003). Moreover, caffeine produced cross-sensitization to nicotine-induced hyperlocomotion in mice (Celik et al., 2006). Several studies have also investigated a possible interaction between nicotine and caffeine in addictive processes. In this sense, chronic exposure to caffeine facilitated the acquisition of nicotine self-administration behaviour (Shoaib et al., 1999) and the discriminative-stimulus effects of nicotine in rats (Gasior et al., 2000). Emerging evidence indicates that the adenosine system, particularly A_{2A} adenosine receptors, may be involved in the addictive properties of other drugs of abuse. Thus, we have recently shown that mice lacking A_{2A} adenosine receptors exhibit a reduction of THC-induced rewarding effects and rimonabant-precipitated THC withdrawal syndrome (Soria et al., 2004). Moreover, a decreased efficacy of cocaine reinforcing effects has been also shown in the self-administration paradigm in mice lacking A_{2A} adenosine receptors (Soria et al., 2006). The generation of A_{2A} receptor knockout mice with complete and

specific inactivation of the A_{2A} receptor (Ledent et al., 1997) provides a useful genetic model to investigate the role of A_{2A} receptors on nicotine pharmacological effects. The aim of this study was to investigate the possible involvement of A_{2A} adenosine receptors in the behavioural responses induced by nicotine related to the development of nicotine addiction.

Materials and methods

Animals

Mice lacking A_{2A} adenosine receptors were generated as previously reported (Ledent et al., 1997). In order to homogenize the genetic background of the mice, the first generation heterozygotes were backcrossed for 30 generations on a CD1 background (Charles River, France) with selection for the mutant A_{2A} gene at each generation. Heterozygote-heterozygote mating produced wild-type and knockout littermates for subsequent experiments. Breeding couples were periodically renovated by crossing heterozygote mice with wild-type CD1 females (Charles River, France) in order to maintain a genetically diverse outbred background. A_{2A} knockout mice and wild-type littermates (30-35 g) were housed five per cage in temperature (21 ± 1°C) and humidity (55 ± 10%)-controlled rooms, with a 12-h light/12-h dark cycle (light between 8:00 AM and 8:00 PM). Food and water were available *ad libitum*. Mice were handled for one week before starting the experiments. For the conditioned taste aversion paradigm mice were housed individually and were water restricted, as described in the corresponding section.

Animal procedures were conducted in accordance with the guidelines of the European Communities Directive 86/609/EEC regulating animal research and approved by the local ethical committee (CEEA-IMAS-UPF). All efforts were made to minimize the number of mice used and the suffering. All experiments were performed under blind conditions.

Drugs

(-)-Nicotine ([-]-1-methyl-2-[3-pyridyl]pyrrolidine) hydrogen tartrate salt and mecamylamine hydrochloride (Sigma Chemical Co., Madrid, Spain) were dissolved in physiological saline (0.9%), and administered in a volume of 10 ml/kg subcutaneously (s.c.). Ketamine chlorhydrate (100 mg/kg) (Imalgène 1000[®], Rhône Mérieux, Lyon, France) and xylazine hydrochloride (20 mg/kg) (Sigma Chemical Co., Madrid, Spain) were mixed and dissolved in ethanol and distilled water (1:9). The anaesthetic mixture was administered in an injection volume of 20 mg/kg body weight by intraperitoneal rout (i.p.). Nicotine doses are reported as nicotine hydrogen tartrate salt (1 mg/kg of nicotine hydrogen tartrate salt equals to 0.35087 mg/kg nicotine free base).

Acute effects induced by nicotine

Locomotor activity responses induced by nicotine hydrogen tartrate salt (1, 3 and 6 mg/kg, s.c.) or vehicle were evaluated by using locomotor activity boxes (9 x 20 x 11 cm) (Imetronic, Bordeaux, France). The boxes were provided with two lines of photocells, one 2 cm above the floor to measure horizontal activity, and the other located 6 cm above the floor to measure vertical activity (rears), in a low luminosity environment (5 lux). Mice were habituated to the locomotor cages during 10 min for three consecutive days. On the fourth day, 5 min after nicotine or vehicle injection, mice were placed in the locomotor activity boxes during 10 min.

Antinociceptive effects induced by the acute administration of nicotine hydrogen tartrate salt (1, 3 and 6 mg/kg, s.c.) or vehicle were evaluated 15 min after injection by using the tail-immersion test, as previously described (Simonin et al., 1998). The latency to a rapid tail-flick in the bath ($50 \pm 0.5^\circ\text{C}$) was registered with a cut-off latency of 15 sec in order to prevent tissue damage. Subsequently, the hot-plate test was performed 16 min after nicotine injection. Two nociceptive thresholds were evaluated in the hot-plate test: the licking of the hind paws and the first jump observed. 240-sec cut-off was used to prevent tissue damage. A glass cylinder was used to maintain the heated surface of the plate, which was kept at a temperature of $52 \pm 0.5^\circ\text{C}$ (Columbus Instruments, Columbus Ohio, USA).

Nicotine dependence and withdrawal

Nicotine dependence was induced by using Alzet osmotic minipumps (Model 2001; Alzet, Cupertino, CA, USA) as previously reported (Castañé et al., 2002). The minipumps containing saline or nicotine hydrogen tartrate salt were implanted s.c., and delivered a constant flow in a rate of 1 $\mu\text{l/h}$. The concentration of nicotine was adjusted to compensate for differences on body-weight of mice. Thus, average-weight mouse received a dose of approximately 10 mg/kg/day of nicotine hydrogen tartrate salt (first experimental condition) or 25 mg/kg/day of nicotine hydrogen tartrate salt (second experimental condition) over 7 days. After 6 days, the nicotine withdrawal syndrome was precipitated by injecting the nicotinic receptor antagonist, mecamylamine (1 mg/kg, s.c.). The somatic signs of withdrawal syndrome were evaluated 10 min before and 30 min after mecamylamine injection. The number of wet dog shakes, front paw tremors, and scratches was counted. Body tremor, ptosis, teeth chattering, genital licks, and piloerection were scored 1 for appearance or 0 for non-appearance within each 5 min period. The locomotor activity over 5 min periods was rated 0, 1, or 2 (0 for inactivity, 1 for low activity, and 2

for normal activity). The classification of locomotor activity as non activity, low activity or normal activity was made by scoring the trajectories and area crossed by the animal during each 5 min period. Less than 2 crossings during 5 min was considered as non activity, between 2 and 10 crossings during 5 min was considered low activity, and more than 10 crossings during 5 min was considered normal activity. A global withdrawal score was calculated for each animal by giving each individual sign a relative weight, as reported previously (Castañé et al., 2002).

Rewarding properties of nicotine in the place conditioning paradigm

The rewarding effects of nicotine were evaluated by using the conditioned place preference paradigm as previously described Maldonado et al. (1997). The apparatus consisted of two main square conditioning compartments with different texture and visual conditions (dotted walls with rough floor and stripped walls with smooth floor), separated by a triangular central division. During the pre-conditioning phase, each mouse was placed in the middle of the central division and had free access to both compartments of the conditioning apparatus for 18 min, with the time spent in each compartment recorded. The time in the central area was proportionally shared and added to the time value of each compartment. Treatments were counterbalanced between compartments to use an unbiased procedure. No initial place preference or aversion for the different compartments was observed. For the conditioning phase, mice were treated during 8 days with alternate injections of nicotine hydrogen tartrate salt 0.5 mg/kg (first experiment) and 1 mg/kg (second experiment) or saline. Mice were confined to the corresponding compartment immediately after injection for 20 min. Nicotine was administered on days 1, 3, 5, and 7, and saline was administered on days 2, 4, 6, and 8. Control animals received saline every day. The post-conditioning phase was conducted exactly as the pre-conditioning phase, i.e., free access to both compartments for 18 min, and the time spent in each compartment was recorded. No initial place preference or aversion for the different compartments was observed. In the first experimental condition, the time spent in both drug-paired and non drug-paired during the pre-conditioning phase was similar for wild-type ($t [1,25] = 1.405$; n.s.) and A_{2A} knockout ($t [1,27] = 1.901$; n.s.). Likewise, in the second experimental condition, the time spent in both drug-paired and non drug-paired during the pre-conditioning phase was similar for wild-type ($t [1,29] = -1.907$; n.s.) and A_{2A} knockout ($t [1,29] = -0.767$; n.s.).

Nicotine-induced conditioned taste aversion

The procedure was based on that previously described (Gommans et al., 2000) and was carried out in individualized mice home cages. Mice were trained to drink tap water for 30 min twice daily, once in the morning (between 9:30 and 11:00 h) and once in the afternoon (between 5:00 and 6:00 h). When the amount consumed was stable, conditioning phase began. Mice were presented only in the morning sessions of days 1 (trial 1) and 3 (trial 2) with either a sweet (sodium saccharin, 0.1%) or a saline (sodium chloride, 0.9%) solution. After drinking the solutions, mice were injected immediately with either nicotine tartrate salt (5 mg/kg, s.c.) or vehicle. To balance out effects due to inherent differences in palatability of the two flavours, half of the animals received nicotine paired with the saccharin flavour and, vehicle with the saline flavour, and half of the other animals received nicotine paired with saline, and vehicle with saccharin flavour. The two solutions were presented alternately and to balance out side preferences each flavour was presented once at the left side of the cage and once at the right side. During the afternoon drinking sessions and on days 2, 4 and 5, mice drank normal tap water. On day 6, two days after the last conditioning session, mice were presented with both solutions simultaneously and were free to choose the solution to drink. On day 7, the test was repeated and the left–right position of the two flavours was reversed to counterbalance possible side preferences. The mean of the nicotine-paired solution consumed in the two tests (days 6 and 7, trial 3) was calculated for both wild-type and knockout mice. In addition, we calculated the mean of the nicotine-paired solution consumed in the two tests as a percentage of the total fluid intake. Scores below 50 % indicated conditioned taste aversion.

Microdialysis procedure

Microdialysis study was performed as previously described (Robledo et al., 2004; Soria et al., 2005).

Surgery and sample recollection. Mice were anesthetized with a ketamine/xylazine mixture (0.2 ml/10g body weight i.p) and placed in a stereotaxic apparatus with a flat skull (Paxinos and Franklin, 1997). A small hole was drilled on the right side of the skull and the cannula guide (CMA/7, CMA Microdialysis, Stockholm, Sweden) was implanted vertically 1 mm above the nucleus accumbens (NAc) (AP: + 1.5 mm; ML: - 0.9 mm; DV: - 4.0 mm from the bregma), and then fixed to the skull with dental cement. Three days after

the surgery, the analytical probe (CMA/7/1mm, CMA Microdialysis, Stockholm, Sweden) was inserted into the guide cannula. Forty-eight hours after probe implantation, animals were habituated to the experimental environment overnight. The following morning, a ringer solution (147 mM NaCl, 4 mM KCl, 2.3 CaCl₂) was pumped through the dialysis probe at a constant rate of 1 μ l/min. Four consecutive 15-min dialysis samples were then collected for determination of baseline DA levels. Animals then received a s.c. injection of nicotine hydrogen tartrate salt (0.5 mg/kg, s.c.) or saline and 8 samples were collected every 18 min and analyzed by HPLC. Results were expressed as percent of baseline and the area under the curve (AUC).

Dopamine determination. Dialysate samples (15 μ l) were injected without any purification into a HPLC apparatus that consisted of a pump linked to an automatic injector (Agilent 1100, Barcelona, Spain), a reverse-phase column (Zorbax SB C18, 3.5 μ m, 150 x 4.6 mm, Agilent Technologies, Barcelona, Spain) and a coulometric detector (Coulochem II, ESA Inc., Chelmsford, USA) with a 5011 analytical cell to quantify DA. The first electrode was fixed at -100 mV and the second electrode at +300 mV. The composition of the mobile phase was 50 mM NaH₂PO₄, 0.1 mM Na₂EDTA, 0.65 mM octyl sodium sulfate and 14% (vol/vol) methanol, pH 3.5.

Histology. At the end of the experiments, animals were sacrificed and brains were quickly removed and stored at -80°C. In order to check the position of the probe, brains were cut using a cryostat in 20 μ m serial sections, which were then processed with cresyl violet and observed under a microscope. Only those animals that had been implanted correctly were used in the study.

Data analysis

Acute effects of nicotine administration, global withdrawal scores and conditioned taste aversion data were compared by using a between subjects two-way ANOVA (genotype and treatment as factors of variation). For conditioned place preference, values for time spent by each animal in drug-paired compartment during the pre-conditioning and post-conditioning measurements were compared by using a two-tailed Student's paired *t*-test. The microdialysis data were analyzed using three-way ANOVA with treatment (saline and nicotine) and genotype (wild-type and knockouts) as between subject factors and time after nicotine injection as within subject factor. Data of AUC were compared by using a between subjects two-way ANOVA (genotype and treatment as factors of variation).

Unpaired student *t*-test was employed to compare DA basal level values between genotypes. Differences were considered significant if the probability of error was less than 5%.

Results

Acute effects induced by nicotine

The acute administration of nicotine hydrogen tartrate salt (1, 3 and 6 mg/kg) decreased locomotor activity and induced antinociceptive responses in the hot-plate and tail-immersion tests in both wild-type and knockout animals ($n = 10$ for all experimental groups). No differences between genotypes were found for any of the acute responses evaluated. The acute injection of nicotine hydrogen tartrate salt (1, 3 and 6 mg/kg) reduced locomotor activity in a similar way in both genotypes (Fig. 1). Horizontal and vertical movements were measured. Two-way ANOVA for horizontal movements revealed a significant effect of treatment ($F [3,69] = 31.996; p < 0.01$), no effect of genotype ($F [1,69] = 0.845; n.s.$), nor interaction between these two factors ($F [3,69] = 1.744; n.s.$). Similarly, two-way ANOVA for vertical activity revealed a significant effect of treatment ($F [3,69] = 43.067; p < 0.01$), no effect of genotype ($F [1,69] = 1.261; n.s.$) nor interaction between these two factors ($F [3,69] = 4.291; p < 0.01$).

Nicotine-induced antinociceptive responses measured in the tail-immersion and hot-plate tests were similar in both wild-type and knockout animals (Table 1). In the tail-immersion test, two-way ANOVA revealed a significant effect of the treatment ($F [3,69] = 27.392; p < 0.01$), without genotype effect ($F [1,69] = 3.243; n.s.$) nor interaction between the two factors ($F [3,69] = 2.161; n.s.$). In the hot-plate test, two-way ANOVA for the licking response in the hot-plate test revealed a significant effect of the treatment ($F [3,69] = 7.955; p < 0.01$), without genotype effect ($F [1,69] = 0.003; n.s.$) nor interaction between genotype and treatment ($F [3,69] = 0.876; n.s.$). Similarly, two-way ANOVA for the jumping response revealed a significant effect of treatment ($F [3,69] = 22.868; p < 0.01$), without genotype effect ($F [1,69] = 2.650; n.s.$) nor interaction between the two factors ($F [3,69] = 1.517; n.s.$) (Table 1).

Nicotine dependence and withdrawal

During the behavioural observation performed before mecamylamine administration, no somatic signs of withdrawal were observed in any group of mice (data not shown). After mecamylamine (1 mg/kg) injection, nicotine withdrawal syndrome was manifested by the presence of various somatic signs in mice receiving chronic nicotine hydrogen tartrate salt treatment (10 and 25 mg/kg/day for 6 days) ($n = 31$ for saline-treated

wild-type mice, $n = 28$ for saline-treated knockout mice, $n = 16$ for wild-type and knockout mice treated with 10 mg/kg, $n = 14$ for wild-type and knockout mice treated with 25 mg/kg). The severity of the withdrawal syndrome was similar in both genotypes for both doses tested (Fig. 2). Thus, analysis of the different individual signs of withdrawal revealed no differences between genotypes (Table 2). When the global withdrawal score was calculated, two-way ANOVA showed a significant effect of treatment ($F [2,113] = 30.331$; $p < 0.01$), no effect of genotype ($F [1,113] = 0.01$; n.s.) nor interaction between these two factors ($F [2,113] = 0.337$; n.s.).

Rewarding properties of nicotine in the place conditioning paradigm

Rewarding effects induced by nicotine were investigated in A_{2A} knockout and wild-type mice using the place conditioning paradigm ($n = 13-14$ for wild-type groups, $n = 14$ for knockout groups). A significant conditioned place preference was observed in wild-type mice treated with nicotine hydrogen tartrate salt (0.5 mg/kg), as revealed by a significant increase in the time spent in the drug-paired compartment in the post-conditioning versus the pre-conditioning phase ($t [1,13] = -3.722$; $p < 0.05$). In contrast, A_{2A} knockout mice spent a similar time in the drug-paired compartment during the post-conditioning and the pre-conditioning phases, demonstrating the absence of nicotine rewarding effects in these mutants ($t [1,14] = -0.485$; n.s.) (Fig. 3a). A higher dose of nicotine hydrogen tartrate salt (1 mg/kg) was also tested. However, no conditioned response was observed after the administration of this dose of nicotine in wild-type ($t [1,13] = -1.309$; n.s.) nor in A_{2A} knockout mice ($t [1,13] = -1.019$; n.s.) (Fig. 3b).

Nicotine conditioned taste aversion

Figure 4 shows that there was a similar conditioned taste aversion to nicotine hydrogen tartrate salt (5 mg/kg) in both wild-type and A_{2A} knockout mice ($n = 10$ for saline-treated wild-type mice, $n = 12$ for nicotine-treated wild-type mice, $n = 10$ for saline-treated knockout mice and $n = 12$ for nicotine-treated knockout mice). The consumption of drug-paired flavoured solutions decreased in nicotine-treated wild-type and A_{2A} knockout mice compared to saline-treated mice during trials 2 and 3 (Fig. 4a). Two-way ANOVA for trial 2 showed a significant effect of treatment ($F [1,40] = 62.274$; $p < 0.01$), but no effect of genotype ($F [1,40] = 0.536$; n.s.), nor interaction between these two factors ($F [1,40] = 0.320$; n.s.). Two-way ANOVA for trial 3 showed a significant effect of treatment (F

[1,40] = 39.206; $p < 0.01$), but no effect of genotype (F [1,40] = 0.274; n.s.), nor interaction between these two factors (F [1,40] = 0.447; n.s.). The percentage of consumption of drug-paired flavoured solution in trial 3 was similarly decreased in wild-type and A_{2A} knockout mice treated with nicotine when compared to saline-treated animals (Fig. 4b). Two-way ANOVA for the percentage of consumption in trial 3 revealed a significant effect of treatment (F [1,40] = 30.295; $p < 0.01$), but no effect of genotype (F [1,40] = 1.319; n.s.), nor interaction between these two factors (F [1,40] = 1.226; n.s.)

Nicotine-induced increase of extracellular levels of dopamine in the nucleus accumbens

Extracellular levels of DA in the NAc were measured by using microdialysis technique ($n = 5$ for saline-treated wild-type mice, $n = 8$ for saline-treated knockout mice, $n = 6$ for nicotine-treated wild-type mice, $n = 7$ for nicotine-treated knockout mice). Basal levels of DA in NAc dialysates were similar in wild-type (4.48 ± 0.78 pg/18 μ l) and A_{2A} knockout mice (7.18 ± 2.26 pg/18 μ l) (F [1,25] = 0.97; n.s.). As shown in figure 5a, nicotine hydrogen tartrate salt administration (0.5 mg/kg) increased DA in NAc dialysates in wild-type animals but not in A_{2A} knockout mice. The maximal increase of DA induced by nicotine in the NAc of wild-type mice (160.8%) was significantly different from that of knockout mice (106.3%) (F [1,12] = 9.102; $p \neq 0.01$). Three-way ANOVA revealed a main effect of genotype (F [1,22] = 10.073; $p < 0.01$), treatment (F [1,22] = 4.543; $p < 0.05$) and a significant interaction between time and genotype (F [7,154] = 2.871; $p \neq 0.01$). No other significant two- or three-way interactions among factors were observed. Similar results were obtained when analyzing the AUC values for DA extracellular levels after nicotine hydrogen tartrate (0.5 mg/kg) or saline administration (Fig. 5b). Thus, two-way ANOVA indicated significant treatment effect (F [1,22] = 4.056; $p \neq 0.05$), genotype effect (F [1,22] = 7.045; $p < 0.05$), but not interaction between these two factors (F [1,22] = 1.312; n.s.).

Figure 6 shows a representative coronal section of the mouse brain with the placement of the microdialysis probe through the NAc. Most of the probes were located medial to the anterior commissure, between 1.94 and 1.18 mm from bregma, and dorsal to the olfactory tubercle.

Discussion

The present study demonstrates the role of A_{2A} adenosine receptors in the rewarding properties of nicotine. Nicotine-induced conditioned place preference and enhanced extracellular levels of DA in the NAc were abolished in A_{2A} knockout. However, these mutant mice showed similar locomotor and antinociceptive effects induced by an acute injection of nicotine, and similar nicotine taste aversion as well as somatic manifestations of nicotine withdrawal syndrome in comparison to wild-type mice.

Deletion of A_{2A} adenosine receptors did not modify the main acute responses induced by nicotine. Thus, acute nicotine administration produced similar hypolocomotion and antinociceptive effects in the tail-immersion and hot-plate tests in wild-type and knockout animals, suggesting that A_{2A} adenosine receptors do not participate in these pharmacological responses. The lower basal locomotor activity observed in mice lacking A_{2A} adenosine receptors is in agreement with previous studies showing a hypolocomotor phenotype on these mice (Ledent et al., 1997; Soria et al., 2004; 2006). A recent study has reported that pharmacological blockade of adenosine receptors by theophylline decreases nicotine-induced antinociception in the formalin test (Homayounfar et al., 2005). This apparent controversy can be explained by the different tests used and because theophylline is a non-selective adenosine receptor antagonist also acting on other targets.

We have investigated, in A_{2A} knockout mice, different responses induced by repeated nicotine administration in relation to its addictive properties. Chronic administration of a wide range of doses of nicotine, has been shown to develop physical dependence revealed by the incidence of several somatic signs after nicotine withdrawal in rodents (Hildebrand et al., 1998; Isola et al., 1999; Castañé et al., 2002; Damaj et al., 2003; Grabus et al., 2005). In our experimental conditions, the nAChR antagonist mecamylamine precipitated a withdrawal syndrome with a similar severity in wild-type and knockout mice chronically treated with nicotine hydrogen tartrate salt (10 and 25 mg/kg/day). This finding suggests that the A_{2A} adenosine receptors do not participate in the expression of somatic component of nicotine withdrawal.

Acute rewarding effects of drugs of abuse are known to be responsible for the initiation of the addictive process (Koob and Le Moal, 2001). The acute rewarding properties of nicotine were investigated in A_{2A} knockout mice by using the place-conditioning paradigm. In our experimental conditions, nicotine hydrogen tartrate at the dose of 0.5 mg/kg induced a significant place preference in wild-type mice, but failed to produce a significant effect in mice lacking A_{2A} adenosine receptors. The administration of

a higher dose of nicotine hydrogen tartrate (1 mg/kg) did not produce place preference in wild-type nor in A_{2A} knockout mice. This result rules out the possibility that the genetic deletion of the A_{2A} receptor resulted in a rightward shift of the nicotine dose-response curve. In addition, the impairment of knockout mice to express nicotine-induced conditioned place preference does not seem to be the consequence of a learning or discriminative alteration since nicotine conditioned taste aversion was similarly developed in both genotypes. Moreover we have recently demonstrated that A_{2A} knockout mice express cocaine-induced conditioned place preference and are able to maintain an operant responding for food and cocaine (Soria et al., 2004; 2006). Taken together these results indicate that A_{2A} receptors are involved in a different manner in the addictive properties induced by the different drugs of abuse.

Like most drugs of abuse, nicotine rewarding properties have been related to the activation of the mesolimbic dopaminergic system, and the consequent increase of extracellular levels of DA in the NAc (Di Chiara and Imperato, 1988; Pontieri et al., 1996; Zocchi et al., 2003). On the other, the discriminative stimulus effects of nicotine, despite showing some modification with dopaminergic compounds, appear not to be solely mediated via the mesolimbic dopamine system (for review, see Shoaib, 1998). Accordingly with our behavioural data, *in vivo* microdialysis experiments showed that the enhancement in DA efflux in the NAc induced by nicotine in wild-type mice was abolished in A_{2A} knockout animals.

NACHRs are present on the presynaptic glutamatergic terminals in the ventral tegmental area (VTA). Nicotine directly stimulates these VTA glutamatergic terminals, in addition to an activation of postsynaptic nicotine receptors located on DA neurons (Mansvelder et al., 2003). Besides, nicotine also binds to nAChRs expressed by the GABA interneurons in the VTA. Thus, the final activation of the mesolimbic dopaminergic activity by nicotine depends on a functional balance between the excitatory and inhibitory inputs on the VTA DA neurons (Mansvelder et al., 2003; Laviolette and Van der Kooy, 2004). It has been recently reported that the increase in glutamatergic activity in response to nicotine administration causes adaptive changes by up-regulating metabotropic glutamate group I receptors in the amygdala (i.e. mGlu1 and mGlu5 receptors) (Kane et al., 2005). In this line, a specific mGlu5 receptor antagonist MPEP decreased nicotine self-administration (Paterson et al., 2003; Paterson and Markou, 2005), and the reinstatement of this behaviour in rodents (Tessari et al., 2004; Bespalov et al., 2005), providing further

support for the involvement of mGlu5 receptor in nicotine reinforcing effects. Interestingly, mGlu5 receptors regulate adenosine A_{2A} receptor signaling in neostriatal neurons (Nishi et al., 2003), and morphological data suggest that A_{2A} , mGlu5 and D2 DA receptors colocalize at a pre- and post-synaptical level in the striatum (Díaz-Cabiale et al., 2002; Agnati et al., 2003; Rodrigues et al., 2005). In this regard, A_{2A} and mGlu5 receptors have been reported to be co-located in striatal glutamatergic terminals, which facilitates glutamate release in a synergistic manner (Rodrigues et al., 2005). Thus, we cannot exclude the possibility that the absence of A_{2A} adenosine receptors may impair glutamate transmission also in the VTA affecting dopamine efflux in the NAc. In addition, other different behavioural and biochemical models have demonstrated the existence of functionally significant antagonistic $A_{2A}/D2$ and mGlu5/D2 receptor interactions and synergistic $A_{2A}/mGlu5$ receptor interactions (for review see Agnati et al., 2003).

The major signal transduction pathway used by A_{2A} receptors depends on the activation of adenylyl cyclase and cAMP-dependent protein kinase (PKA) enzymes (Kull et al., 2000), which in turn regulates the state of phosphorylation of various substrate proteins such as DARPP32, CREB and MAPK. DARPP32 is a signal transduction molecule that plays an important role in neuronal plasticity associated to drug addiction (Gould and Manji, 2005), and that has been reported to be altered in mice lacking A_{2A} adenosine receptors (Svenningsson et al., 2000). The coactivation of A_{2A} and mGlu5 receptors produces synergistic effect on DARPP32 phosphorylation induced by PKA. Both A_{2A} and mGlu5 receptors have been related to long-term potentiation and long-term depression processes (d'Alcantara et al., 2001, Sung et al., 2001), suggesting that $A_{2A}/mGlu5$ receptor interaction might be involved in striatal neuronal plasticity (Agnati et al., 2003). Since nicotine regulates DARPP32 phosphorylation in neostriatal neurons (Hamada et al., 2004, 2005), we postulate that mice lacking A_{2A} adenosine receptors may have a disruption on the $A_{2A}/mGlu5$ receptor synergism needed to complete some of the intracellular responses induced by nicotine. This alteration may underlie the behavioural and biochemical differences observed in the present study. Interestingly, we have recently reported that the rewarding and aversive effects of THC (Soria et al., 2004) as well as the reinforcing efficacy of cocaine (Soria et al., 2006) are reduced in A_{2A} knockout mice. In agreement, Andersson and colleagues (2005) have shown that intact A_{2A} adenosine receptor transmission, involving cAMP/PKA/DARPP32 cascade, is required for the biochemical and behavioural effects of the cannabinoid agonist CP55,940. Similarly to

cannabinoids, a critical role for DARPP32 has been reported in long-term effects of different drugs of abuse such as psychostimulants (Valjent et al., 2005).

Altogether, these results suggest the possibility that A_{2A} adenosine receptors play an important role in the rewarding properties of nicotine and other drugs of abuse, as it has been demonstrated in previous findings with THC and cocaine (Soria et al., 2004; 2006). Indeed, we have shown that A_{2A} adenosine receptors are involved in the acute rewarding properties of THC and nicotine as well as in the motivation to seek cocaine. It is well known that place conditioning procedures and self-administration paradigms are used to study different aspects of reward. Place conditioning procedures allow to evaluate an indirect measurement of the acute rewarding properties of a drug. Self-administration procedures are complex models that permit to directly determine the reinforcing properties of a drug of abuse by using several paradigms that resemble the drug-taking in humans. Taking into account the present and previous results, we postulate that A_{2A} adenosine receptors play an important role in the rewarding properties of several drugs of abuse. The different mechanism of action of each drug might account to explain the different role of A_{2A} adenosine receptors observed in the rewarding properties of psychostimulants, like cocaine, and other drugs of abuse, such as THC and nicotine.

Acknowledgements

This study was supported by grants from Spanish Ministerio de Educación y Ciencia (SAF 2004/568, BFU2004-00920/BFI and GEN2003-20651-C06-04), Generalitat de Catalunya (2002 SGR00193), Redes del Instituto Carlos III (C 03/06 and G 03/005), European Communities (NEWMOOD OJ2003/C164-05166, GENADDICT LSHM-CT-2004-005166) and NIH (Extra-mural research project #DA016768). GS is a fellowship from Spanish MCYT and AC was a fellowship from DURSI.

References

- Agnati, L. F., Ferré, S., Lluís, C., Franco, R., Fuxe, K., 2003. Molecular mechanisms and therapeutical implications of intramembrane receptor/receptor interactions among heptahelical receptors with examples from the striatopallidal GABA neurons. *Pharmacol. Rev.* 55, 509-550.
- Andersson, M., Usiello, M., Borgkvist, A., Pozzi, L., Dominguez, C., Fienberg, A. A., Svenningsson, P., Fredholm, B. B., Borrelli, E., Greengard, P., Fisone, G., 2005. Cannabinoid Action Depends on Phosphorylation of Dopamine- and cAMP-Regulated Phosphoprotein of 32 kDa at the Protein Kinase A Site in Striatal Projection Neurons. *J Neurosci.* 25, 8432-8438.
- Bespalov, A. Y., Dravolina, O. A., Sukhanov, I., Zakharova, E., Blokhina, E., Zvartau, E., Danysz, W., Van Heeke, G., Markou, A., 2005. Metabotropic glutamate receptor (mGluR5) antagonist MPEP attenuated cue- and schedule-induced reinstatement of nicotine self-administration behavior in rats. *Neuropharmacology.* 49, 167-178.
- Brown, C. R., Benowitz, N. L., 1989. Caffeine and cigarette smoking: behavioral, cardiovascular, and metabolic interactions. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 34, 565-570.
- Castañé, A., Valjent, E., Ledent, C., Parmentier, M., Maldonado, R., Valverde, O., 2002. Lack of CB1 cannabinoid receptors modifies nicotine behavioural responses, but not nicotine abstinence. *Neuropharmacology* 43, 857-867.
- Celik, E., Uzbay, I. T., Karakas, S., 2006. Caffeine and amphetamine produce cross-sensitization to nicotine-induced locomotor activity in mice. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry.* 30, 50-55.
- d'Alcantara, P., Ledent, C., Swillens, S., Schiffmann, S. N., 2001. Inactivation of adenosine A2A receptor impairs long term potentiation in the accumbens nucleus without altering basal synaptic transmission. *Neuroscience* 107, 455-464.
- Damaj, M.I., Kao, W., Martin, B.R. 2003. Characterization of spontaneous and precipitated nicotine withdrawal in the mouse. *J Pharmacol Exp Ther.* 307, 526-534.
- Di Chiara, G., Imperato, A., 1988. Drugs abused by humans preferentially increase synaptic DA concentrations in the mesolimbic system of freely moving rats. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 5274-5278.

Díaz-Cabiale, Z., Vivo, M., Del Arco, A., O'Connor, W. T., Harte, M. K., Muller, C. E., Martínez, E., Popoli, P., Fuxe, K., Ferré, S., 2002. Metabotropic glutamate mGlu5 receptor-mediated modulation of the ventral striopallidal GABA pathway in rats. Interactions with adenosine A(2A) and dopamine D(2) receptors. *Neurosci. Lett.* 324, 154-158.

Fredholm, B. B., Ijzerman, A. P., Jacobson, K. A., Klotz, K. N., Linden, J., 2001. International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacol. Rev.* 53, 527-552.

Gasior, M., Jaszyna, M., Peters, J., Goldberg, S. R., 2000. Changes in the ambulatory activity and discriminative stimulus effects of psychostimulant drugs in rats chronically exposed to caffeine: effect of caffeine dose. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 295., 1101-1111.

Gommans, J., Stoleran, I.P., Shoaib, M., 2000. Antagonism of the discriminative and aversive stimulus properties of nicotine in C57BL/6J mice. *Neuropharmacology* 39, 2840-2847.

Gould, T. D., Manji, H. K., 2005. DARPP-32: A molecular switch at the nexus of reward pathway plasticity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 253-254.

Grabus, S.D., Martin, B.R., Batman, A.M., Tyndale, R.F., Sellers, E., Damaj, M.I., 2005. Nicotine physical dependence and tolerance in the mouse following chronic oral administration. *Psychopharmacology* 178, 1831-92.

Hamada, M., Hendrick, J. P., Ryan, G. R., Kuroiwa, M., Higashi, H., Tanaka, M., Nairn, A. C., Greengard, P., Nishi, A., 2005. Nicotine regulates DARPP-32 phosphorylation at multiple sites in neostriatal neurons. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 315, 872-878.

Hamada, M., Higashi, H., Nairn, A. C., Greengard, P., Nishi, A., 2004. Differential regulation of dopamine D1 and D2 signaling by nicotine in neostriatal neurons. *J. Neurochem.* 90, 1094-1103.

Hildebrand, B. E., Nomikos, G. G., Hertel, P., Schilstrom, B., Svensson, T. H., 1998. Reduced dopamine output in the nucleus accumbens but not in the medial prefrontal cortex in rats displaying a mecamylamine-precipitated nicotine withdrawal syndrome. *Brain Res.* 779, 214-225.

- Homayounfar, H., Jamali-Raeufy, N., Sahebgharani, M., Zarrindast, M. R., 2005. Adenosine receptor mediates nicotine-induced antinociception in formalin test. *Pharmacol. Res.* 51, 197-203.
- Isola, R., Vogelsberg, V., Wemlinger, T. A., Neff, N. H., Hadjiconstantinou, M., 1999. Nicotine abstinence in the mouse. *Brain Res.* 850, 189-196.
- Kane, J. K., Hwang, Y., Konu, O., Loughlin, S. E., Leslie, F. M., Li, M. D., 2005. Regulation of Homer and group I metabotropic glutamate receptors by nicotine. *Eur. J. Neurosci.* 21, 1145-1154.
- Koob, G. F. & Le Moal, M., 2001. Drug addiction, dysregulation of reward, and allostasis. *Neuropsychopharmacology* 24, 97-129.
- Kull, B., Svenningsson, P., Fredholm, B. B., 2000. Adenosine A(2A) receptors are colocalized with and activate g(olf) in rat striatum. *Mol. Pharmacol.* 58, 771-777.
- Laviolette, S. R., Van Der Kooy, D., 2004. The neurobiology of nicotine addiction: bridging the gap from molecules to behaviour. *Nat. Rev. Neurosci.* 5, 55-65.
- Le Novère, N., Corringer, P. J., Changeux, J. P., 2002. The diversity of subunit composition in nAChRs: evolutionary origins, physiologic and pharmacologic consequences. *J. Neurobiol.* 53, 447-456.
- Ledent, C., Vaugeois, J. M., Schiffmann, S. N., Pedrazzini, T., El Yacoubi, M., Vanderhaeghen, J. J., Costentin, J., Heath, J. K., Vassart, G., Parmentier, M., 1997. Aggressiveness, hypoalgesia and high blood pressure in mice lacking the adenosine A2a receptor. *Nature.* 388, 674-678.
- Maldonado, R., Saiardi, A., Valverde, O., Samad, T. A., Roques, B.P., Borrelli, E., 1997. Absence of opiate rewarding effects in mice lacking dopamine D2 receptors. *Nature* 388, 586-589.
- Mansvelder, H. D., De Rover, M., McGehee, D. S., Brussaard, A. B., 2003. Cholinergic modulation of dopaminergic reward areas: upstream and downstream targets of nicotine addiction. *Eur. J. Pharmacol.* 480, 117-123.
- Nishi, A., Liu, F., Matsuyama, S., Hamada, M., Higashi, H., Nairn, A. C., Greengard, P., 2003. Metabotropic mGlu5 receptors regulate adenosine A2A receptor signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 100, 1322-1327.

- Paterson, N. E., Markou, A., 2005. The metabotropic glutamate receptor 5 antagonist MPEP decreased break points for nicotine, cocaine and food in rats. *Psychopharmacology* 179, 255-261.
- Paterson, N. E., Semenova, S., Gasparini, F., Markou, A., 2003. The mGluR5 antagonist MPEP decreased nicotine self-administration in rats and mice. *Psychopharmacology* 167, 257-264.
- Paxinos G, Franklin K. B. J. 1997., *The mouse brain in stereotaxic coordinates*. San Diego: Academic. 1 : 268-272.
- Pontieri, F. E., Tanda, G., Orzi, F., Di Chiara, G., 1996. Effects of nicotine on the nucleus accumbens and similarity to those of addictive drugs. *Nature* 382, 255-257.
- Robledo, P., Mendizábal, V., Ortuño, J., de la Torre, R., Kieffer, B. L., Maldonado, R., 2004. The rewarding properties of MDMA are preserved in mice lacking mu-opioid receptors. *Eur. J. Neurosci.* 20, 853-858.
- Rodrigues, R. J., Alfaro, T. M., Rebola, N., Oliveira, C. R., Cunha, R. A., 2005. Co-localization and functional interaction between adenosine A(2A) and metabotropic group 5 receptors in glutamatergic nerve terminals of the rat striatum. *J. Neurochem.* 92, 433-441.
- Shoaib, M., 1998. Is dopamine important in nicotine dependence? *J. Physiol. Paris* 92, 9-33.
- Shoaib, M., Swanner, L. S., Yasar, S., Goldberg, S. R., 1999. Chronic caffeine exposure potentiates nicotine self-administration in rats. *Psychopharmacology* 142, 327-333.
- Simonin, F., Valverde, O., Smadja, C., Slowe, S., Kitchen, I., Dierich, A., Le Meur, M., Roques, B. P., Maldonado, R., Kieffer, B. L., 1998. Disruption of the kappa-opioid receptor gene in mice enhances sensitivity to chemical visceral pain, impairs pharmacological actions of the selective kappa-agonist U-50,488H and attenuates morphine withdrawal. *EMBO J.* 17, 886-897.
- Soria, G., Castañé, A., Berrendero, F., Ledent, C., Parmentier, M., Maldonado, R., Valverde, O., 2004. Adenosine A2A receptors are involved in physical dependence and place conditioning induced by THC. *Eur. J. Neurosci.* 20, 2203-2213.
- Soria, G., Castañé, A., Ledent, C., Parmentier, M., Maldonado, R., Valverde, O., 2006. The Lack of A(2A) Adenosine Receptors Diminishes the Reinforcing Efficacy of Cocaine. *Neuropsychopharmacology* 31, 978-87.

- Soria, G., Mendizábal, V., Touriño, C., Robledo, P., Maldonado, R., Valverde, O., 2005. Lack of CB1 cannabinoid receptor impairs cocaine self-administration. *Neuropsychopharmacology* 30, 1670-1680.
- Sudakov, S. K., Rusakova, I. V., Medvedeva, O. F., 2003. Effect of chronic caffeine consumption on changes in locomotor activity of WAG/G and Fischer-344 rats induced by nicotine, ethanol, and morphine. *Bull. Exp. Biol. Med.* 136, 563-565.
- Sung, K. W., Choi, S., Lovinger, D. M., 2001. Activation of group I mGluRs is necessary for induction of long-term depression at striatal synapses. *J. Neurophysiol.* 86, 2405-2412.
- Svenningsson, P., Lindskog, M., Ledent, C., Parmentier, M., Greengard, P., Fredholm, B. B., Fisone, G., 2000. Regulation of the phosphorylation of the dopamine- and cAMP-regulated phosphoprotein of 32 kDa in vivo by dopamine D1, dopamine D2, and adenosine A2A receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 1856-1860.
- Swanson, J. A., Lee, J. W., Hopp, J. W., 1994. Caffeine and nicotine: a review of their joint use and possible interactive effects in tobacco withdrawal. *Addict. Behav.* 19, 229-256.
- Tessari, M., Pilla, M., Andreoli, M., Hutcheson, D. M., Heidbreder, C. A., 2004. Antagonism at metabotropic glutamate 5 receptors inhibits nicotine- and cocaine-taking behaviours and prevents nicotine-triggered relapse to nicotine-seeking. *Eur.J.Pharmacol.* 499, 121-133.
- Valjent, E., Pascoli, V., Svenningsson, P., Paul, S., Enslen, H., Corvol, J. C., Stipanovich, A., Caboche, J., Lombroso, P. J., Nairn, A. C., Greengard, P., Herve, D., Girault, J. A., 2005. Regulation of a protein phosphatase cascade allows convergent dopamine and glutamate signals to activate ERK in the striatum. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 102, 491-496.
- Wonnacott, S., 1997. Presynaptic nicotinic ACh receptors. *Trends Neurosci.* 20, 92-98.
- Wonnacott, S., Sidhpura, N., Balfour, D. J., 2005. Nicotine: from molecular mechanisms to behaviour. *Curr. Opin. Pharmacol.* 5, 53-59.
- Zocchi, A., Girlanda, E., Varnier, G., Sartori, I., Zanetti, L., Wildish, G. A., Lennon, M., Mugnaini, M., Heidbreder, C. A., 2003. Dopamine responsiveness to drugs of abuse: A shell-core investigation in the nucleus accumbens of the mouse. *Synapse* 50, 293-302.

Table 1. Acute nicotine-induced hypocomotion and antinociception in A_{2A} knockout and wild-type mice.

	Antinociception (latency sec)		
	TI	HP licking	HP jumping
Wild-type mice			
Vehicle	2.12 ± 0.14	14.60 ± 1.70	48.37 ± 4.31
Nicotine 1 mg/kg	2.80 ± 0.29	13.98 ± 1.31	77.96 ± 14.86
Nicotine 3 mg/kg	3.83 ± 0.57	17.34 ± 1.72	131.73 ± 21.17
Nicotine 6 mg/kg	4.49 ± 0.31	20.34 ± 2.23	157.35 ± 24.13
A_{2A} knockout mice			
Vehicle	2.33 ± 0.38	12.07 ± 1.47	54.02 ± 5.62
Nicotine 1 mg/kg	2.29 ± 0.25	15.84 ± 1.47	76.54 ± 18.11
Nicotine 3 mg/kg	4.74 ± 0.43	15.40 ± 1.15	195.16 ± 17.26
Nicotine 6 mg/kg	5.65 ± 0.38	22.46 ± 2.07	171.59 ± 19.13

Antinociceptive responses in tail-immersion (TI) and hot-plate (HP) tests for the licking and the jumping responses were measured 15 and 16 min respectively after vehicle or nicotine hydrogen tartrate salt administration (1, 3 and 6 mg/kg, s.c.). Results are expressed as mean ± SEM of latency time in wild-type and A_{2A} knockout mice (*n* = 10 mice per group).

Table 2. Mecamylamine-precipitated nicotine withdrawal syndrome in A_{2A} knockout and wild-type mice.

	Wild-type mice			A _{2A} Knockout mice		
	Saline	Nicotine hydrogen tartrate salt 10 mg/kg	Nicotine hydrogen tartrate salt 25 mg/kg	Saline	Nicotine hydrogen tartrate salt 10 mg/kg	Nicotine hydrogen tartrate salt 25 mg/kg
Body tremor	1.13 ± 0.26	3.68 ± 0.48 **	4.28 ± 0.52 **	0.89 ± 0.24	2.31 ± 0.56 *	3.21 ± 0.58 **
Genital Licks	0.32 ± 0.11	0.68 ± 0.25	0.28 ± 0.16	0.64 ± 0.16	1.00 ± 0.46	0.43 ± 0.22
Ptosis	0.42 ± 0.20	1.18 ± 0.49	1.07 ± 0.37	0.79 ± 0.25	1.87 ± 0.57	2.00 ± 0.52
Wet dog shakes	0.77 ± 0.17	2.37 ± 0.49 **	3.71 ± 0.80 **	1.04 ± 0.41	4.62 ± 1.09 **	4.00 ± 0.76 **
Teeth chattering	0.09 ± 0.07	0.31 ± 0.15	1.00 ± 0.27 **	0.04 ± 0.04	0.12 ± 0.08	1.50 ± 0.55 **
Paw tremor	4.32 ± 0.79	14.50 ± 1.77 **	12.86 ± 1.53 **	3.00 ± 0.52	10.68 ± 3.51	8.28 ± 1.29 **
Scratches	6.90 ± 1.07	2.37 ± 1.18	13.07 ± 6.57	10.14 ± 3.52	3.06 ± 0.90	15.93 ± 6.92
Piloerection	0.74 ± 0.23	2.31 ± 0.56	1.93 ± 0.49 **	0.46 ± 0.17	2.43 ± 0.41	1.07 ± 0.28 **
GWS	10.89 ± 0.95	21.15 ± 1.75 **	27.03 ± 3.19 **	12.55 ± 1.71	19.87 ± 2.15 *	26.53 ± 3.26 **

Data are expressed as mean ± SEM of counted (wet dog shakes, paw tremor and scratches) and checked (body tremor, genital licks, ptosis, teeth chattering and piloerection) somatic signs of nicotine withdrawal. Two-way ANOVA revealed a significant effect of nicotine treatment for body tremor, ptosis, wet dog shakes, teeth chattering, paw tremor, scratches, piloerection and the global withdrawal score (GWS). No significant genotype differences or interaction between genotype and treatment in any case. * p < 0.05, ** p < 0.01 (one-way ANOVA, vehicle group comparison).

Legends of the figures

Figure 1. Acute nicotine-induced hypolocomotion in A_{2A} knockout and wild-type mice. Horizontal and vertical movements were evaluated 5 min after acute vehicle or nicotine hydrogen tartrate salt (1, 3 and 6 mg/kg, s.c.) administration. Results are expressed as mean \pm SEM of photocells counts during 10 min period in wild-type and A_{2A} knockout mice ($n = 10$ mice per group).

Figure 2. Mecamylamine-precipitated withdrawal syndrome in A_{2A} knockout and wild-type mice. Abstinence was precipitated by acute administration of the nicotine antagonist mecamylamine (1 mg/kg, s.c.) after a 6-day period of nicotine infusion (10 and 25 mg/kg/day nicotine hydrogen tartrate salt) by using s.c. minipumps. Mice were observed 30 min after the antagonist administration. A global withdrawal score was calculated for each animal by giving at each individual sign a proportional weight, as described in the methods. Results are expressed as mean \pm SEM of global withdrawal score in wild-type (white bars) and A_{2A} knockout (black bars) mice ($n = 28-32$ mice for vehicle groups and $n = 13-16$ for nicotine groups). ? $p < 0.05$, ?? $p < 0.01$ (one-way ANOVA, vehicle group comparison).

Figure 3. Nicotine conditioned place preference in A_{2A} knockout and wild-type mice. Results are expressed as mean \pm SEM of the time spent in the drug-paired compartment (sec) during the pre-conditioning (white bars) and post-conditioning phase (black bars) ($n = 13-14$ mice per group). Two doses of nicotine hydrogen tartrate salt were tested, 0.5 mg/kg (a) and 1 mg/kg (b). ? $p < 0.05$ comparison between the time spent in the drug-paired compartment during the pre-conditioning and post-conditioning phase (unpaired Student's t -test).

Figure 4. Nicotine conditioned taste aversion in A_{2A} knockout (A_{2A} KO) and wild-type (WT) mice. Nicotine (5 mg/kg) resulted in a similar strong taste aversion in wild-type and A_{2A} knockout mice (? , WT saline-paired flavour $n = 10$; † , WT nicotine-paired flavour $n = 12$, ? , A_{2A} KO saline-paired flavour $n = 10$; ? , A_{2A} KO nicotine-paired flavour). Results are expressed as (a) the mean \pm SEM of the fluid intake (ml) during trials 1-3 and (b) the mean \pm SEM of amounts consumed of the drug-paired flavour as a percentage of the total fluid intake during trial 3. Trials 1 and 2 were conditioning sessions in which

flavoured solutions were paired with nicotine and saline. Trial 3 represents the mean of the two test sessions in which both nicotine and saline-paired flavoured solutions were presented simultaneously without drug injections.

Figure 5. Dopamine levels in the nucleus accumbens in A_{2A} knockout and wild-type mice. (a) Effects of nicotine nicotine hydrogen tartrate salt (0.5 mg/kg, s.c.) and vehicle on DA concentrations in dialysates obtained by *in vivo* microdialysis from the NAc of A_{2A} adenosine knockout and wild-type mice ($n = 5-8$ per group). The arrow indicates nicotine or vehicle administration at time 0. Dialysate samples were taken every 18 min during 72 min before and 124 min after injection. (b) Bar graphs of area under the curve (AUC) values for the DA concentration in dialysates after nicotine or vehicle administration in knockout (black bars) and wild-type (white bars) mice. All values are expressed as mean \pm SEM. $?? p < 0.01$, comparison between genotypes (one-way ANOVA).

Figure 6. (a) Representative coronal section (20 μ m) of the mouse brain stained with cresyl violet illustrating the placement of the probe in the NAc (AP: +1.18 mm from bregma). (b) diagram showing the representative probe placements between AP: +1.70 mm and AP: +0.86 mm from bregma.

Figure(s)

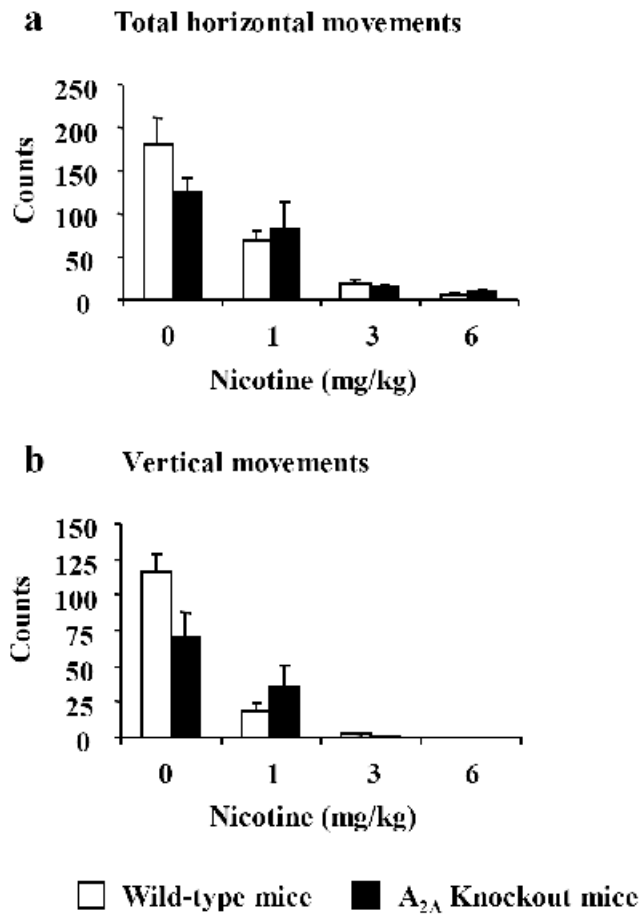


Figure 1.

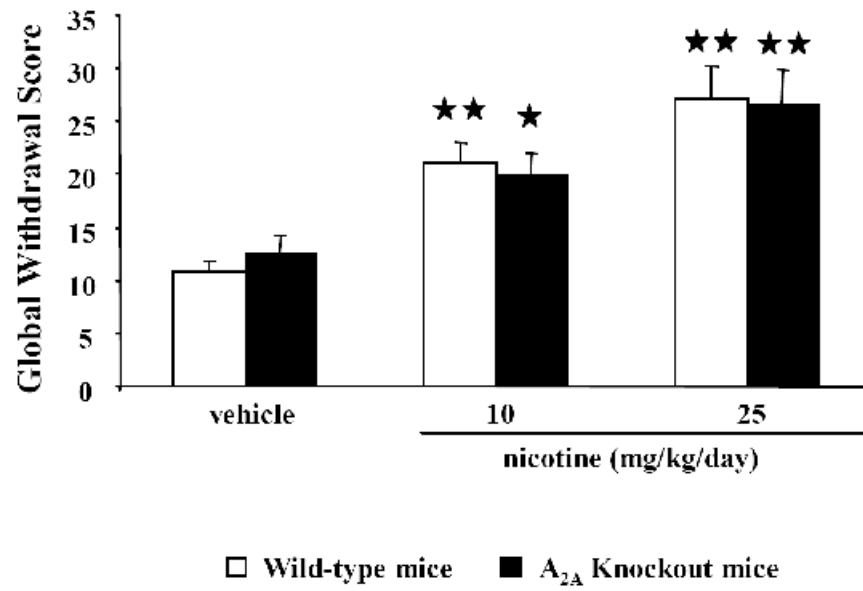


Figure 2.

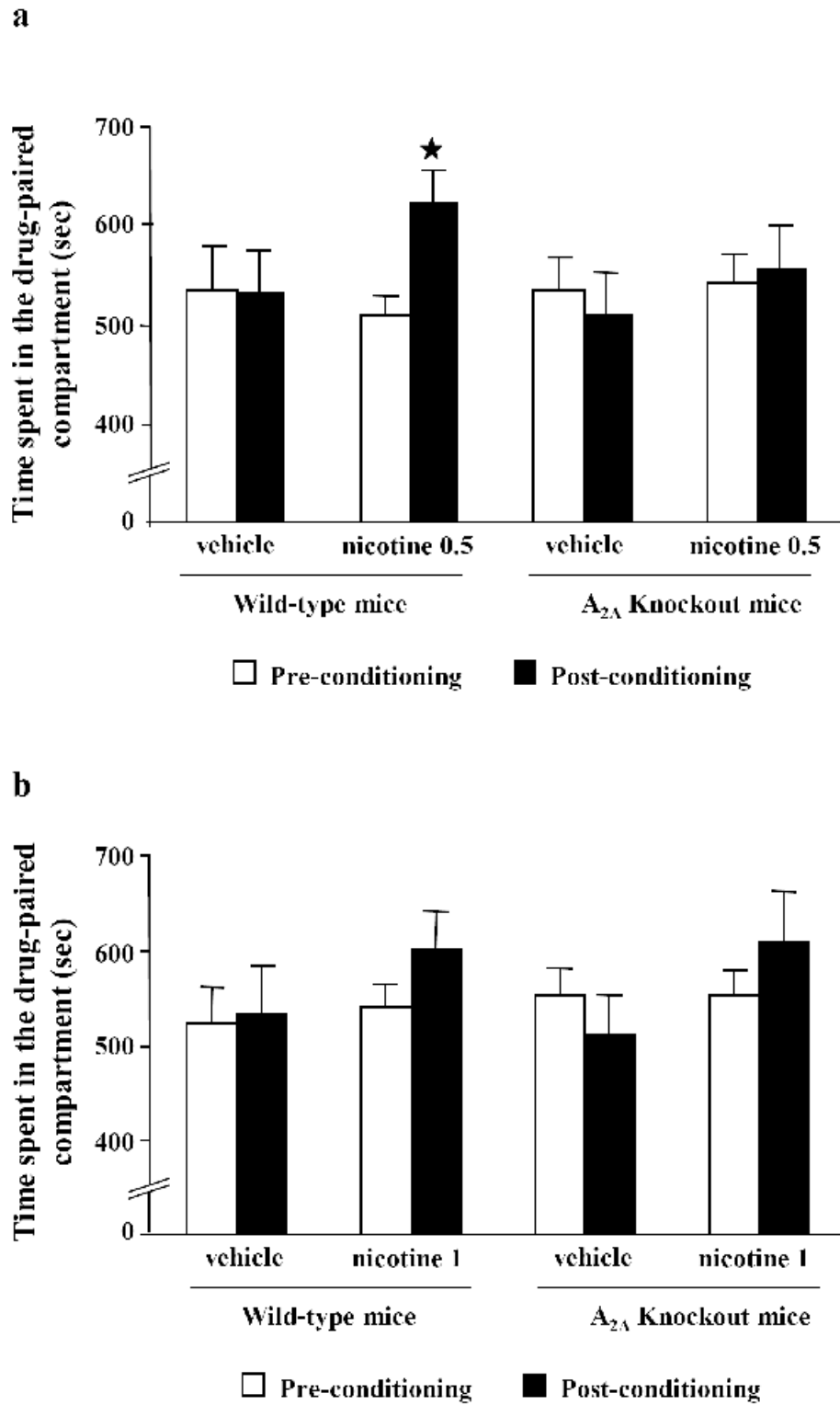


Figure 3.

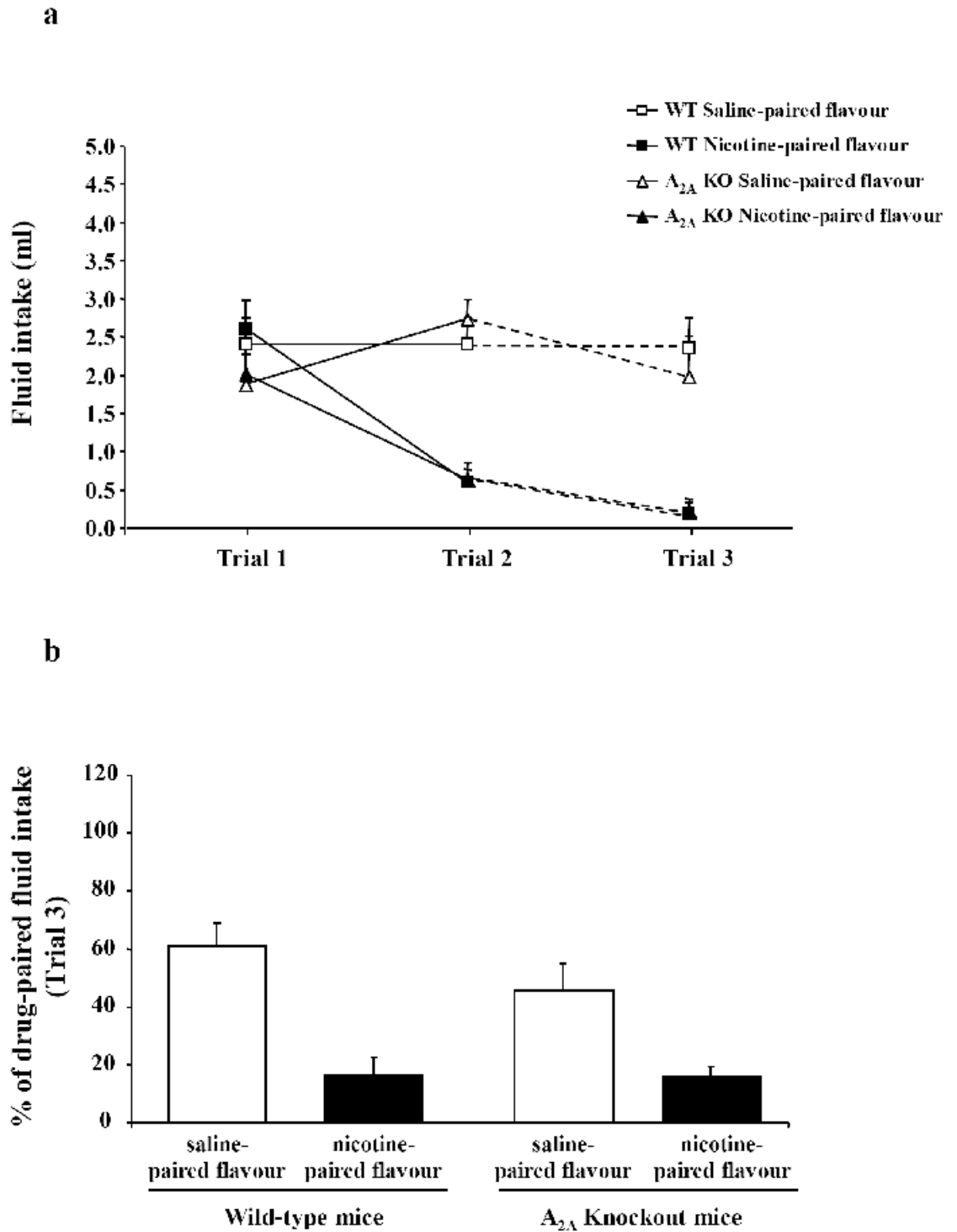


Figure 4.

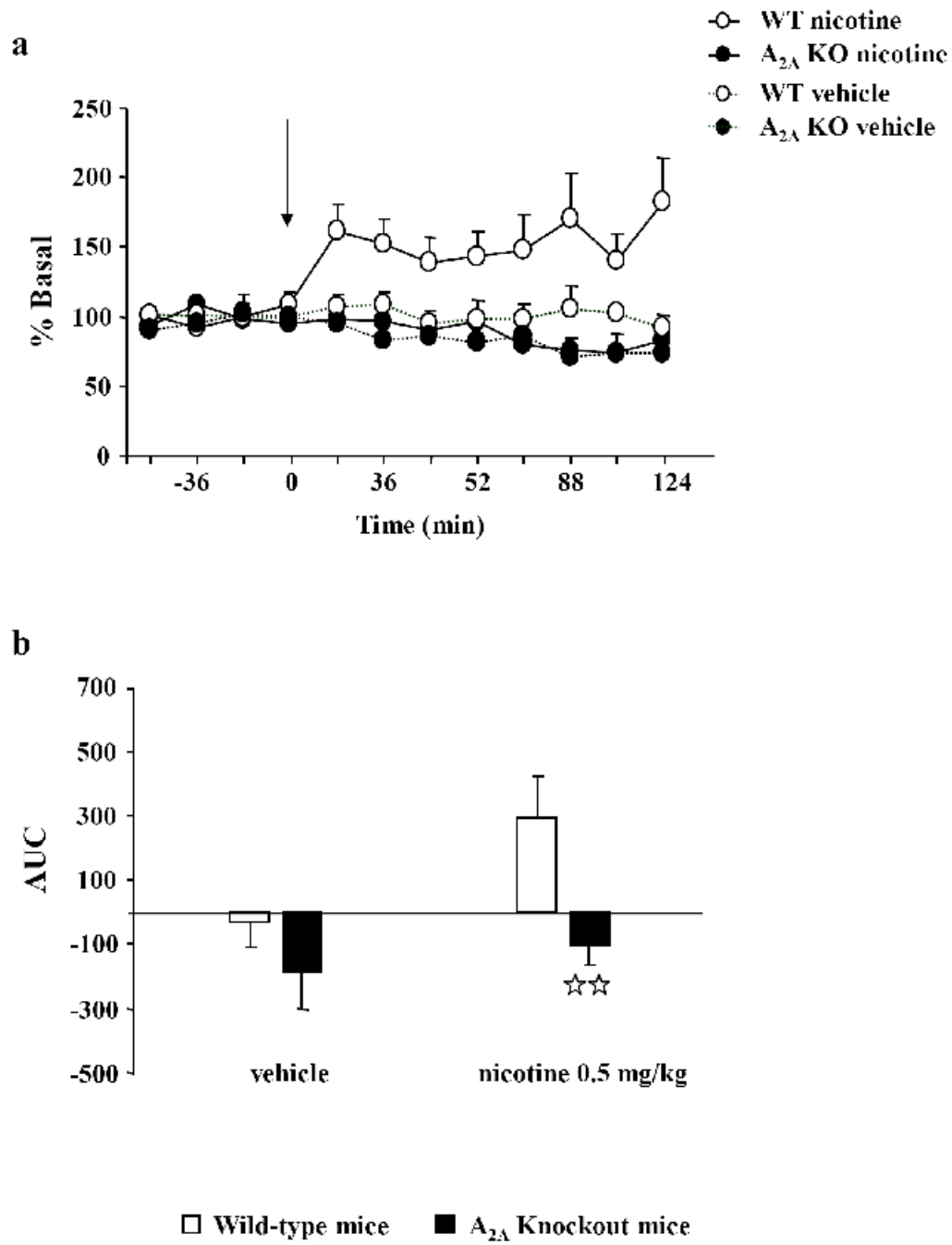
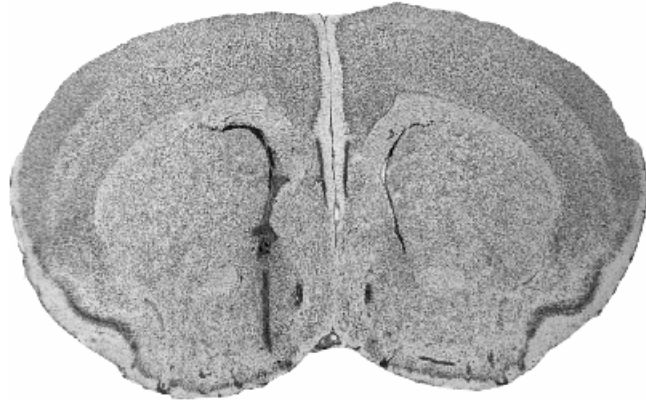
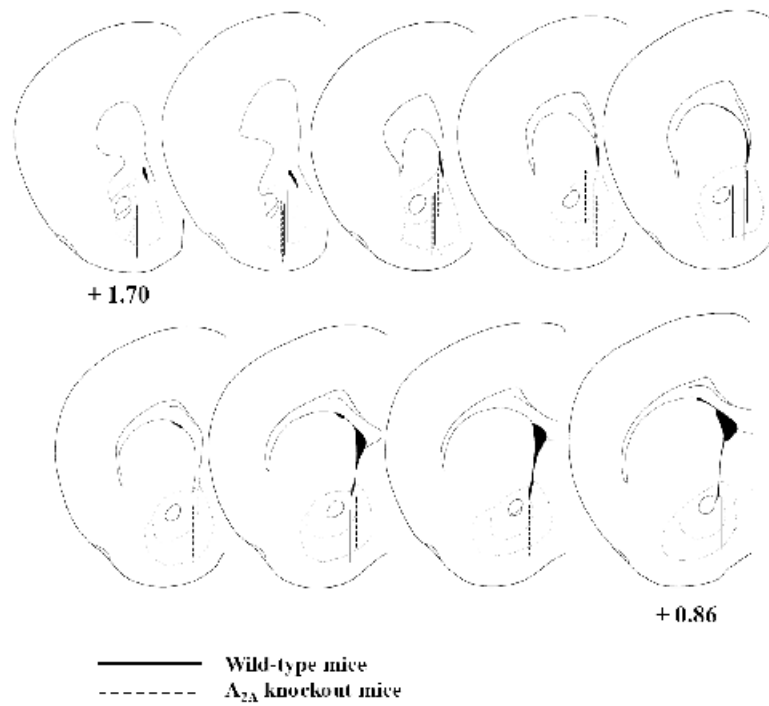


Figure 5.

a**b****Figure 6.**

Morfina

"Allí estaba, descubierto de pronto, el secreto de la felicidad sobre el que los filósofos durante tantas edades habían disputado; la dicha podía comprarse ahora por un penique."

Thomas de Quincey en "Confesiones de un inglés consumidor de opio"

La morfina es el alcaloide mayoritario de la planta de opio (*Papaver Somniferum*), que fue introducido en China y la India por los árabes. Se sabe que los primeros usos (4000 a.C.) fueron medicinales, mediante bebidas e infusiones. En la India, por el contrario, fue utilizada como sustancia para producir euforia o valor entre los soldados en las batallas. A principios del siglo XIX se aisló la morfina (1805), y en 1874 se sintetizó la heroína. A mediados del siglo XIX, sumado a la invención de la aguja hipodérmica, las consecuencias nefastas del uso indiscriminado de los opiáceos comienza a ser notado por algunos gobiernos occidentales y se reconoce que la adicción de opiáceos es una de las más terribles a las que se enfrenta la sociedad en todos los estratos socioeconómicos. La morfina puede ser consumida oralmente, sin embargo la forma de consumo más extendida de la morfina, así como de la heroína, es inyectada por vía intravenosa.

Las acciones fisiológicas de los opioides están mediadas por tres receptores opioides (μ , δ y κ). Estos receptores opioides pertenecen a la superfamilia de los receptores acoplados con la proteína G. A través de la unión con proteínas G, los receptores opioides son capaces de inhibir la actividad de la adenilato ciclasa (Sharma y cols., 1977), modificar la conductividad de canales K^+ y Ca^{+2} (Surprenant y cols., 1990; Jin y cols., 1994) y activar las vías de señalización de la fosfolipasa C y de las MAP quinasas (Burt y cols., 1996; Fukuda y cols., 1996). En condiciones fisiológicas, los receptores opioides son activados por un conjunto de compuestos endógenos llamados péptidos opioides. Estos péptidos opioides provienen de la degradación enzimática de tres precursores peptídicos de gran tamaño, la proopiomelanocortina, la proencefalina y la prodinorfina. De la proopiomelanocortina se obtiene principalmente la β -endorfina, de la proencefalina se obtienen diversos péptidos opioides entre los que cabe destacar la Met- y Leu-encefalina y de la prodinorfina se generan las dinorfinas y las neoendorfinas, entre otros.

Los receptores y péptidos opioides se expresan de forma importante en el SNC y también en la periferia (Mansour y cols., 1995). Además de intervenir en las rutas del dolor, el sistema opioide está muy representado en zonas del cerebro que pertenecen al sistema límbico como el VTA, y el NAc (Mansour y cols., 1988). Se ha observado una elevada densidad de receptores μ en el caudado putamen, NAc, tálamo, hipocampo, sustancia gris periacueductal, sustancia nigra y amígdala, Los receptores δ tienen

una localización más restringida, con una concentración más elevada en el estriado, tubérculo olfatorio y corteza cerebral. Los receptores kappa se encuentran sobre todo en el NAc, tubérculo olfatorio, área preóptica, amígdala e hipotálamo. El sistema opioide está implicado en una amplia variedad de funciones que regulan las reacciones al estrés, la alimentación, el estado de ánimo, el aprendizaje, la memoria y las funciones inmunológicas (para una revisión detallada, véase Van Ree y cols., 1999; De Vries y Shippenberg, 2002).

Artículo 5

Behavioral and biochemical opioid responses related to its addictive properties are attenuated in adenosine A_{2A} receptor knockout mice. Castañé A, Soria G, Kitchen I, Maldonado R, Valverde O. (*En preparación*).

OBJETIVOS

- Evaluar la participación del receptor A_{2A} en las propiedades motivacionales de la morfina y de sus efectos farmacológicos utilizando ratones deficientes en el receptor A_{2A}.

RESULTADOS

- El tratamiento agudo de morfina (5 y 10 mg/kg, s.c.) produce un aumento de la actividad locomotora y un efecto antinociceptivo similar en los animales deficientes en el receptor A_{2A} y en los animales wild-type.
- Los animales wild-type mostraron una preferencia de plaza inducida por morfina que no fue observada en los animales A_{2A} knockout.
- Los animales wild-type mostraron una aversión de plaza inducida por el síndrome de abstinencia de morfina que no fue observada en los animales knockout deficientes en el receptor adenosina A_{2A}.

CONCLUSIÓN

- Los receptores de adenosina A_{2A} son esenciales para las propiedades motivacionales tanto gratificantes como disfóricas, producidas por la morfina.

Nota:

Este trabajo se está desarrollando en colaboración con el grupo de investigación del profesor Ian Kitchen en Inglaterra (University of Surrey, Surrey, UK). Nosotros hemos evaluado las propiedades motivacionales de la morfina y sus efectos farmacológicos utilizando ratones deficientes en el receptor A_{2A}. En paralelo, el grupo del profesor Kitchen está evaluando el aumento de dopamina extracelular en el NAc tras una inyección aguda de morfina, también en ratones A_{2A} knockout. Por esta razón, solo mostramos los resultados realizados en nuestro laboratorio.

DISMINUCIÓN DE LAS RESPUESTAS COMPORTAMENTALES RELACIONADAS CON LAS PROPIEDADES ADICTIVAS DE LOS OPIOIDES EN LOS ANIMALES DEFICIENTES EN EL RECEPTOR DE ADENOSINA A2A

Anna Castañé, Guadalupe Soria, Rafael Maldonado, Olga Valverde

Laboratori de Neurofarmacologia, Departament de Ciències Experimentals i de la Salut, Universitat Pompeu Fabra, C/Doctor Aiguader 80, 08003 Barcelona, Spain

Existen diferentes evidencias que nos permiten postular una interacción entre el sistema opioide y el purinérgico. En primer lugar, los receptores A2A regulan la expresión del gen de la proencefalina (Fink y cols., 1992; Shiffmann y Vanderhaeguen, 1993) de cuya proteína se generan diversos ligandos endógenos de los receptores opioides (Mansour y cols., 1995). Además, estudios previos en nuestro laboratorio, y otros más recientes, han demostrado que la severidad del síndrome de abstinencia de morfina precipitado por naloxona se encuentra aumentado en los animales deficientes en el receptor A2A (Berrendero y cols., 2003, Bailey y cols., 2004), sugiriendo un papel fundamental de este receptor en la expresión del síndrome de abstinencia de morfina. Nuestro objetivo en este estudio ha sido evaluar el papel del receptor de adenosina A2A en las propiedades motivacionales de la morfina mediante el uso del paradigma de condicionamiento espacial. Con este objetivo, hemos estudiado las respuestas locomotoras y antinociceptivas inducidas por un tratamiento agudo de morfina. La respuesta hiperlocomotora inducida por la morfina fue evaluada mediante cajas de actividad locomotora, y fue similar en ambos fenotipos. El efecto antinociceptivo de la morfina fue estudiado en el test de inmersión de la cola y de la placa caliente, y también fue parecido en los animales wild-type y A2A knockout. Mediante la preferencia de plaza condicionada hemos observado que las propiedades gratificantes de la morfina están bloqueadas en animales deficientes en el receptor A2A. Utilizando el paradigma de la aversión de plaza condicionada hemos demostrado que las propiedades disfóricas asociadas al síndrome de abstinencia de morfina están igualmente anuladas en estos animales knockout. Estos resultados indican una implicación específica de los receptores A2A en las propiedades motivacionales de la morfina.

Resultados

Efectos agudos inducidos por la morfina en animales A2A knockout y wild-type

La administración aguda de morfina (5 y 10 mg/kg, s.c.) produjo un aumento de la actividad locomotora similar en los animales deficientes en el receptor A2A y wild-type. Del mismo modo, las respuestas antinociceptivas medidas en el test de inmersión de la cola y en el test de la placa caliente también fueron similares en ambos genotipos. Las respuestas locomotoras inducidas por la morfina fueron evaluadas mediante el uso de cajas de actividad locomotora durante 30 min (Martín y cols., 2000). Así, la ANOVA de dos vías reveló efectos del tratamiento en todas las respuestas agudas, pero no mostró interacción entre tratamiento y genotipo (Tabla 1). La ANOVA de una vía calculada para los movimientos ambulatorios (Fig. 1a) mostró un efecto significativo del tratamiento en los animales wild-type ($F [2.29] = 59.414$; $p < 0.01$) y knockout ($F [2.29] = 19.326$; $p < 0.01$). Los análisis post-hoc mostraron diferencias significativas en los animales wild-type y knockout tratados con morfina a las dosis de 5 ($p < 0.05$ para los wild-type; $p < 0.01$ para los knockout) y 10 mg/kg ($p < 0.05$ para ambos casos), en comparación con los animales tratados con salino. La ANOVA de una vía calculada para la actividad horizontal total (Fig. 1b) reveló un efecto significativo del tratamiento en los animales wild-type ($F [2.29] = 26.954$; $p < 0.01$) y knockout ($F [2.29] = 12.541$; $p < 0.01$). Los análisis post-hoc mostraron diferencias significativas en los animales wild-type y knockout tratados con morfina a la dosis de 10 mg/kg ($p < 0.01$) en comparación con los animales tratados con salino. La ANOVA de una vía calculada para la actividad locomotora vertical (Fig. 1c) mostró un efecto significativo del tratamiento en los animales wild-type ($F [2.28] = 11.487$; $p < 0.01$) y knockout ($F [2.29] = 4.188$; $p < 0.05$). Los análisis post-hoc mostraron diferencias significativas en los animales wild-type tratados con morfina a las dosis de 5 y 10 mg/kg ($p < 0.01$), así como en los animales knockout tratados con morfina a la dosis de 10 mg/kg ($p < 0.05$), en comparación con los animales tratados con salino.

	Actividad Locomotora					
	Ambulatoria		Horizontal Total		Vertical	
	<i>F</i>	<i>p</i>	<i>F</i>	<i>p</i>	<i>F</i>	<i>p</i>
Tratamiento	$F_{(2,54)} = 63.672$	0.01	$F_{(2,54)} = 35.977$	0.01	$F_{(2,53)} = 14.704$	0.01
Genotipo	$F_{(1,54)} = 9.526$	0.01	$F_{(1,54)} = 17.606$	0.05	$F_{(1,53)} = 4.523$	0.05
TxG	$F_{(2,54)} = 0.523$	n.s.	$F_{(2,54)} = 0.587$	n.s.	$F_{(2,53)} = 1.749$	n.s.

	Antinocicepción					
	Inmersión de la cola		Placa caliente: lameteo		Placa caliente: salto	
	<i>F</i>	<i>p</i>	<i>F</i>	<i>p</i>	<i>F</i>	<i>p</i>
Tratamiento	$F_{(2,53)} = 50.431$	0.01	$F_{(2,54)} = 9.785$	0.01	$F_{(2,54)} = 502.15$	0.01
Genotipo	$F_{(1,53)} = 1.884$	n.s.	$F_{(1,54)} = 0.083$	n.s.	$F_{(1,54)} = 1.164$	n.s.
TxG	$F_{(2,53)} = 0.930$	n.s.	$F_{(2,54)} = 0.519$	n.s.	$F_{(2,54)} = 0.291$	n.s.

Tabla 1. ANOVA de dos vías para las respuestas locomotoras y antinociceptivas inducida por una administración aguda de morfina en ratones deficientes en el receptor A2A y wild-type. ANOVA de dos vías con tratamiento (T) y genotipo (G) como factores de variancia.

Las respuestas antinociceptivas inducidas por la morfina (5 y 10 mg/kg, s.c.) fueron evaluadas en ratones deficientes en el receptor A2A y en ratones wild-type mediante el uso del test de inmersión de la cola y el test de la placa caliente (Smonin y cols., 1998). La ANOVA de una vía calculada sobre la latencia en retirar la cola del baño caliente mostró un efecto significativo del tratamiento en los animales wild-type ($F [2,28] = 42.652$; $p < 0.01$) y knockout ($F [2,29] = 21.192$; $p < 0.05$). Los análisis post-hoc mostraron diferencias significativas en los animales wild-type y knockout tratados con morfina a las dosis de 5 ($p < 0.05$ para los knockout; $p < 0.01$ para los wild-type) y 10 mg/kg ($p < 0.01$ para ambas dosis) en comparación con los animales tratados con salino (Fig. 2a). La ANOVA de una vía calculada sobre la respuesta de lameteo en el test de la placa caliente mostró un efecto significativo del tratamiento en los animales knockout ($F [2,29] = 5.963$; $p < 0.01$), pero no en los animales wild-type ($F [2,29] = 3.019$; n.s.). Los análisis post-hoc mostraron diferencias significativas en los animales knockout tratados con morfina a la dosis de 10 mg/kg ($p < 0.01$) en comparación con los animales tratados con salino (Fig. 2b). La ANOVA de una vía calculada sobre la respuesta de salto

en el test de la placa caliente mostró un efecto significativo del tratamiento en los animales wild-type ($F [2.29] = 287.530$; $p < 0.01$) y knockout ($F [2.29] = 221.705$; $p < 0.01$). Los análisis post-hoc mostraron diferencias significativas en los animales wild-type y knockout tratados con morfina a las dosis de 5 y 10 mg/kg ($p < 0.01$), en comparación con los animales tratados con salino (Fig. 2c).

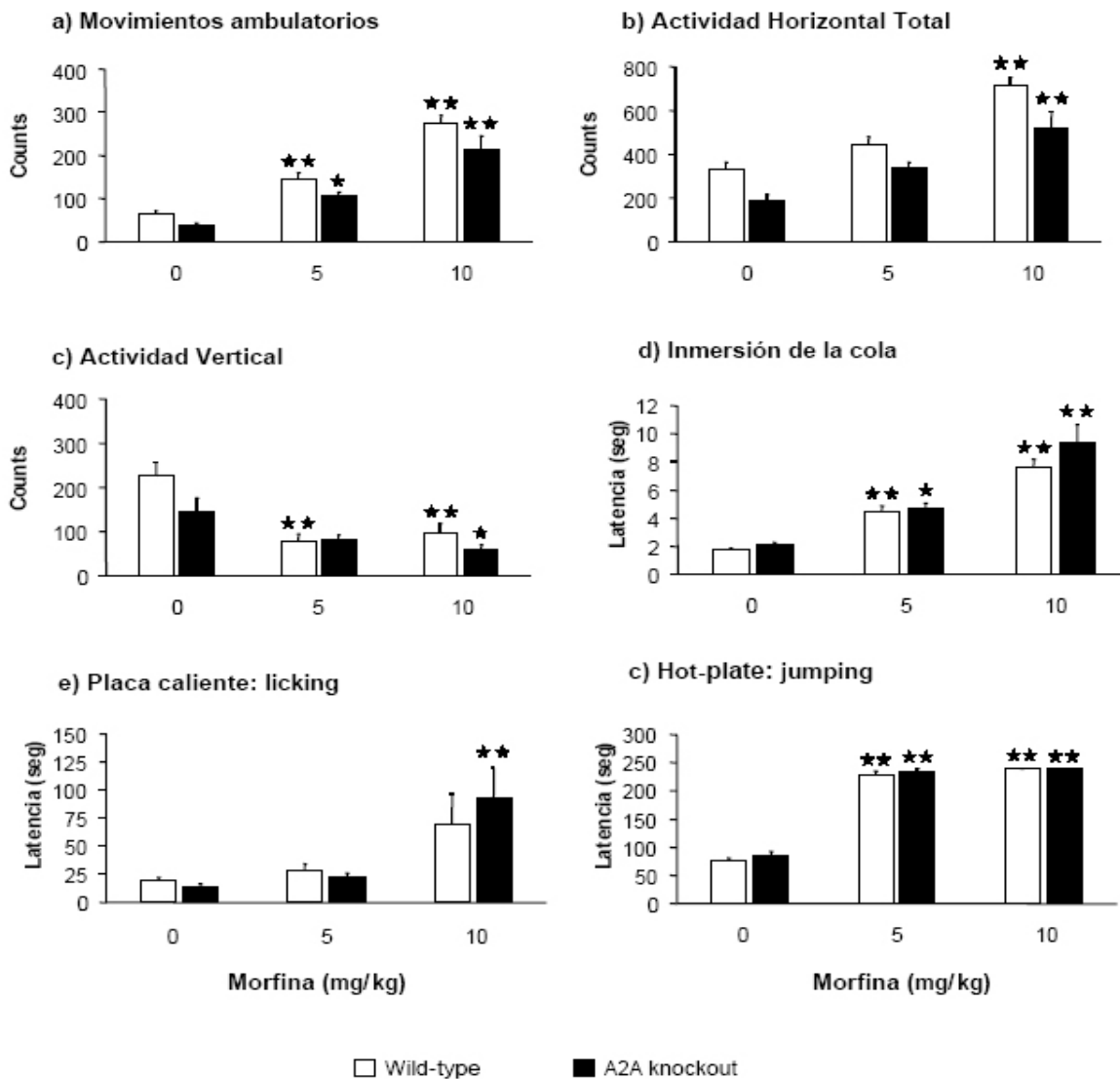


Figura 1. Efectos locomotores y antinociceptivos inducidos por un tratamiento agudo de morfina en ratones deficientes en el receptor A2A y wild-type. La actividad locomotora se evaluó durante 30 min después de la inyección aguda de morfina (0, 5 y 10 mg/kg, s.c.). Se midieron (a) los movimientos ambulatorios, (b) la actividad horizontal total (ambulatorios más pequeños movimientos) y (c) los movimientos verticales. Los datos están expresados como media \pm SEM de los counts de actividad locomotora (count = cada vez que el haz fotoeléctrico entre dos fotocélulas se rompe por los movimientos del ratón). Las respuestas antinociceptivas medidas en el test de inmersión (d) de la cola y en el test de la placa caliente (e) y (f) fueron evaluadas 30 min después de la administración de morfina (0, 5 y 10 mg/kg, s.c.). Los datos están expresados como media \pm SEM del tiempo de latencia (seg). $N = 10$ para todos los grupos $\star p < 0.05$; $\star\star p < 0.01$ versus salino (Dunnet test).

Preferencia de plaza condicionada inducida por morfina en animales A2A knockout y wild-type

Los efectos de recompensa inducidos por la morfina (5 y 10 mg/kg, s.c.) fueron evaluados en animales deficientes en el receptor A2A y en animales wild-type utilizando el paradigma de condicionamiento espacial (Maldonado y cols., 1997, Smonin y cols., 1998). No se observó preferencia inicial por ninguno de los dos compartimentos (Fig. 3). En los animales wild-type tratados con morfina se observó un efecto gratificante significativo que no fue observado en los animales deficientes en el receptor A2A. De este modo, los animales wild-type condicionados a la dosis de morfina de 5 mg/kg ($t [1.9] = -6.903$, $p < 0.01$) y 10 ($t [1.11] = -3.186$; $p < 0.01$) permanecieron significativamente más tiempo en el compartimiento asociado a la droga durante la fase de post-condicionamiento, en comparación con la fase de pre-condicionamiento. Por otro lado, los animales A2A knockout que fueron condicionados con 5 y 10 mg/kg de morfina mostraron una preferencia similar por el compartimiento asociado a la droga durante la fase de pre-condicionamiento y post-condicionamiento (Fig. 3).

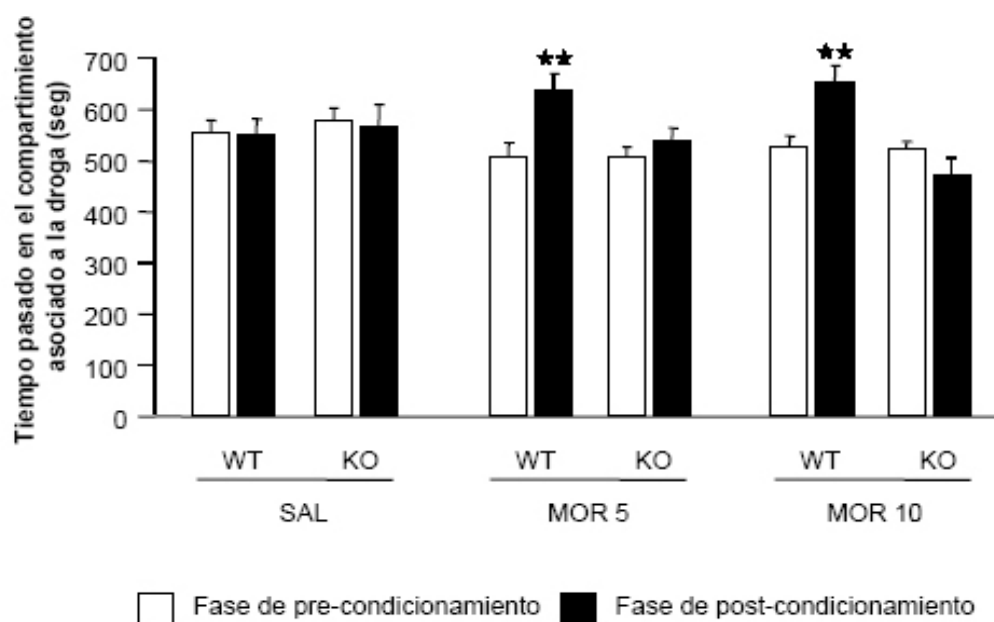


Figura 2. Preferencia de plaza condicionada por el tratamiento de morfina (0, 5 y 10 mg/kg, s.c.) en ratones deficientes en el receptor de adenosina A2A y wild-type. Los datos están expresados como media \pm SEM del tiempo pasado en el compartimiento asociado a la droga (seg) durante la fase de pre-condicionamiento y la fase de post-condicionamiento. N = 10-12 para los grupos tratados con morfina y N = 22 para los grupos tratados con salino. ** $p < 0.01$ versus post-condicionamiento (t de student para muestras pareadas).

Aversión de plaza inducida por el síndrome de abstinencia de morfina, precipitado por naloxona, en animales A2A knockout y wild-type

Los efectos aversivos producidos por el síndrome de abstinencia de morfina, precipitado por el antagonista opioide naloxona, fueron evaluados utilizando el paradigma de condicionamiento espacial (Valverde y cols., 1996). La ANOVA de una vía mostró que el tiempo que los animales permanecieron en el compartimiento asociado a la droga en la fase de pre-condicionamiento fue similar para todos los grupos experimentales ($F[11,153] = 0.233$; n.s.), asegurando así el uso de un método sin sesgos (Fig. 4). La naloxona (0.1 mg/kg, s.c.) produjo una aversión de plaza en los animales wild-type dependientes de morfina, que fue revelada por la disminución de tiempo que los animales pasaron en el compartimiento asociado a la droga durante la fase de post-condicionamiento, en comparación con la fase de pre-condicionamiento ($t [1.13] = 4.410$, $p < 0.01$). Sin embargo, los animales A2A knockout dependientes de morfina que recibieron la misma dosis de naloxona pasaron el mismo tiempo en el compartimiento asociado a la droga tanto en la fase de pre-condicionamiento como en la de post-condicionamiento (Fig. 4). La administración de una dosis menor de naloxona (0.05 mg/kg) no produjo respuestas aversivas en los animales dependientes a morfina en ninguno de los dos genotipos (Fig. 4).

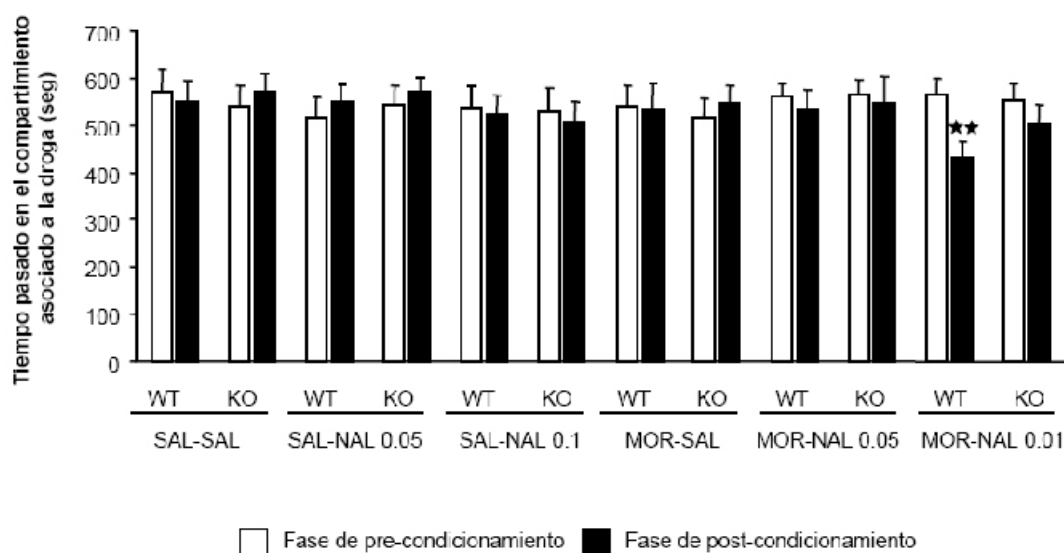


Figura 3. Aversión de plaza condicionada por el síndrome de abstinencia de morfina, precipitado por naloxona (0.05 y 0.1 mg/kg, s.c.), en ratones deficientes en el receptor de adenosina A2A y wild-type. Los datos están expresados como media \pm SEM del tiempo pasado en el compartimiento asociado a la droga (seg) durante la fase de pre-condicionamiento y la fase de post-condicionamiento. $N = 11-14$ para todos los grupos experimentales. $** p < 0.01$ versus post-condicionamiento (t de student para muestras pareadas).

A decorative horizontal border at the bottom of the page featuring a repeating pattern of stylized, light gray floral and leaf motifs. The motifs include large, swirling acanthus-like leaves and smaller, more delicate floral elements.

DISCUSIÓN

La adicción es un trastorno crónico de la conducta caracterizado por la búsqueda y el consumo compulsivos de la droga, la pérdida de control para limitar dicho consumo, a aparición de un estado emocional negativo cuando el acceso a la droga está impedido y la recaída en el proceso incluso tras largos períodos de abstinencia (Koob y Le Moal, 1997). Si bien el proceso adictivo tiene su inicio en los efectos placenteros agudos que producen las drogas de abuso, resulta también necesario el desarrollo de procesos neurobiológicos adaptativos que permiten el mantenimiento y la evolución de dicha conducta patológica. Diversos estudios han propuesto la existencia de sustratos neuronales comunes que se activan ante la presencia de las diferentes drogas de abuso, de manera independiente de su correspondiente mecanismo de acción (Di Chiara, 2002; Nestler, 2002; Maldonado, 2003; Kalivas y Volkow, 2005).

El sistema dopaminérgico mesolímbico cortical ha sido propuesto como la principal base neurobiológica de la adicción (Di Chiara e Imperato, 1988; Di Chiara, 2002). Dentro de este sistema, la transmisión dopaminérgica establecida entre estructuras tales como el VTA y el NAc tiene un papel primordial (Koob y Le Moal, 2001; Maldonado, 2003; Carelli y Wightman, 2004; Spanagel y Heilig, 2005). Trabajos recientes han identificado los cambios adaptativos desarrollados durante los procesos de adicción en el sistema dopaminérgico y la participación de otros sistemas de neurotransmisión o sistemas neuroendocrinos como son los sistemas opioide, glutamatérgico, gabaérgico o las hormonas que constituyen el eje HPA. Estos sistemas tienen su sustrato anatómico en diversas regiones del SNC como los núcleos de la amígdala (y las estructuras relacionadas de la llamada amígdala extendida), el hipocampo, el hipotálamo y la PFC entre otras (Koob, 1999b; Nestler, 2005). Así, en el caso del sistema opioide, existe una alta densidad de receptores de tipo mu y kappa tanto en el NAc como en el VTA, que se expresan en neuronas gabaérgicas que modulan la actividad dopaminérgica. El sistema glutamatérgico cuyo papel fundamental en los procesos de aprendizaje y memoria es conocido (Simonyi y cols., 2005), regula los procesos de plasticidad sináptica que se desarrollan durante el proceso adictivo (Hyman, 2005). Existen proyecciones glutamatérgicas desde el hipocampo y la amígdala hacia el VTA, así como aferencias desde la PFC al NAc que regulan la actividad del sistema mesolímbico dopaminérgico. El sistema gabaérgico también participa en los fenómenos relacionados con la adicción. Las interneuronas gabaérgicas en el VTA expresan receptores de diversa naturaleza (p.e: receptores opioides, receptores cannabinoides, receptores nicotínicos) donde interactúan diferentes drogas de abuso. Al activarse a este nivel los receptores opioides y cannabinoides desinhiben la actividad dopaminérgica aumentando la liberación de la dopamina en el NAc. De forma paralela, el eje HPA regula la respuesta al estrés y tiene una doble implicación en el proceso adictivo. Por una parte, modula los efectos

reforzantes de las drogas (Piazza y Le Moal, 1998; Goeders, 2002) y debido al incremento de síntesis de CRF durante el tiempo de abstinencia, participa en los fenómenos de recaída (Marinelli y Piazza, 2002). Además los diferentes sistemas de neurotransmisión citados también modulan la expresión del CRF en regiones cerebrales como el hipocampo y la amígdala.

En el trabajo desarrollado en esta Tesis Doctoral, hemos explorado la implicación del sistema cannabinoide endógeno y del sistema purinérgico, a través de la supresión genética del receptor CB1 y del receptor A2A respectivamente, en las propiedades adictivas de drogas de abuso prototípicas como son la cocaína, el THC, la nicotina y la morfina. Nuestro objetivo fundamental ha sido demostrar las posibilidades que estos sistemas representan como sustratos neuroquímicos comunes en la neurobiología de la adicción.

1. Participación del sistema endocannabinoide en las propiedades adictivas de la cocaína

Existen numerosas evidencias que indican la participación del sistema cannabinoide endógeno en las propiedades adictivas de ciertas drogas de abuso, tales como los propios cannabinoides (Ledent y cols., 1999; Valverde y cols., 2005), el etanol (Arnone y cols., 1997, Hungund y cols., 2003, Rinaldi-Carmona y cols., 2004), los opioides (Chen y cols., 1990, Manzanares y cols., 1999; Martín y cols., 2000, Braida y cols., 2001, Ghozland y cols., 2002, De Vries y cols., 2003) o la nicotina (Castañé y cols., 2002, Valjent y cols., 2002, Cohen y cols., 2002, Le Foll y Goldberg, 2005). Sin embargo, hasta el momento de iniciar nuestro trabajo, pocos estudios han demostrado una clara implicación del sistema endocannabinoide en las propiedades reforzantes de los psicoestimulantes, y los resultados expuestos fueron en ocasiones controvertidos. En primer lugar, los primeros estudios realizados en nuestro laboratorio demostraron que los animales CB1 knockout son capaces de mostrar una preferencia de plaza inducida por la cocaína similar a la que desarrollaban los ratones wild-type (Martín y cols., 2000). Así, la capacidad de asociar una experiencia placentera a un contexto ambiental está preservada en estos animales mutantes. Del mismo modo, la autoadministración de cocaína y anfetamina en un paradigma de autoadministración aguda con movilidad restringida fue similar en ambos genotipos (Cossu y cols., 2001), lo cual apoya nuestros resultados obtenidos en el condicionamiento espacial. Sin embargo, los estudios realizados por De Vries y cols., (2003), mostraron que, en ratas que habían extinguido una conducta de autoadministración previamente adquirida, la administración del antagonista CB1 rimonabant es capaz de bloquear una conducta de recaída provocada por estímulos asociados a la droga. Estos resultados indican un papel crucial de los

receptores cannabinoides CB1 en los procesos de recaída de la conducta de autoadministración de cocaína.

El conjunto de estas evidencias demuestra que el receptor CB1 no parece participar de forma crucial en el refuerzo primario producido por la cocaína, como se observó en el paradigma de condicionamiento espacial (Martín y cols., 2000), pero posee un papel relevante en el proceso de recaída al consumo de la droga tras un periodo prolongado de abstinencia (De Vries y cols., 2003). En este sentido, uno de nuestros propósitos ha sido evaluar la implicación del sistema endocannabinoide, y en particular del receptor CB1, en las propiedades reforzantes de la cocaína, y determinar si dicho efecto reforzante es suficiente para iniciar y mantener una conducta de autoadministración en el ratón. Con esta idea, realizando un estudio de microdiálisis *in vivo*, hemos demostrado que la administración aguda de cocaína produce un incremento de los niveles extracelulares de dopamina en el NAc similar en animales CB1 knockout y en animales wild-type. Este resultado nos permite confirmar que el receptor CB1 no modula el incremento de dopamina extracelular en el NAc característico de los efectos reforzantes primarios de la cocaína, tal como apuntaban los resultados obtenidos en el paradigma de preferencia de plaza (Martín y cols., 2000).

Para profundizar en este estudio, nos propusimos evaluar el papel del receptor cannabinoide CB1 en los procesos de adquisición, consolidación y mantenimiento de una conducta operante mantenida por infusiones intravenosas de cocaína en el ratón. Para ello, el primer objetivo de nuestro trabajo fue la puesta a punto de la técnica de autoadministración intravenosa de cocaína en el ratón, con el fin de poder evaluar a continuación las propiedades reforzantes de la cocaína en animales deficientes en el receptor CB1. Una vez establecido este modelo en el laboratorio, pudimos demostrar, con un protocolo de razón fija 1, que el 75% de los animales wild-type adquirió una conducta operante mantenida por la autoadministración intravenosa de cocaína (1 mg/kg/inf), mientras que sólo el 25% de los animales CB1 knockout adquirió dicha conducta. Los animales deficientes en el receptor CB1 consumieron una menor cantidad de cocaína que los animales wild-type, y también requirieron un tiempo significativamente más largo para cumplir los criterios de adquisición de la conducta de autoadministración. Evaluamos también el esfuerzo máximo que el animal es capaz de realizar para obtener una infusión de cocaína. Para ello, utilizamos un protocolo de razón progresiva donde se incrementa de forma progresiva la dificultad para obtener cada infusión de cocaína. En estas nuevas condiciones experimentales, los animales CB1 knockout mostraron una motivación menor por la droga que los ratones wild-type. Este resultado se confirmó mediante la utilización de un enfoque farmacológico, administrando el antagonista CB1 rimonabant en animales CB1 wild-type. Este estudio

mostró que el rimonabant disminuye de forma significativa el máximo esfuerzo que el animal es capaz de hacer para obtener dicha infusión de cocaína, de forma similar a lo observado en el ratón CB1 knockout en condiciones similares.

Teniendo en cuenta la demostrada participación del receptor CB1 en las propiedades adictivas de otras drogas de abuso (THC, opioides, alcohol, nicotina), los resultados obtenidos en nuestro estudio nos permiten resolver la controversia existente para el caso de la cocaína y nos permite concluir que el sistema endocannabinoide modula de manera común el proceso de adicción de las diversas drogas prototípicas. No obstante, la participación del receptor CB1 en la adicción no sería equivalente para todos los tipos de drogas. Para algunas drogas como la nicotina, la morfina, el THC o el etanol, el receptor CB1 es relevante en las primeras fases del refuerzo primario. No obstante, la importancia del receptor CB1 en las propiedades adictivas de la cocaína reside en procesos más complejos de la adicción, como el desarrollo del fenómeno compulsivo que caracteriza este trastorno. Tales procesos sólo pueden ser estudiados con modelos más sofisticados capaces de evaluar la respuesta reforzante aguda y el desarrollo del proceso adictivo, como el paradigma de autoadministración intravenosa. Dado que el modelo de autoadministración intravenosa es uno de los más válidos y con mayor valor predictivo acerca del potencial de abuso de una droga, nuestro trabajo establece de forma convincente, y por primera vez, la participación del receptor cannabinoide CB1 en la consolidación y mantenimiento de la conducta de búsqueda compulsiva de la cocaína. Pero, ¿participa el receptor cannabinoide CB1 de forma similar en la modulación de las propiedades adictivas de otros psicoestimulantes?

Recientemente, se han publicado trabajos que señalan la existencia de una interacción entre el sistema endocannabinoide y los psicoestimulantes, en particular con el receptor CB1. En este sentido, Braida y cols., (2005) han demostrado que el pretratamiento con rimonabant es capaz de bloquear los efectos de recompensa inducidos por el MDMA, evaluados en el paradigma de preferencia de plaza en ratas. De acuerdo con estos resultados, el pretratamiento con el antagonista del receptor cannabinoide CB1, AM 251, provocó una reducción del consumo de la droga de un modo dosis dependiente, en ratas entrenadas a autoadministrarse metanfetamina con un protocolo de razón fija 3. Esta reducción de la tasa de autoadministración fue revertida por la administración de agonistas CB1 como la anandamida o la metanandamida, lo que sugiere un mecanismo mediado por el receptor CB1 (Vinklerová y cols., 2002). También se ha explorado el efecto del antagonista del receptor CB1 rimonabant en la conducta de recaída de autoadministración de metanfetamina provocada tanto por estímulos asociados a la droga como por una inyección de la misma (Anggadiredja y cols., 2004, Yamamoto y cols., 2004). Después de un entrenamiento utilizando un protocolo de razón fija 1 y la posterior extinción de esta conducta, el rimonabant redujo

significativamente la conducta de recaída provocada por el estímulo condicionado y por la inyección de metanfetamina. Por último, estudios recientes desarrollados en nuestro laboratorio parecen apoyar también un papel importante del sistema endocannabinoide en las propiedades reforzantes del MDMA. Así, mientras la preferencia de plaza condicionada a MDMA está preservada en los ratones CB1 knockout, estos animales no son capaces de adquirir una conducta de autoadministración intravenosa de MDMA del mismo modo que los animales wild-type (Touriño y cols., en preparación). Así pues, nuestros resultados observados para el caso de la cocaína parecen ser confirmados con los estudios realizados utilizando otros psicoestimulantes tales como la metanfetamina o el MDMA.

Los mecanismos específicos por los cuales el sistema endocannabinoide regula las propiedades adictivas de los psicoestimulantes no están todavía del todo esclarecidos. Existen evidencias experimentales que muestran la participación del sistema endocannabinoide en diferentes procesos que tienen una importancia crucial en el desarrollo de la adicción. En concreto, nos referimos a procesos cognitivos, de aprendizaje, memoria y la respuesta al estrés. Debido a la localización de los receptores CB1 en estructuras relacionadas con dichas funciones, como el hipocampo y la PFC, y a la capacidad de los compuestos cannabinoides para inducir un cierto deterioro cognitivo (Chait y Pierri, 1992; Hampson y Deadwyler, 1998; Sullivan, 2000; Marsicano y cols., 2002; Riedel y Davies, 2005), el sistema endocannabinoide se ha relacionado estrechamente con la modulación de la plasticidad sináptica, en procesos de memoria y aprendizaje. En nuestro estudio hemos demostrado que los animales CB1 knockout adquieren una conducta operante mantenida por agua y comida de manera parecida a los animales wild-type. Estos resultados excluyen la posibilidad de que una alteración del aprendizaje en los ratones deficientes en el receptor CB1 sea la causa de la ausencia de autoadministración de cocaína observada en estos ratones. La motivación por agua y comida, evaluada en un protocolo de razón progresiva, fue similar en ambos genotipos indicando que no existe un déficit motivacional general debido a la ausencia de receptores CB1. Por otra parte, sabemos que la exposición crónica a drogas de abuso induce alteraciones en la transmisión y plasticidad sináptica en preparaciones *in vitro* de VTA, NAc, sustancia gris periacueductal e hipocampo (Ingram y cols., 1998; Martin y cols., 1999; Thomas y cols., 2001; Beurrier y Malenka, 2002; Harrison y cols., 2002; Robbe y cols., 2002; Hoffman y cols., 2003). De manera interesante, los endocannabinoides a través de su función como mensajeros retrógrados modulan los fenómenos de plasticidad sináptica en diferentes áreas relacionadas con la adicción, como son el NAc, la PFC, la amígdala o el hipocampo (Wilson y Nicoll, 2002; Ohno-

Shosaku y cols., 2001). Se ha demostrado que los cannabinoides exógenos como el THC y los endocannabinoides como la anandamida inhiben la inducción de LTP en el hipocampo (Collins y cols., 1994; 1995). Además, estudios bioquímicos y electrofisiológicos han demostrado que un tratamiento agudo de THC, cocaína y anfetamina puede alterar la plasticidad sináptica del sistema de recompensa cerebral (p.e.: en el NAc) bloqueando la inducción de LTD que está mediada por los endocannabinoides (Forgeaud y cols., 2004; Mato y cols., 2004). En la amígdala, a través de la regulación de LTD, los endocannabinoides también participan en la consolidación de la memoria asociativa (Huang y cols., 2003; Azad y cols., 2004). Por otra parte, la exposición a cocaína o anfetamina induce eventos intracelulares en los cuales el sistema endocannabinoide está involucrado. En esta línea, Centonze y cols., (2004) han demostrado que un tratamiento con cocaína es capaz de inducir un aumento de los niveles extracelulares de anandamida en el estriado. Además, han comprobado que la inhibición de la neurotransmisión gabaérgica, vía receptores D2, provocada por un tratamiento de cocaína se puede reducir tras el bloqueo del receptor CB1, indicando que en el estriado los endocannabinoides parecen ser necesarios para que se desarrollen de forma completa las acciones de la cocaína (Centonze y cols., 2004). En vista de estos resultados, podemos postular que la falta de receptores CB1 en nuestros animales mutantes impediría una acción completa de la cocaína, modificando así su valor reforzante e impidiendo el desarrollo de mecanismos adaptativos plásticos que permiten evolucionar desde el efecto reforzante agudo al trastorno de tipo compulsivo que se establece en la adicción.

El sistema endocannabinoide regula la transmisión dopaminérgica (revisión en Gardner, 2005). Sin embargo, en este trabajo no hemos podido evaluar la liberación de dopamina durante la exposición al paradigma de autoadministración de cocaína. A pesar de que el receptor CB1 no participa en el incremento de dopamina extracelular inducido por la administración aguda del psicoestimulante, no podemos descartar que produzca una modulación de la vía mesolímbica dopaminérgica durante la exposición crónica de la droga. Por otra parte, la administración aguda de cocaína en el estudio de microdiálisis se realizó de forma no contingente, mientras que en el paradigma de autoadministración existe contingencia entre la respuesta realizada para obtener el refuerzo y la infusión de cocaína. La asociación contingente entre el refuerzo y la respuesta es fundamental para que se desarrolle el aprendizaje operante que supone el paradigma de autoadministración (Mackintosh, 1983). En consecuencia, el contexto en el cual la cocaína es autoadministrada altera significativamente la respuesta dopaminérgica en el NAc (Hemby y cols., 1997). Así pues, para elucidar si el receptor CB1 regula o no la transmisión dopaminérgica en un paradigma de autoadministración, sería necesario el desarrollo de nuevos experimentos en los que se detectara niveles de

dopamina extracelular durante las sesiones de autoadministración de cocaína, en ratones CB1 knockout. Asimismo, existe la posibilidad de que el sistema endocannabinoide participe en la regulación de procesos reforzantes que son independientes de la dopamina, también involucrados en la motivación de búsqueda compulsiva por la droga (Koob y Nestler, 1997). En este sentido, podemos señalar que la PFC contiene una alta densidad de receptores CB1, y juega un papel importante en los procesos adictivos al constituir un punto de integración entre la información sensorial, la respuesta emocional y la experiencia hedónica (Maldonado y cols., 2006). Así, una posible explicación de la función de los endocannabinoides en la motivación por las drogas de abuso, en particular de los psicoestimulantes, podría estar relacionada con la asociación entre la experiencia de apretar una palanca, el hecho de recibir una infusión de cocaína y la sensación de placer que recibe el animal, integrada en la PFC.

En conjunto, nuestros resultados y otros publicados recientemente (Anggadiredja y cols., 2004; Yamamoto y cols., 2004; Braida y cols., 2005; Touriño y cols., en preparación) nos llevan a proponer que, en efecto, el sistema endocannabinoide también modula las propiedades adictivas de los psicoestimulantes. Así, estos resultados confirman la hipótesis de trabajo y podemos considerar que el sistema cannabinoide es también un sustrato común de la adicción de todas las drogas de abuso. Este hecho puede aportar interés terapéutico en la búsqueda de tratamientos para los fenómenos de adicción. En esta línea, se han desarrollado ensayos clínicos (Programa STRATUS-US, Sanofi-Aventis) para combatir el hábito tabáquico, en los cuales se ha utilizado el bloqueo farmacológico del receptor CB1 con rimonabant. En referencia al tratamiento de la adicción de cocaína, existen numerosas aproximaciones farmacológicas (p.e.: el bloqueo de receptores y transportador de la dopamina, el tratamiento con agonistas de receptores gabaérgicos, terapia sustitutiva e incluso vacunas), sin embargo todavía no se ha conseguido un tratamiento definitivo y eficaz que evite la recaída (de Lima y cols., 2002, van den Brink y van Ree, 2003). Así, sería de gran interés investigar sobre las posibilidades terapéuticas de los antagonistas cannabinoideos en el tratamiento de la dependencia de cocaína, ya que hasta ahora no existe una terapia efectiva para combatir este trastorno.

2. Participación del sistema purinérgico en las propiedades adictivas de diferentes drogas de abuso: THC, cocaína, nicotina y morfina

El segundo objetivo general de este trabajo ha sido estudiar el papel del receptor purinérgico A2A en las propiedades adictivas de diferentes drogas de abuso.

La adenosina tiene un papel relevante en las acciones farmacológicas de la cafeína en el SNC. La cafeína es un antagonista no selectivo de los receptores purinérgicos y posee mayor afinidad por el receptor A2A que por los otros receptores. Si bien se considera que la cafeína no representa una droga de abuso, ha sido ampliamente estudiada por el potencial uso terapéutico en patologías relacionadas con la transmisión dopaminérgica, como la enfermedad de Parkinson (Chen, 2003). La cafeína y otras metilxantinas como la teofilina producen efectos en la conducta opuestos a los análogos de la adenosina, e incrementan la transmisión dopaminérgica en el estriado (revisión en Ferré y cols., 1992). Dosis bajas de cafeína estimulan la actividad locomotora (Boissier y Simon, 1965, Svenningsson y cols., 1995), producen efectos de recompensa en el paradigma de preferencia de plaza condicionada (Brockwell y cols., 1991), y mejoran la realización de conductas instrumentales tanto reforzantes como aversivas (Carney, 1982; Spearman, 1988). Además, el bloqueo del receptor A2A con cafeína y teofilina potencia los efectos inducidos por la anfetamina sobre la activación locomotora (Casas y cols., 1989; Turgeon y cols., 1996; Ferré, 1997), sugiriendo una interacción antagónica entre los receptores A2A y los receptores de dopamina D2. En esta línea, la colocalización de los receptores de adenosina A2A y los receptores de dopamina D2 en las espinas dendríticas de las neuronas estriatopalidales da lugar a la existencia de interacciones funcionales de tipo antagónico entre ambos receptores. Según esta relación, la activación del receptor A2A reduce la afinidad de la dopamina para unirse con el receptor D2 (Ferré y cols., 1991; Kull y cols., 1999). Así, la adenosina regula la transmisión dopaminérgica a través de interacciones antagónicas recíprocas entre los receptores de adenosina A1/dopamina D1 y los receptores de adenosina A2A/dopamina D2 (Franco y cols., 2000). Resultados obtenidos mediante diferentes enfoques experimentales (microdialisis *in vivo*, registros electrofisiológicos) han establecido de forma clara que los receptores A2A ejercen un papel excitatorio sobre la función de las neuronas estriatopalidales, que está relacionado, por lo menos parcialmente, con sus efectos antagónicos sobre el receptor D2 (Ferré y cols., 1992; 1997; Agnati y cols., 2003, Ferré y cols., 2002). Según este modelo, en ratones deficientes en el receptor A2A la ausencia de la acción inhibitoria de dichos receptores A2A sobre los receptores D2, aumentaría la respuesta hiperlocomotora inducida por la administración de psicoestimulantes como la cocaína y la anfetamina. Paradójicamente, Chen y cols., (2000), observaron una respuesta atenuada de la actividad locomotora en ratones A2A knockout tras un tratamiento agudo de cocaína y anfetamina. De forma similar, los mismos autores estudiaron la

sensibilización locomotora producida por un tratamiento crónico de anfetamina y observaron que esta respuesta se encontraba disminuida en los ratones A2A knockout (Bastia y cols., 2005). Nuestros resultados obtenidos con cocaína (Artículo 2) obtienen resultados divergentes con estos trabajos. Nuestro estudio demuestra que los ratones deficientes en el receptor A2A muestran una respuesta locomotora similar a la de sus hermanos wild-type tras un tratamiento agudo y crónico con cocaína (Soria y cols., 2006). Las discrepancias observadas en estos estudios pueden ser debidas a: (1) diferencias en el fondo genético entre las dos cepas de animales: CD1 en nuestro caso (Ledent y cols., 1999) y C57/Bl6 en los otros estudios (Chen y cols., 2000); (2) las diferencias en las condiciones experimentales empleadas para cada estudio. Así pues, los estudios realizados en nuestro laboratorio no revelaron la interacción antagónica entre este receptor y el receptor de dopamina D2, descrita anteriormente. No obstante, existen resultados contradictorios con respecto a la interacción entre el receptor A2A y D2. Así, se ha propuesto una facilitación presináptica de la liberación de dopamina y otros neurotransmisores, mediada por los receptores A2A (Zetterstrom y Fillenz, 1990; Sebastiao y Ribeiro, 1996; Okada y cols., 1996; Choksi y cols., 1997). Así pues, los receptores de adenosina A2A participan de una forma importante en la transmisión dopaminérgica central, y representan una diana interesante para modular de forma selectiva dicha actividad dopaminérgica, y a su vez, la acción de las drogas de abuso.

Los receptores A2A se localizan mayoritariamente en el estriado, y se coexpresan con los receptores D2 de dopamina, regulando la expresión del gen de la proencefalina (Fink y cols., 1992; Schiffmann y Vanderhaeguen, 1993). Las encefalinas, representan uno de los ligandos endógenos de los receptores opioides, que muestran mayor afinidad por los receptores opioides de tipo delta y que se encuentran implicados en los procesos de adicción (Terenius, 1977). En este sentido, el déficit de encefalinas impide el desarrollo de la dependencia de THC y nicotina, tal como ha sido demostrado por diferentes estudio realizados en el ratón knockout para el gen de la preproencefalina (Valverde y cols., 2000; Berrendero y cols., 2004). El receptor de adenosina A2A controla de manera positiva la expresión de las encefalinas en las neuronas estriatopalidales (Schiffmann y Vanderhaeguen, 1993). A pesar de que no se han encontrado cambios significativos en la densidad de receptores opioides en el cerebro de los ratones deficientes en el receptor A2A (Bailey y cols., 2002), se ha observado una disminución de cDNA del precursor de la encefalina en el estriado de dichos ratones knockout (Ledent y cols., 1997). Asimismo, estudios previos en nuestro laboratorio, y otros más recientes, han demostrado que la severidad del síndrome de abstinencia de morfina precipitado por naloxona, se encuentra exacerbado en los animales deficientes en el receptor A2A (Berrendero y cols., 2003, Bailey y cols., 2004) indicando un papel fundamental del receptor A2A en la

dependencia física de morfina. Dada la importante participación del sistema opioide como sustrato neurobiológico de los procesos adictivos (Maldonado, 2003), disponemos de otra evidencia para pensar que el sistema purinérgico a través del receptor A2A y de su modulación sobre el sistema opioide podría mediar también la dependencia física, un componente adicional de la adicción.

Hasta el momento de iniciar el trabajo recogido en esta memoria de doctorado, no se había evaluado directamente la participación de los receptores A2A en los fenómenos reforzantes de las drogas de abuso. El conjunto de trabajos descritos hasta ahora, junto a las interacciones descritas por otros equipos entre los receptores purinérgicos y dopaminérgicos, nos proporcionaban el punto de partida para nuestros estudios. Según nuestra hipótesis, la actuación sobre los receptores purinérgicos podría modificar indirectamente el comportamiento adictivo. Nuestros trabajos nos permiten demostrar que la supresión del receptor A2A afecta directamente a las propiedades adictivas de drogas como el THC, la cocaína, la nicotina y la morfina.

En el estudio realizado con cocaína, el tratamiento agudo con este psicoestimulante indujo el mismo efecto hiperlocomotor en los animales A2A knockout y wild-type. El tratamiento crónico con cocaína provocó la sensibilización de los efectos locomotores producidos por esta droga de una manera similar en los ratones knockout y wild-type. La preferencia de plaza condicionada a cocaína también fue similar en ambos genotipos. Sin embargo, cuando las propiedades reforzantes de la cocaína fueron evaluadas utilizando un paradigma de autoadministración intravenosa de cocaína, pudimos evidenciar que la eficacia reforzante de este psicoestimulante está disminuida en los animales A2A knockout. Así, los animales mutantes fueron capaces de adquirir y mantener una conducta de autoadministración de forma clara y reproducible. Sin embargo, el consumo de cocaína se redujo alrededor de un 50% en los animales knockout en comparación con el consumo observado en los animales wild-type. Al mismo tiempo, el máximo esfuerzo realizado por los animales knockout para la obtención de una infusión de cocaína evaluado en un protocolo de razón progresiva fue inferior que el de los animales wild-type ("Breaking Point" para los ratones wild-type: 36.00 ± 5.14 y knockout: 12.14 ± 3.54 ; $p < 0.01$). Además, los animales mutantes mostraron un desplazamiento vertical descendente de la curva dosis-respuesta respecto a los animales wild-type, indicando una disminución en la eficacia de la cocaína como refuerzo. En conjunto, este estudio nos permite concluir que el receptor A2A es necesario para el desarrollo de la conducta adictiva inducida por cocaína y podríamos especular sobre el hecho de que la ausencia de estos receptores confiere resistencia a las propiedades adictivas de la cocaína.

En los dos estudios realizados con cocaína (Artículo 1 y 2) hemos podido observar algunas cuestiones metodológicas que se prestan a discusión. En primer lugar, hemos encontrado discrepancias entre los resultados obtenidos en los modelos de sensibilización locomotora y autoadministración. Según la teoría de la sensibilización del incentivo, la capacidad de las drogas de desarrollar una conducta adictiva está directamente relacionada con su habilidad de provocar una sensibilización neuroquímica y comportamental (Robinson y Berridge, 1993, De Vries y cols., 1998; Vanderschuren y cols., 1999). Por lo tanto, el hecho de encontrar resultados dispares entre la sensibilización locomotora y la autoadministración demuestra una clara separación entre estos dos fenómenos. En segundo lugar, hemos encontrado diferencias entre los resultados obtenidos en el modelo de condicionamiento espacial y la autoadministración intravenosa, lo cual confirma que los dos paradigmas no son equivalentes y que evalúan aspectos distintos del proceso de adicción. El paradigma de condicionamiento de plaza se utiliza para evaluar de manera indirecta los efectos reforzantes primarios producidos por una droga. Estos efectos primarios son indispensables para el inicio del proceso adictivo, pero no son suficientes para su completo desarrollo. Por otro lado, el paradigma de autoadministración intravenosa permite evaluar procesos más complejos de consolidación de la conducta de búsqueda compulsiva de la droga característicos de la adicción, como el “craving” y la recaída.

En relación a las propiedades adictivas de los cannabinoides, hemos demostrado que el receptor de adenosina A2A modula las propiedades motivacionales asociadas a los efectos farmacológicos del THC (Artículo 3). Al evaluar las respuestas inducidas por el tratamiento agudo de THC, observamos que los efectos antinociceptivos, hipolocomotores e hipotérmicos provocados por la administración de THC están preservados en los animales A2A knockout. De la misma manera, el tratamiento crónico con THC produce el desarrollo de tolerancia a los efectos agudos de forma similar en ambos genotipos, sugiriendo que el receptor A2A no participa en dichos efectos. A pesar de no formar parte de nuestro objetivo inicial, hemos demostrado que el tratamiento crónico con THC altera el patrón circadiano de peso corporal en los animales wild-type. Sin embargo, este efecto no fue observado en los ratones deficientes en el receptor A2A. En este sentido, diversos estudios han propuesto que la activación tónica del receptor A2A en el NAc regula la conducta de ingesta (Nagel y cols., 2003). En este sentido, Kittner y cols., (2004) combinando técnicas neuroquímicas y comportamentales han mostrado que tanto el ATP como la adenosina regulan de manera antagónica la actividad dopaminérgica asociada a la conducta de ingesta. El THC induce diversos efectos sobre la ingesta. A nivel central, aumenta el apetito y la motivación por

sustancias palatables (Koch y Matthews, 2001; Williams y Kirkham, 2002; Cota y cols., 2005). A nivel periférico, los cannabinoides disminuyen el gasto energético y facilitan el acúmulo de energía (Williams y Kirkham, 2002). Así pues, nuestros datos indican que el receptor A2A regula los efectos del THC sobre dicha conducta de ingesta.

En este estudio también hemos evaluado la participación del receptor A2A en la expresión del síndrome de abstinencia de cannabinoides, precipitado por el antagonista CB1 rimonabant. La administración de rimonabant en animales dependientes de THC produjo manifestaciones somáticas características del síndrome de abstinencia de THC (Hutchenson y cols., 1998), como son la piloerección, el temblor de patas, el temblor corporal, la ptosis o las sacudidas. Sin embargo, la severidad de la abstinencia física fue atenuada en los animales deficientes en el receptor A2A, indicando tan sólo una implicación parcial del receptor A2A en expresión física del síndrome de abstinencia de THC.

Del mismo modo, nos interesamos por investigar las propiedades motivacionales inducidas por THC utilizando el paradigma de condicionamiento de plaza. Los efectos reforzantes y aversivos del THC fueron demostrados en los animales wild-type, como habían sido revelados en estudios previos (Valjent y Maldonado, 2000). No obstante, dichos efectos fueron suprimidos en los animales A2A knockout. Para descartar la posibilidad de un déficit de aprendizaje causado por la ausencia de receptores A2A, entrenamos a los ratones en un paradigma de conducta operante mantenido por comida. En ambos genotipos observamos la misma capacidad de adquirir y mantener la conducta operante reforzada por estímulos naturales. De este modo, nuestro trabajo revela por primera vez, que los receptores A2A modulan las propiedades motivacionales del THC, tanto reforzantes como aversivas.

Asimismo, nos ha interesado estudiar la implicación del receptor A2A en la dependencia física de nicotina y en las propiedades motivacionales asociadas a dicha droga (Artículo 4). Los efectos hipolocomotores y antinociceptivos inducidos por una administración aguda de nicotina fueron similares en los animales wild-type y A2A knockout. Estos resultados indican que las acciones farmacológicas de la nicotina están preservadas en estos animales mutantes. En segundo lugar, hemos estudiado la participación del receptor A2A en el síndrome de abstinencia físico de nicotina. En los animales wild-type tratados de forma crónica con nicotina, la administración del antagonista nicotínico mecamilamina precipitó un síndrome de abstinencia físico, tal como había sido demostrado en estudios previos (Castañé y cols., 2002). La severidad de la abstinencia fue similar en ambos genotipos, lo que sugiere que el receptor A2A no parece participar de forma importante en la expresión de la dependencia física de nicotina. Asimismo,

hemos estudiado las propiedades reforzantes de la nicotina utilizando el paradigma de condicionamiento espacial. Los animales wild-type mostraron una preferencia de plaza condicionada por nicotina, efecto que no fue observado en los animales deficientes en el receptor A2A. Por otra parte, los efectos disfóricos inducidos por una dosis elevada de nicotina, evaluados en un paradigma de aversión condicionada al gusto, no se modificaron en los animales A2A knockout, excluyendo la posibilidad de que la supresión genética del receptor A2A en estos ratones pudiera afectar los efectos discriminatorios intrínsecos de la nicotina. Por otra parte, realizamos estudios de microdiálisis *in vivo* tras una administración aguda de nicotina, y observamos un incremento del 60% en los niveles extracelulares de dopamina en los animales wild-type. Este efecto no fue observado en los animales deficientes en el receptor A2A, indicando que el receptor A2A regula de manera específica las propiedades placenteras de la nicotina, posiblemente debido a la interrupción de los efectos de dicha droga sobre la transmisión dopaminérgica en el NAc.

El sistema purinérgico, a través del receptor A2A, modula de forma negativa la expresión del síndrome de abstinencia de morfina, como reveló un trabajo realizado en nuestro laboratorio por Berrendero y cols., (2003). En este estudio, los ratones deficientes en el receptor A2A mostraron una mayor severidad del síndrome de abstinencia de morfina que sus hermanos wild-type. Con estos datos previos, nos decidimos a completar dicho estudio y demostrar la posible implicación del receptor A2A en las propiedades motivacionales de la morfina. Este trabajo nos permite completar el estudio sobre la implicación del receptor A2A en las propiedades adictivas de cuatro drogas prototípicas: cocaína, THC, nicotina y morfina. De este modo, hemos explorado la participación del receptor A2A en las propiedades reforzantes inducidas por la morfina, y también en las propiedades disfóricas asociadas al síndrome de abstinencia de esta droga (Artículo 5). En primer lugar, evaluamos las respuestas inducidas por el tratamiento agudo de morfina en animales deficientes en el receptor A2A. Los efectos hiperlocomotores y antinociceptivos de la morfina fueron similares en animales wild-type y knockout, descartando una modulación purinérgica en las acciones agudas de este opiáceo. Los efectos reforzantes provocados por la morfina administrada a diferentes dosis fueron observados en los animales wild-type mediante el uso del paradigma de condicionamiento espacial. De manera interesante, no se ha observado preferencia de plaza inducida por morfina en los animales deficientes en el receptor A2A. En animales dependientes de morfina, el tratamiento con el antagonista opioide naloxona produce el síndrome de abstinencia físico, que a su vez, se acompaña de efectos subjetivos disfóricos. Utilizando dosis bajas de naloxona (0.05, 0.1 mg/ kg, s.c.)

es posible inducir dicho estado disfórico asociado a la abstinencia morfínica sin la presencia de manifestaciones somáticas evidentes. Así, la aversión de plaza condicionada por la abstinencia de morfina fue suprimida en los animales deficientes en el receptor A2A indicando la participación de los receptores A2A en las propiedades motivacionales de los opiáceos como la morfina.

En resumen, nuestros resultados sugieren un papel crucial de los receptores purinérgicos A2A en las propiedades reforzantes del THC, la nicotina y la morfina, así como una participación de estos receptores en la formación de los estados emocionales negativos asociados a la abstinencia de morfina, y a dosis aversivas de THC y nicotina. Sin embargo, el receptor A2A no parece estar implicado en los efectos reforzantes primarios de la cocaína. Las diferencias observadas respecto a la implicación del receptor A2A en los efectos placenteros de las diferentes drogas evaluadas en el paradigma de condicionamiento espacial podrían estar relacionadas con los diferentes mecanismos de acción que poseen cada uno de estos compuestos. Así, los psicoestimulantes como la cocaína incrementan los niveles de monoaminas bloqueando su recaptación en los terminales del sistema mesolímbico e induciendo un aumento en la liberación de dopamina mediante la unión a su transportador de membrana (Madras y col, 1989). Otras drogas como la nicotina, los opiáceos y el THC, a través de la unión a sus respectivos receptores específicos, actúan de manera indirecta actuando sobre neuronas (gabaérgicas o glutamatérgicas) que a su vez modulan la actividad de las neuronas dopaminérgicas (Kreek y cols., 2002). Se ha demostrado que en el SNC, los receptores de adenosina A2A interaccionan de una manera funcional con los receptores opioides (Noble y Cox, 1995), con el receptor cannabinoide CB1 (Andresson y cols., 2005) y con el receptor nicotínico de acetilcolina (nACh) (Shi y Daly, 1999). Sin embargo, no existen evidencias de una interacción directa entre el receptor A2A y el transportador de dopamina DAT. Así pues, la interacción entre los receptores A2A y los receptores específicos de la morfina, el THC y la nicotina, podría ser la causa por la cual observamos una implicación del receptor A2A en el refuerzo primario de estas drogas. Mientras que en el caso de la cocaína, la participación del sistema purinérgico se encuentra en fases del proceso adictivo posteriores al refuerzo primario.

En relación a las manifestaciones somáticas asociadas al síndrome de abstinencia físico de las drogas evaluadas hemos observado que, en los ratones A2A knockout, la severidad de la abstinencia física de morfina se encuentra aumentada, la de THC disminuida y la de nicotina no se modifica, en comparación con los animales wild-type. Los mecanismos neurológicos del síndrome de abstinencia descritos para el caso de morfina, THC y nicotina no son idénticos (Maldonado, 1997; Kenny y Markou, 2001; Maldonado, 2002). A

pesar de la existencia de una interacción entre opioides, THC y nicotina a diferentes niveles (Navarro y cols., 1998; Del Arco y cols., 2002; Castañé y cols., 2003; Castañé y cols., 2005), se han descrito mecanismos específicos, así como sustratos anatómicos particulares para la abstinencia física de cada una de estas drogas (Maldonado, 1997; Kenny y Markou, 2001; Maldonado, 2002). De esta manera, nuestros resultados sugieren que no existe un mecanismo purinérgico adaptativo común para los fenómenos de dependencia física, sino que la adenosina modularía estos fenómenos mediante mecanismos específicos para cada tipo de droga.

3. Posibles mecanismos implicados en las acciones del sistema purinérgico en los procesos adictivos

En conjunto, nuestros resultados comportamentales y demuestran por primera vez que el sistema purinérgico, a través de los receptores A2A, regula las propiedades adictivas de drogas prototípicas con alto potencial de abuso. Ahora bien, ¿cuál es el mecanismo por el que los receptores A2A regulan los procesos adictivos? Con los datos de los que disponemos, no tenemos una respuesta definitiva a esta cuestión, pero existen diversas evidencias descritas en la literatura que nos permiten postular hipótesis explicativas de nuestros resultados comportamentales.

En primer lugar, basándonos en la relación antagónica descrita entre los receptores de adenosina A2A y los receptores de dopamina D2, nuestros resultados son concordantes con la teoría desarrollada por Volkow y cols., (2002). Estos autores, mediante estudios de neuroimagen (ver apartado 2.3 de la Introducción), establecen una relación directa entre los niveles de receptores D2 en el estriado y la predisposición al abuso de drogas. Así, mientras que individuos adictos muestran una baja densidad de receptores D2, individuos con altos niveles de receptores D2 presentan una protección contra los procesos adictivos (Volkow y cols., 2002; 2003). Según esta teoría predictora de la adicción, el bloqueo de receptores A2A favorecería una mayor afinidad de la dopamina por los receptores D2 confiriendo a los individuos una protección contra las propiedades adictivas de las drogas.

Por otra parte, estudios recientes en grupos de investigación especializados en mecanismos de señalización intracelular (Lindskog y cols., 1999; Dassesse y cols., 2001; Nishi y cols., 2003; Yao y cols., 2003; Svenningsson y cols., 2004) permiten postular una hipótesis complementaria a la anterior, para explicar nuestros resultados relacionados con el receptor A2A y los fenómenos de refuerzo. En el estriado, los receptores A2A no sólo están colocalizados con los receptores D2, también forman complejos funcionales heteroméricos con los receptores de glutamato mGlu5 (Ferré y cols., 2002, Díaz-Cabiale

y cols., 2002). El receptor mGlu5 es un buen candidato como modulador de los procesos de fosforilación regulados por los receptores A2A y D2. Así, el receptor mGlu5 regula directamente la señalización producida por el receptor A2A (Nishi y cols., 2003). Al mismo tiempo, la estimulación del receptor mGlu5 potencia la interacción antagónica existente entre los receptores A2A y D2 (Ferré y cols., 1999, Popoli y cols., 2001). La participación del receptor mGlu5 en los procesos de adicción ha sido estudiada por diferentes grupos de investigación. El bloqueo farmacológico del receptor mGlu5 reduce la conducta de consumo de etanol (Cowen y cols., 2005), de cocaína y de nicotina (Kenny y cols., 2003, Tessari y cols., 2004). Por tanto, no podemos excluir la posibilidad de que la ausencia del receptor purinérgico A2A interfiera la transmisión glutamatérgica procedente de la PFC hacia el estriado, y como consecuencia los mecanismos de placer y refuerzo asociados al consumo de drogas de abuso.

Además de las interacciones a nivel de membrana, se ha demostrado la existencia de una interacción antagónica recíproca entre los receptores A2A y D2 en sistemas de señalización intracelular, como el que controla la actividad de la enzima adenilato ciclasa (Fig. 1). El receptor D2, mediante su acoplamiento a la proteína $G_{i/o}$, inhibe la activación de la adenilato ciclasa producida por la estimulación del receptor A2A, el cual está acoplado a proteínas $G_{s/olf}$ (Kull y cols., 2000, Hillion y cols., 2002, Kudlacek y cols., 2003, Vortherms and Watts, 2004). Como consecuencia de esta interacción recíproca a nivel de la adenilato ciclasa, la estimulación del receptor D2 inhibe los productos de la acumulación del AMPc y de la activación de la proteína PKA originados por la activación del receptor A2A, que son: fosforilación de la proteína DARPP-32, fosforilación del factor de transcripción CREB y activación de la cascada de las MAP quinasas, con la consecuente disminución de la expresión de genes de activación precoz como c-fos o el gen que codifica para la preproencefalina (Agnati y cols., 2003) (Fig. 1). La proteína DARPP-32 tiene un especial interés en la transmisión dopaminérgica, y además se ha demostrado su participación en la modulación de los efectos farmacológicos de una gran variedad de drogas de abuso como son los opioides, los psicoestimulantes, la nicotina y el etanol (Lindskog y cols., 2002, Nairn y cols., 2004, Valjent y cols., 2005). Un estudio realizado con ratones knockout deficientes en la proteína DARPP-32, demostró que las acciones estimulantes de la cafeína dependen de la fosforilación de DARPP-32 (Lindskog y cols., 2002). En la misma línea, dichos ratones knockout mostraron una atenuación de los efectos locomotores inducidos por el tratamiento agudo de cocaína, en comparación con los animales wild-type (Fienberg y cols., 1998), mientras que en otro estudio estos animales mutantes manifestaron un aumento de la sensibilización locomotora tras un tratamiento crónico con cocaína (Hiroi y cols., 1999). Además, las propiedades reforzantes del etanol y la cocaína, evaluadas en el paradigma de condicionamiento espacial y en el modelo de autoadministración

operante intravenosa, fueron reducidas de manera significativa en los ratones deficientes en la proteína DARPP-32 (Risinger y cols., 2001; Zachariou y cols., 2002; Heyser y cols., 2000), demostrando la importancia de dicha proteína en las respuestas relacionadas con las propiedades adictivas de las drogas de abuso. Por otra parte, la activación de los receptores opioides μ y δ modula los efectos inducidos por la adenosina y la dopamina sobre la fosforilación de DARPP-32 (Lindskog y cols., 1999), indicando que el desarrollo de las acciones de las encefalinas en las neuronas espinosas del estriado está modulado por la fosforilación de DARPP-32. La activación de DARPP-32 es un paso crítico para la expresión de dos formas opuestas de plasticidad sináptica, la LTP y la LTD (Calabresi y cols., 2000). Estos fenómenos de plasticidad están estrechamente relacionados con la activación de receptores dopaminérgicos, y como consecuencia con los cambios neuroadaptativos que ocurren tras el consumo prolongado de drogas, que permiten el desarrollo del proceso adictivo. Resulta interesante comprobar que los receptores A2A regulan directamente la fosforilación de DARPP-32 (Svenningsson y cols., 2004). Estos mismos autores han mostrado que los ratones deficientes en el receptor A2A presentan un déficit de la proteína DARPP-32, lo cual guarda relación con el fenotipo hipolocomotor manifestado en estos ratones, y también con la ausencia de efectos reforzantes de las drogas de abuso estudiadas en nuestro trabajo. Por otro lado, también se ha demostrado que los ratones deficientes en el receptor A2A presentan un estado funcional hipodopaminérgico en el estriado y córtex cerebral (Dassesse y cols., 2001) que apoyaría nuestra hipótesis y contribuiría a explicar nuestros resultados.

Por otro lado, la cascada de señalización intracelular inducida por la activación de la PKA y el resultante aumento de la formación de AMPc es un fenómeno estudiado y común en los procesos de adicción de todas las drogas de abuso (Nestler, 2004). En este sentido, se ha observado que cuando se coadministran dosis no efectivas de agonistas CB1 (metanandamida) o agonistas δ opioide (DADLE) con agonistas D2 (NPA), la señalización PKA/AMPc se activa de una manera sinérgica, que requiere a su vez la activación endógena de los receptores de adenosina A2 (Yao y cols., 2003). Estos autores argumentan que la colocalización de receptores A2, D2, δ opioide y CB1 en las mismas neuronas en áreas cerebrales como el NAc confiere hipersensibilidad a la acción de los cannabinoides, los opioides y el etanol. Además, de manera simultánea, esta sinergia aumenta la sensibilidad de la señalización postsináptica ligada a los receptores D2, relacionada con la adicción de drogas de abuso (Yao y cols., 2003).

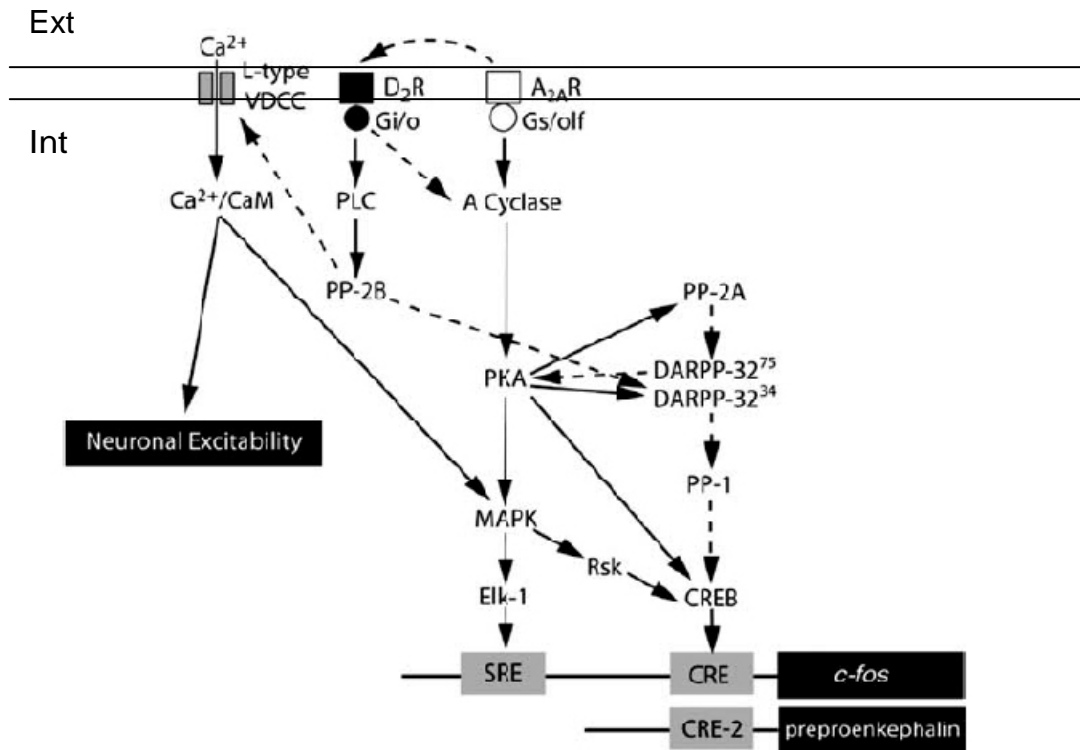


Figura 1. Mecanismos involucrados en distintas interacciones bioquímicas entre los receptores de dopamina D2 y los de adenosina A2A. (Ferré y cols., 2004).

Por otro lado, Andersson y cols., (2005) han observado que el efecto psicomotor de los cannabinoides ocurre gracias a la cascada de señalización intracelular de activación de la PKA, que tiene lugar en las proyecciones estriatales de naturaleza gabaérgica en el NAc. En dicha cascada, la fosforilación de la proteína DARPP-32, dependiente de la activación de la PKA, representa un paso crucial. Mediante estudios bioquímicos, estos autores han demostrado que la fosforilación de la proteína DARPP-32 no ocurre sin una correcta transmisión dopaminérgica y purinérgica mediada por la activación de los receptores D2 y A2A, lo que sugiere de nuevo un papel fundamental del receptor A2A para la completa acción de los cannabinoides. Estos dos trabajos ponen de manifiesto la existencia de una confluencia en las acciones inducidas por los sistemas cannabinoide y purinérgico. Según esta hipótesis la presencia de ambos tipos de receptores, CB1 y A2A, permite que los efectos de las drogas de abuso como los cannabinoides, los opioides y los psicoestimulantes se produzcan de un modo completo. Los resultados mostrados en la presente memoria apoyan esta hipótesis y proponen al sistema purinérgico y en particular a los receptores A2A como un sustrato común en la adicción de drogas de abuso. La manipulación farmacológica de dichos receptores A2A podría suponer una nueva diana terapéutica en el tratamiento de las adicciones. Con todas estas evidencias, y con los resultados comportamentales obtenidos en este trabajo, podemos

apuntar la existencia de mecanismos de adaptación intracelulares, que ocurren tras la liberación de dopamina y la estimulación de receptores D2 que estarían alterados en los ratones A2A knockout. Los cambios en los sistemas de señalización intracelular podrían estar relacionados con las respuestas inducidas por las diferentes drogas evaluadas en dichos ratones mutantes.

En conjunto, nuestros estudios nos permiten afirmar que ambos sistemas, el cannabinoide y el purinérgico, son necesarios para el completo desarrollo del fenómeno adictivo. Así pues, sería de gran interés desarrollar nuevas estrategias de bloqueo de los receptores A2A y CB1 para atenuar e incluso prevenir el desarrollo de la adicción.

A decorative horizontal border at the bottom of the page featuring a repeating pattern of stylized, light gray floral and leaf motifs. The motifs include large, swirling acanthus-like leaves and smaller, more delicate floral elements.

CONCLUSIONES

El trabajo desarrollado en la presente Tesis Doctoral permite extraer las siguientes conclusiones:

1. El sistema endocannabinoide, a través del receptor CB1, participa en la eficacia reforzante de la cocaína. Además, la presencia de dicho receptor es necesaria para los procesos de consolidación de una conducta operante mantenida por la autoadministración de cocaína. Este estudio demuestra la importancia de dicho receptor CB1 en las propiedades adictivas de la cocaína, confirmando que el sistema endocannabinoide es un sustrato común para la adicción de drogas de abuso.
2. Los receptores de adenosina A2A participan en la modulación de las propiedades reforzantes de la cocaína. La supresión de los receptores A2A en el ratón confiere un fenotipo resistente al desarrollo de una conducta compulsiva de búsqueda de cocaína. La manipulación farmacológica de estos receptores podría suponer una nueva diana en el tratamiento de la adicción de cocaína.
3. Los receptores purinérgicos A2A regulan las propiedades gratificantes y aversivas del THC. Además, estos receptores participan en las manifestaciones somáticas inducidas por el síndrome de abstinencia de THC precipitado por rimonabant.
4. Los receptores de adenosina A2A participan en los efectos de recompensa inducidos por la nicotina. Los receptores A2A también participan en el aumento de dopamina extracelular en el NAc inducido por nicotina que está relacionado con sus efectos gratificantes.
5. Las propiedades gratificantes producidas por la morfina están reguladas por la adenosina, a través de los receptores A2A. Los efectos disfóricos asociados al síndrome de abstinencia de morfina dependen igualmente de la activación de estos receptores.
6. El sistema purinérgico, mediante los receptores A2A, representa un nuevo sustrato biológico para explicar el desarrollo del proceso adictivo originado por la exposición a distintas drogas de abuso.

A decorative horizontal border at the bottom of the page featuring a repeating pattern of stylized, light gray floral and leaf motifs. The word "REFERENCIAS" is printed in bold black capital letters over the right side of this border.

REFERENCIAS

- Abbracchio, M. P., Cattabeni, F. (1999) Brain adenosine receptors as targets for therapeutic intervention in neurodegenerative diseases. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **890**, 79-92.
- Abood, M. E., Martin, B. R. (1992) Neurobiology of marijuana abuse. *Trends Pharmacol. Sci.*, **13**, 201-206.
- Adams, I. B., Martin, B. R. (1996) Cannabis: pharmacology and toxicology in animals and humans. *Addiction*, **91**, 1585-1614.
- Aghajanian, G. K. (1978) Tolerance of locus coeruleus neurones to morphine and suppression of withdrawal response by clonidine. *Nature*, **276**, 186-188.
- Agnati, L. F., Ferré, S., Lluís, C., Franco, R., Fuxe, K. (2003) Molecular mechanisms and therapeutical implications of intramembrane receptor/receptor interactions among heptahelical receptors with examples from the striatopallidal GABA neurons. *Pharmacol. Rev.*, **55**, 509-550.
- Ahmed, S. H., Kenny, P. J., Koob, G. F., Markou, A. (2002) Neurobiological evidence for hedonic allostasis associated with escalating cocaine use. *Nat. Neurosci.*, **5**, 625-626.
- Ahmed, S. H., Koob, G. F. (1998) Transition from moderate to excessive drug intake: change in hedonic set point. *Science*, **282**, 298-300.
- Ahmed, S. H., Koob, G. F. (1999) Long-lasting increase in the set point for cocaine self-administration after escalation in rats. *Psychopharmacology*, **146**, 303-312.
- Ahmed, S. H., Koob, G. F. (2005) Transition to drug addiction: a negative reinforcement model based on an allostatic decrease in reward function. *Psychopharmacology*, **180**, 473-490.
- Ahmed, S. H., Walker, J. R., Koob, G. F. (2000) Persistent increase in the motivation to take heroin in rats with a history of drug escalation. *Neuropsychopharmacology*, **22**, 413-421.
- Alger, B. E. (2002) Retrograde signaling in the regulation of synaptic transmission: focus on endocannabinoids. *Prog. Neurobiol.*, **68**, 247-286.
- Alonso, R., Voutsinos, B., Fournier, M., Labie, C., Steinberg, R., Souilhac, J., Le Fur, G., Soubrie, P. (1999) Blockade of cannabinoid receptors by SR141716 selectively increases Fos expression in rat mesocorticolimbic areas via reduced dopamine D2 function. *Neuroscience*, **91**, 607-620.
- Ameri, A. (1999) The effects of cannabinoids on the brain. *Prog. Neurobiol.*, **58**, 315-348.
- Andersson, M., Usiello, A., Borgkvist, A., Pozzi, L., Dominguez, C., Fienberg, A. A., Svenningsson, P., Fredholm, B. B., Borrelli, E., Greengard, P., Fisone, G. (2005) Cannabinoid action depends on phosphorylation of dopamine- and cAMP-regulated phosphoprotein of 32 kDa at the protein kinase A site in striatal projection neurons. *J. Neurosci.*, **25**, 8432-8438.
- Anggadiredja, K., Nakamichi, M., Hiranita, T., Tanaka, H., Shoyama, Y., Watanabe, S., Yamamoto, T. (2004) Endocannabinoid system modulates relapse to methamphetamine

seeking: possible mediation by the arachidonic acid cascade. *Neuropsychopharmacology*, **29**, 1470-1478.

Anthenelli RM, Despres JP. Effects of Rimonabant in the reduction of major cardiovascular risk factors. Results from the STRATUS-US trial (Smoking cessation in smokers motivated to quit), in American College of Cardiology 2004 53rd Annual Scientific Session. New Orleans, LA.

Arnold, J. C. (2005) The role of endocannabinoid transmission in cocaine addiction. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **81**, 396-406.

Arnone, M., Maruani, J., Chaperon, F., Thiebot, M. H., Poncelet, M., Soubrie, P., Le Fur, G. (1997) Selective inhibition of sucrose and ethanol intake by SR 141716, an antagonist of central cannabinoid (CB1) receptors. *Psychopharmacology*, **132**, 104-106.

Arroyo, M., Markou, A., Robbins, T. W., Everitt, B. J. (1998) Acquisition, maintenance and reinstatement of intravenous cocaine self-administration under a second-order schedule of reinforcement in rats: effects of conditioned cues and continuous access to cocaine. *Psychopharmacology*, **140**, 331-344.

Azad, S. C., Monory, K., Marsicano, G., Cravatt, B. F., Lutz, B., Zieglgansberger, W., Rammes, G. (2004) Circuitry for associative plasticity in the amygdala involves endocannabinoid signaling. *J. Neurosci.*, **24**, 9953-9961.

Bailey, A., Davis, L., Lesscher, H. M., Kelly, M. D., Ledent, C., Hourani, S. M., Kitchen, I. (2004) Enhanced morphine withdrawal and micro-opioid receptor G-protein coupling in A2A adenosine receptor knockout mice. *J. Neurochem.*, **88**, 827-834.

Bailey, A., Ledent, C., Kelly, M., Hourani, S. M., Kitchen, I. (2002) Changes in spinal delta and kappa opioid systems in mice deficient in the A2A receptor gene. *J. Neurosci.*, **22**, 9210-9220.

Baker, D., Pryce, G., Davies, W. L., Hiley, C. R. (2006) In silico patent searching reveals a new cannabinoid receptor. *Trends Pharmacol. Sci.*, **27**, 1-4.

Baker, T. S. (1987) Prescription addiction. *N. J. Med.*, **84**, 565-566.

Baldo, B. A., Koob, G. F., Markou, A. (1999) Role of adenosine A2 receptors in brain stimulation reward under baseline conditions and during cocaine withdrawal in rats. *J. Neurosci.*, **19**, 11017-11026.

Balerio, G. N., Aso, E., Berrendero, F., Murtra, P., Maldonado, R. (2004) Delta9-tetrahydrocannabinol decreases somatic and motivational manifestations of nicotine withdrawal in mice. *Eur. J. Neurosci.*, **20**, 2737-2748.

Bardo, M. T., Bevins, R. A. (2000) Conditioned place preference: what does it add to our preclinical understanding of drug reward? *Psychopharmacology*, **153**, 31-43.

Bastia, E., Xu, Y. H., Scibelli, A. C., Day, Y. J., Linden, J., Chen, J. F., Schwarzschild, M. A. (2005) A crucial role for forebrain adenosine A(2A) receptors in amphetamine sensitization. *Neuropsychopharmacology*, **30**, 891-900.

Baunez, C., Dias, C., Cador, M., Amalric, M. (2005) The subthalamic nucleus exerts opposite control on cocaine and 'natural' rewards. *Nat. Neurosci.*, **8**, 484-489.

- Becker, A., Grecksch, G., Kraus, J., Loh, H. H., Schroeder, H., Holtt, V. (2002) Rewarding effects of ethanol and cocaine in mu opioid receptor-deficient mice. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.*, **365**, 296-302.
- Bensaid, M., Gary-Bobo, M., Esclangon, A., Maffrand, J. P., Le Fur, G., Oury-Donat, F., Soubrie, P. (2003) The cannabinoid CB1 receptor antagonist SR141716 increases Acrp30 mRNA expression in adipose tissue of obese fa/fa rats and in cultured adipocyte cells. *Mol.Pharmacol.*, **63**, 908-914.
- Berdyshev, E. V. (2000) Cannabinoid receptors and the regulation of immune response. *Chem. Phys. Lipids*, **108**, 169-190.
- Berne, R. M. (1963) Cardiac nucleotides in hypoxia: possible role in regulation of coronary blood flow. *Am. J. Physiol*, **204**, 317-322.
- Berrendero, F., Mendizábal, V., Robledo, P., Galeote, L., Bilkei-Gorzo, A., Zimmer, A., Maldonado, R. (2005) Nicotine-induced antinociception, rewarding effects, and physical dependence are decreased in mice lacking the preproenkephalin gene. *J. Neurosci.*, **25**, 1103-1112.
- Berrendero, F., Castañé, A., Ledent, C., Parmentier, M., Maldonado, R., Valverde, O. (2003) Increase of morphine withdrawal in mice lacking A2a receptors and no changes in CB1/A2a double knockout mice. *Eur. J. Neurosci.*, **17**, 315-324.
- Berrendero, F., Kieffer, B. L., Maldonado, R. (2002) Attenuation of nicotine-induced antinociception, rewarding effects, and dependence in mu-opioid receptor knock-out mice. *J. Neurosci.*, **22**, 10935-10940.
- Beurrier, C., Malenka, R. C. (2002) Enhanced inhibition of synaptic transmission by dopamine in the nucleus accumbens during behavioral sensitization to cocaine. *J. Neurosci.*, **22**, 5817-5822.
- Biala, G., Weglinska, B. (2006) On the mechanism of cross-tolerance between morphine- and nicotine-induced antinociception: involvement of calcium channels. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*, **30**, 15-21.
- Bloom, A. S., Dewey, W. L. (1978) A comparison of some pharmacological actions of morphine and delta9-tetrahydrocannabinol in the mouse. *Psychopharmacology*, **57**, 243-248.
- Blum, K., Noble, E. P., Sheridan, P. J., Montgomery, A., Ritchie, T., Ozkaragoz, T., Fitch, R. J., Wood, R., Finley, O., Sadlack, F. (1993) Genetic predisposition in alcoholism: association of the D2 dopamine receptor TaqI B1 RFLP with severe alcoholics. *Alcohol*, **10**, 59-67.
- Boissier, J. R., Smon, P. (1965) Action of caffeine on the spontaneous motility of the mouse. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.*, **158**, 212-221.
- Bonci, A., Williams, J. T. (1997) Increased probability of GABA release during withdrawal from morphine. *J. Neurosci.*, **17**, 796-803.
- Bond., C., LaForge, K. S., Tian, M., Melia, D., Zhang, S., Borg, L., Gong, J., Schluger, J., Strong, J. A., Leal, S. M., Tischfield, J. A., Kreek, M. J., Yu, L. (1998) Single-nucleotide polymorphism in the human mu opioid receptor gene alters beta-endorphin

binding and activity: possible implications for opiate addiction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **95**, 9608-9613.

Bossert, J. M., Ghitza, U. E., Lu, L., Epstein, D. H., Shaham, Y. (2005) Neurobiology of relapse to heroin and cocaine seeking: an update and clinical implications. *Eur.J.Pharmacol.*, **526**, 36-50.

Bouaboula, M., Poinot-Chazel, C., Bourrie, B., Canat, X., Calandra, B., Rinaldi-Carmona, M., Le Fur, G., Casellas, P. (1995) Activation of mitogen-activated protein kinases by stimulation of the central cannabinoid receptor CB1. *Biochem. J.*, **312**, 637-641.

Braida, D., Iosue, S., Pegorini, S., Sala, M. (2005) 3, 4 Methylendioxyamphetamine-induced conditioned place preference (CPP) is mediated by endocannabinoid system. *Pharmacol. Res.*, **51**, 177-182.

Braida, D., Pozzi, M., Parolaro, D., Sala, M. (2001) Intracerebral self-administration of the cannabinoid receptor agonist CP 55, 940 in the rat: interaction with the opioid system. *Eur. J. Pharmacol.*, **413**, 227-234.

Brockwell, N. T., Beninger, R. J. (1996) The differential role of A1 and A2 adenosine receptor subtypes in locomotor activity and place conditioning in rats. *Behav. Pharmacol.*, **7**, 373-383.

Brockwell, N. T., Eikelboom, R., Beninger, R. J. (1991) Caffeine-induced place and taste conditioning: production of dose-dependent preference and aversion. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **38**, 513-517.

Brown, C. R., Benowitz, N. L. (1989) Caffeine and cigarette smoking: behavioral, cardiovascular, and metabolic interactions. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **34**, 565-570.

Brown, H. (2001) American Chemical Society--222nd national meeting. Cannabinoids: a tale of use and abuse. *IDrugs*, **4**, 1096-1099.

Brundege, J. M., Dunwiddie, T. V. (1996) Modulation of excitatory synaptic transmission by adenosine released from single hippocampal pyramidal neurons. *J. Neurosci.*, **16**, 5603-5612.

Brundege, J. M., Williams, J. T. (2002) Increase in adenosine sensitivity in the nucleus accumbens following chronic morphine treatment. *J Neurophysiol.*, **87**, 1369-1375.

Buckley NE, McCoy KL, Mezey E, Bonner T, Zimmer A, Felder CC, Glass M, Zimmer A (2000) Immunomodulation by cannabinoids is absent in mice deficient for the cannabinoid CB(2) receptor. *Eur J Pharmacol* 396: 141-149.

Buisson, B., Bertrand, D. (2002) Nicotine addiction: the possible role of functional upregulation. *Trends Pharmacol. Sci.*, **23**, 130-136.

Burnstock, G. (1972) Purinergic nerves. *Pharmacol. Rev.*, **24**, 509-581

Burnstock, G. (1976) Do some nerve cells release more than one transmitter? *Neuroscience*, **1**, 239-248.

Burnstock, G. (1978) A basis for distinguishing two types of purinergic receptor. In ***Cell Membrane Receptors for Drugs and Hormones: A Multidisciplinary Approach***, R. W. Straub and L. Bolis (ed.), pp. 107-118. Raven Press, New York.

- Burt, A. R., Carr, I. C., Mullaney, I., Anderson, N. G., Milligan, G. (1996) Agonist activation of p42 and p44 mitogen-activated protein kinases following expression of the mouse delta opioid receptor in Rat-1 fibroblasts: effects of receptor expression levels and comparisons with G-protein activation. *Biochem. J.*, **320**, 227-235.
- Caillé, S., Parsons, L. H. (2003) SR141716A reduces the reinforcing properties of heroin but not heroin-induced increases in nucleus accumbens dopamine in rats. *Eur. J. Neurosci.*, **18**, 3145-3149.
- Caine, S. B., Negus, S. S., Mello, N. K., Patel, S., Bristow, L., Kulagowski, J., Vallone, D., Saiardi, A., Borrelli, E. (2002) Role of dopamine D2-like receptors in cocaine self-administration: studies with D2 receptor mutant mice and novel D2 receptor antagonists. *J Neurosci.*, **22**, 2977-2988.
- Caine, S. B., Koob, G. F. (1993) Modulation of cocaine self-administration in the rat through D-3 dopamine receptors. *Science*, **260**, 1814-1816.
- Calabresi, P., Gubellini, P., Centonze, D., Picconi, B., Bernardi, G., Chergui, K., Svenningsson, P., Fienberg, A. A., Greengard, P. (2000) Dopamine and cAMP-regulated phosphoprotein 32 kDa controls both striatal long-term depression and long-term potentiation, opposing forms of synaptic plasticity. *J. Neurosci.*, **20**, 8443-8451.
- Camí, J., Farré, M. (2003) Drug addiction. *N. Engl. J Med.*, **349**, 975-986.
- Capasso, A. (2000) Adenosine receptors are involved in the control of acute naloxone-precipitated withdrawal: in vitro evidence. *Life Sci.* 2000. ;66. (10):873. -83., **66**, 873-883.
- Capriles, N., Rodaros, D., Sorge, R. E., Stewart, J. (2003) A role for the prefrontal cortex in stress- and cocaine-induced reinstatement of cocaine seeking in rats. *Psychopharmacology* **168**, 66-74.
- Carboni, E., Vacca, C. (2003) Conditioned place preference. A simple method for investigating reinforcing properties in laboratory animals. *Methods Mol. Med.*, **79**, 481-498.
- Carelli, R. M., Wightman, R. M. (2004) Functional microcircuitry in the accumbens underlying drug addiction: insights from real-time signaling during behavior. *Curr.Opin.Neurobiol.*, **14**, 763-768.
- Carelli, R. M., Wondolowski, J. (2003) Selective encoding of cocaine versus natural rewards by nucleus accumbens neurons is not related to chronic drug exposure. *J Neurosci.*, **23**, 11214-11223.
- Carelli, R. M., Ijames, S. G., Crumling, A. J. (2000) Evidence that separate neural circuits in the nucleus accumbens encode cocaine versus "natural" (water and food) reward. *J Neurosci.*, **20**, 4255-4266.
- Carney, J. M. (1982) Effects of caffeine, theophylline and theobromine on scheduled controlled responding in rats. *Br. J. Pharmacol.*, **75**, 451-454.
- Carroll, M. E., Meisch, R. A. (1981) Determinants of increased drug self-administration due to food deprivation. *Psychopharmacology*, **74**, 197-200.

- Casas, M., Ferré, S., Cobos, A., Grau, J. M., Jane, F. (1989) Relationship between rotational behaviour induced by apomorphine and caffeine in rats with unilateral lesion of the nigrostriatal pathway. *Neuropharmacology*, **28**, 407-409.
- Castañé, A., Berrendero, F., Maldonado, R. (2005) The role of the cannabinoid system in nicotine addiction. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **81**, 381-386.
- Castañé, A., Maldonado, R., Valverde, O. (2004) Role of different brain structures in the behavioural expression of WIN 55,212-2 withdrawal in mice. *Br. J. Pharmacol.*, **142**, 1309-1317.
- Castañé, A., Robledo, P., Matifas, A., Kieffer, B. L., Maldonado, R. (2003) Cannabinoid withdrawal syndrome is reduced in double mu and delta opioid receptor knockout mice. *Eur. J. Neurosci.*, **17**, 155-159.
- Castañé, A., Valjent, E., Ledent, C., Parmentier, M., Maldonado, R., Valverde, O. (2002) Lack of CB1 cannabinoid receptors modifies nicotine behavioural responses, but not nicotine abstinence. *Neuropharmacology*, **43**, 857.
- Centonze, D., Battista, N., Rossi, S., Mercuri, N. B., Finazzi-Agro, A., Bernardi, G., Calabresi, P., Maccarrone, M. (2004) A critical interaction between dopamine D2 receptors and endocannabinoids mediates the effects of cocaine on striatal gabaergic Transmission. *Neuropsychopharmacology*, **29**, 1488-1497.
- Chait, L. D., Pierri, J. (1992) Effects of smoked marijuana on human performance: A critical Review. In *Marijuana/ Cannabinoids: Neurobiology and Neurophysiology*. Ed A. Murphy, J. Bartke, CRC Press.
- Chang, J. Y., Sawyer, S. F., Lee, R. S., Woodward, D. J. (1994) Electrophysiological and pharmacological evidence for the role of the nucleus accumbens in cocaine self-administration in freely moving rats. *J. Neurosci.*, **14**, 1224-1244.
- Chaperon, F., Soubrie, P., Puech, A. J., Thiebot, M. H. (1998) Involvement of central cannabinoid (CB1) receptors in the establishment of place conditioning in rats. *Psychopharmacology*, **135**, 324-332.
- Chen, J. F. (2003) The adenosine A(2A) receptor as an attractive target for Parkinson's disease treatment. *Drug News Perspect.*, **16**, 597-604.
- Chen, J. F., Beilstein, M., Xu, Y. H., Turner, T. J., Moratalla, R., Standaert, D. G., Aloyo, V. J., Fink, J. S., Schwarzschild, M. A. (2000) Selective attenuation of psychostimulant-induced behavioral responses in mice lacking A(2A) adenosine receptors. *Neuroscience.*, **97**, 195-204.
- Chen, J. F., Huang, Z., Ma, J., Zhu, J., Moratalla, R., Standaert, D., Moskowitz, M. A., Fink, J. S., Schwarzschild, M. A. (1999) A(2A) adenosine receptor deficiency attenuates brain injury induced by transient focal ischemia in mice. *J. Neurosci.*, **19**, 9192-9200.
- Chen, J. P., Paredes, W., Li, J., Smith, D., Lowinson, J., Gardner, E. L. (1990) Delta 9-tetrahydrocannabinol produces naloxone-blockable enhancement of presynaptic basal dopamine efflux in nucleus accumbens of conscious, freely-moving rats as measured by intracerebral microdialysis. *Psychopharmacology*, **102**, 156-162.

- Choksi, N. Y., Hussain, A., Booth, R. G. (1997) 2-Phenylaminoadenosine stimulates dopamine synthesis in rat forebrain in vitro and in vivo via adenosine A2 receptors. *Brain Res.*, **761**, 151-155.
- Clarke, P. B., Pert, A. (1985) Autoradiographic evidence for nicotine receptors on nigrostriatal and mesolimbic dopaminergic neurons. *Brain Res.*, **348**, 355-358.
- Coe, I. R., Dohrman, D. P., Constantinescu, A., Diamond, I., Gordon, A. S. (1996) Activation of cyclic AMP-dependent protein kinase reverses tolerance of a nucleoside transporter to ethanol. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **276**, 365-369.
- Cohen, C., Perrault, G., Griebel, G., Soubrie, P. (2005) Nicotine-associated cues maintain nicotine-seeking behavior in rats several weeks after nicotine withdrawal: reversal by the cannabinoid (CB1) receptor antagonist, rimonabant (SR141716). *Neuropsychopharmacology*, **30**, 145-155.
- Cohen, C., Perrault, G., Voltz, C., Steinberg, R., Soubrie, P. (2002) SR141716, a central cannabinoid (CB1) receptor antagonist, blocks the motivational and dopamine-releasing effects of nicotine in rats. *Behav. Pharmacol.*, **13**, 451-463.
- Collins, A. C., Marks, M. J., Pauly, J. R. (1989) Differential effect of chronic nicotine treatment on nicotinic receptor numbers in various brain regions of mice. *J. Subst. Abuse*, **1**, 273-286.
- Collins, D. R., Pertwee, R. G., Davies, S. N. (1995) Prevention by the cannabinoid antagonist, SR141716A, of cannabinoid-mediated blockade of long-term potentiation in the rat hippocampal slice. *Br. J. Pharmacol.*, **115**, 869-870.
- Collins, G. G. (1994) The characteristics and pharmacology of olfactory cortical LTP induced by theta-burst high frequency stimulation and 1S,3R-ACPD. *Neuropharmacology*, **33**, 87-95.
- Collins, R. J., Weeks, J. R., Cooper, M. M., Good, P. I., Russell, R. R. (1984) Prediction of abuse liability of drugs using IV self-administration by rats. *Psychopharmacology*, **82**, 6-13.
- Colombo, G., Agabio, R., Fa, M., Guano, L., Lobina, C., Loche, A., Reali, R., Gessa, G. L. (1998) Reduction of voluntary ethanol intake in ethanol-preferring sP rats by the cannabinoid antagonist SR-141716. *Alcohol Alcohol*, **33**, 126-130.
- Corringer, P. J., Le Novere, N., Changeux, J. P. (2000) Nicotinic receptors at the amino acid level. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **40**, 431-458.
- Cossu, G., Ledent, C., Fattore, L., Imperato, A., Bohme, G. A., Parmentier, M., Fratta, W. (2001) Cannabinoid CB1 receptor knockout mice fail to self-administer morphine but not other drugs of abuse. *Behav. Brain Res.*, **118**, 61-65.
- Cota, D., Tschop, M. H., Horvath, T. L., Levine, A. S. (2005) Cannabinoids, opioids and eating behavior: The molecular face of hedonism? *Brain Res. Rev.*, [Epub ahead of print]
- Cowen, M. S., Djouma, E., Lawrence, A. J. (2005) The metabotropic glutamate 5 receptor antagonist 3-[(2-methyl-1, 3-thiazol-4-yl)ethynyl]-pyridine reduces ethanol self-administration in multiple strains of alcohol-preferring rats and regulates olfactory glutamatergic systems. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **315**, 590-600.

- Crabbe, J. C., Belknap, J. K., Buck, K. J. (1994) Genetic animal models of alcohol and drug abuse. *Science*, **264**, 1715-1723.
- Cravatt, B. F., Giang, D. K., Mayfield, S. P., Boger, D. L., Lerner, R. A., Gilula, N. B. (1996) Molecular characterization of an enzyme that degrades neuromodulatory fatty-acid amides. *Nature*, **384**, 83-87.
- Cravatt, B. F., Prospero-Garcia, O., Suzdak, G., Gilula, N. B., Henriksen, S. J., Boger, D. L., Lerner, R. A. (1995) Chemical characterization of a family of brain lipids that induce sleep. *Science*, **268**, 1506-1509.
- Cummings, S., Elde, R., Ellis, J., Lindall, A. (1983) Corticotropin-releasing factor immunoreactivity is widely distributed within the central nervous system of the rat: an immunohistochemical study. *J. Neurosci.*, **3**, 1355-1368.
- Daly, J. W., Fredholm, B. B. (1998) Caffeine--an atypical drug of dependence. *Drug Alcohol Depend.*, **51**, 199-206.
- Daly, J. W., Shi, D., Wong, V., Nikodijevic, O. (1994) Chronic effects of ethanol on central adenosine function of mice. *Brain Res.*, **650**, 153-156.
- Dar, M. S. (2000) Cerebellar CB(1) receptor mediation of Delta(9)-THC-induced motor incoordination and its potentiation by ethanol and modulation by the cerebellar adenosinergic A(1) receptor in the mouse. *Brain Res.*, **864**, 186-194.
- Dassesse, D., Massie, A., Ferrari, R., Ledent, C., Parmentier, M., Arckens, L., Zoli, M., Schiffmann, S. N. (2001) Functional striatal hypodopaminergic activity in mice lacking adenosine A(2A) receptors. *J. Neurochem.*, **78**, 183-198.
- de Lima, M. S., Oliveira Soares, B. G., Reisser, A. A., Farrell, M. (2002) Pharmacological treatment of cocaine dependence: a systematic review. *Addiction*, **97**, 931-949.
- de Mendonca, A., Ribeiro, J. A. (1994) Endogenous adenosine modulates long-term potentiation in the hippocampus. *Neuroscience*, **62**, 385-390.
- De Vries, T. J., de Vries, W., Janssen, M. C., Schoffelmeer, A. N. (2005) Suppression of conditioned nicotine and sucrose seeking by the cannabinoid-1 receptor antagonist SR141716A. *Behav. Brain Res.*, **161**, 164-168.
- De Vries, T. J., Homberg, J. R., Binnekade, R., Raaso, H., Schoffelmeer, A. N. (2003) Cannabinoid modulation of the reinforcing and motivational properties of heroin and heroin-associated cues in rats. *Psychopharmacology*, **168**, 164-169.
- De Vries, T. J., Schoffelmeer, A. N., Binnekade, R., Raaso, H., Vanderschuren, L. J. (2002) Relapse to cocaine- and heroin-seeking behavior mediated by dopamine D2 receptors is time-dependent and associated with behavioral sensitization. *Neuropsychopharmacology.*, **26**, 18-26.
- De Vries, T. J., Shippenberg, T. S. (2002) Neural systems underlying opiate addiction. *J. Neurosci.*, **22**, 3321-3325.
- De Vries, T. J., Shaham, Y., Homberg, J. R., Crombag, H., Schuurman, K., Dieben, J., Vanderschuren, L. J., Schoffelmeer, A. N. (2001) A cannabinoid mechanism in relapse to cocaine seeking. *Nat. Med.*, **7**, 1151-1154.

- De Vries, T. J., Schoffelmeer, A. N., Binnekade, R., Mulder, A. H., Vanderschuren, L. J. (1998) Drug-induced reinstatement of heroin- and cocaine-seeking behaviour following long-term extinction is associated with expression of behavioural sensitization. *Eur. J. Neurosci.*, **10**, 3565-3571.
- Decker, M. W., Rueter, L. E., Bitner, R. S. (2004) Nicotinic acetylcholine receptor agonists: a potential new class of analgesics. *Curr. Top. Med. Chem.*, **4**, 369-384.
- Degenhardt, L., Hall, W., Lynskey, M. (2001) Alcohol, cannabis and tobacco use among Australians: a comparison of their associations with other drug use and use disorders, affective and anxiety disorders, and psychosis. *Addiction*, **96**, 1603-1614.
- Del Arco, I., Navarro, M., Bilbao, A., Ferrer, B., Piomelli, D., Rodriguez De Fonseca, F. (2002) Attenuation of spontaneous opiate withdrawal in mice by the anandamide transport inhibitor AM404. *Eur. J. Pharmacol.*, **454**, 103-104.
- Delicado, E. G., Casillas, T., Sen, R. P., Miras-Portugal, M. T. (1994) Evidence that adenine nucleotides modulate nucleoside-transporter function. Characterization of uridine transport in chromaffin cells and plasma membrane vesicles. *Eur. J. Biochem.*, **225**, 355-362.
- Deminiere, J. M., Piazza, P. V., Le Moal, M., Simon, H. (1989) Experimental approach to individual vulnerability to psychostimulant addiction. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, **13**, 141-147.
- Deroche, V., Caine, S. B., Heyser, C. J., Polis, I., Koob, G. F., Gold, L. H. (1997) Differences in the liability to self-administer intravenous cocaine between C57BL/6 x SJL and BALB/cByJ mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **57**, 429-440.
- Deroche-Gamonet, V., Belin, D., Piazza, P. V. (2004) Evidence for addiction-like behavior in the rat. *Science*, **305**, 1014-1017.
- DeSanty, K. P., Dar, M. S. (2001) Involvement of the cerebellar adenosine A(1) receptor in cannabinoid-induced motor incoordination in the acute and tolerant state in mice. *Brain Res.*, **905**, 178-187.
- Devane, W. A., Hanus, L., Breuer, A., Pertwee, R. G., Stevenson, L. A., Griffin, G., Gibson, D., Mandelbaum, A., Etinger, A., Mechoulam, R. (1992) Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science*, **258**, 1946-1949.
- Devane, W. A., Dysarz, F. A., III, Johnson, M. R., Melvin, L. S., Howlett, A. C. (1988) Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. *Mol. Pharmacol.*, **34**, 605-613.
- Di Chiara, G. (2002) Nucleus accumbens shell and core dopamine: differential role in behavior and addiction. *Behav. Brain Res.*, **137**, 75-114.
- Di Chiara, G., Imperato, A. (1988) Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely moving rats. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **85**, 5274-5278.
- Di Ciano, P., Underwood, R. J., Hagan, J. J., Everitt, B. J. (2003) Attenuation of cue-controlled cocaine-seeking by a selective D3 dopamine receptor antagonist SB-277011-A. *Neuropsychopharmacology*, **28**, 329-338.

Di Marzo, V, Goparaju, S. K., Wang, L., Liu, J., Batkai, S., Jarai, Z., Fezza, F., Miura, G. I., Palmiter, R. D., Sugiura, T., Kunos, G. (2001) Leptin-regulated endocannabinoids are involved in maintaining food intake. *Nature*, **410**, 822-825.

Di Marzo, V, Breivogel, C. S., Tao, Q., Bridgen, D. T., Razdan, R. K., Zimmer, A. M., Zimmer, A., Martin, B. R. (2000) Levels, metabolism, and pharmacological activity of anandamide in CB(1) cannabinoid receptor knockout mice: evidence for non-CB(1), non-CB(2) receptor-mediated actions of anandamide in mouse brain. *J. Neurochem.*, **75**, 2434-2444.

Di Marzo, V, Fontana, A., Cadas, H., Schinelli, S., Gimino, G., Schwartz, J. C., Piomelli, D. (1994) Formation and inactivation of endogenous cannabinoid anandamide in central neurons. *Nature*, **372**, 686-691.

Díaz, J., Pilon, C., Le Foll, B., Gros, C., Triller, A., Schwartz, J. C., Sokoloff, P. (2000) Dopamine D3 receptors expressed by all mesencephalic dopamine neurons. *J. Neurosci.*, **20**, 8677-8684.

Díaz-Cabiale, Z., Vivo, M., Del Arco, A., O'Connor, W. T., Harte, M. K., Muller, C. E., Martinez, E., Popoli, P., Fuxe, K., Ferré, S (2002) Metabotropic glutamate mGlu5 receptor-mediated modulation of the ventral striopallidal GABA pathway in rats. Interactions with adenosine A(2A) and dopamine D(2) receptors. *Neurosci. Lett.*, **324**, 154-158.

Dinh, T. P., Carpenter, D., Leslie, F. M., Freund, T. F., Katona, I., Sensi, S. L., Kathuria, S., Piomelli, D. (2002) Brain monoglyceride lipase participating in endocannabinoid inactivation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **99**, 10819-10824.

Dixon, A. K., Gubitza, A. K., Srinathsinghji, D. J., Richardson, P. J., Freeman, T. C. (1996) Tissue distribution of adenosine receptor mRNAs in the rat. *Br. J. Pharmacol.*, **118**, 1461-1468.

Doolittle, D. J., Winegar, R., Lee, C. K., Caldwell, W. S., Hayes, A. W., de Bethizy, J. D. (1995) The genotoxic potential of nicotine and its major metabolites. *Mutat. Res.*, **344**, 95-102.

Drury A., N., Szent-Gyorgyi A. (1929). The physiological activity of adenine compounds with especial reference to their action upon the mammalian heart. *J. Physiol.*, **68**, 213-37.

Ducobu, J. (2005) The endocannabinoid system and the regulation of the metabolism. *J. Pharm. Belg.*, **60**, 84-88.

Dunwiddie, T. V., Masino, S. A. (2001) The role and regulation of adenosine in the central nervous system. *Annu. Rev. Neurosci.*, **24**, 31-55.

Emmett-Oglesby, M. W., Peltier, R. L., Depoortere, R. Y., Pickering, C. L., Hooper, M. L., Gong, Y. H., Lane, J. D. (1993) Tolerance to self-administration of cocaine in rats: time course and dose-response determination using a multi-dose method. *Drug Alcohol Depend.*, **32**, 247-256.

Engler, R. L. (1991) Adenosine. The signal of life? *Circulation*, **84**, 951-954.

- Fattore, L., Cossu, G., Martellotta, C. M., Fratta, W. (2001) Intravenous self-administration of the cannabinoid CB1 receptor agonist WIN 55, 212-2 in rats. *Psychopharmacology*, **156**, 410-416.
- Felder, C. C., Joyce, K. E., Briley, E. M., Mansouri, J., Mackie, K., Blond, O., Lai, Y., Ma, A. L., Mitchell, R. L. (1995) Comparison of the pharmacology and signal transduction of the human cannabinoid CB1 and CB2 receptors. *Mol. Pharmacol.*, **48**, 443-450.
- Ferraro, T.N., Golden, G.T., Smith, G.G., Martin, J.F., Schwebel, C.L., Doyle, G.A., Buono, R.J., Berrettini, W.H. (2005) Confirmation of a major QTL influencing oral morphine intake in C57 and DBA mice using reciprocal congenic strains. *Neuropsychopharmacology* **30**: 742-746.
- Ferré, S., Ciruela, F., Canals, M., Marcellino, D., Burgueno, J., Casado, V., Hillion, J., Torvinen, M., Fanelli, F., Benedetti, P. P., Goldberg, S R., Bouvier, M., Fuxe, K., Agnati, L. F., Lluís, C., Franco, R., Woods, A. (2004) Adenosine A2A-dopamine D2 receptor-receptor heteromers. Targets for neuro-psychiatric disorders. *Parkinsonism. Relat Disord.*, **10**, 265-271.
- Ferré, S., Karcz-Kubicha, M., Hope, B. T., Popoli, P., Burgueno, J., Gutierrez, M. A., Casado, V., Fuxe, K., Goldberg, S R., Lluís, C., Franco, R., Ciruela, F. (2002) Synergistic interaction between adenosine A2A and glutamate mGlu5 receptors: implications for striatal neuronal function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S A.* **99**, 11940-11945.
- Ferré, S., Popoli, P., Rimondini, R., Reggio, R., Kehr, J., Fuxe, K. (1999) Adenosine A2A and group I metabotropic glutamate receptors synergistically modulate the binding characteristics of dopamine D2 receptors in the rat striatum. *Neuropharmacology*, **38**, 129-140.
- Ferré, S., Fredholm, B. B., Morelli, M., Popoli, P., Fuxe, K. (1997) Adenosine-dopamine receptor-receptor interactions as an integrative mechanism in the basal ganglia. *Trends Neurosci.*, **20**, 482-487.
- Ferré, S., Fuxe, K., von Euler, G., Johansson, B., Fredholm, B. B. (1992) Adenosine-dopamine interactions in the brain. *Neuroscience*, **51**, 501-512.
- Ferré, S., von Euler, G., Johansson, B., Fredholm, B. B., Fuxe, K. (1991) Stimulation of high-affinity adenosine A2 receptors decreases the affinity of dopamine D2 receptors in rat striatal membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **88**, 7238-7241.
- Fienberg, A. A., Hiroi, N., Mermelstein, P. G., Song, W., Snyder, G. L., Nishi, A., Cheramy, A., O'Callaghan, J. P., Miller, D. B., Cole, D. G., Corbett, R., Haile, C. N., Cooper, D. C., Onn, S. P., Grace, A. A., Ouimet, C. C., White, F. J., Hyman, S. E., Surmeier, D. J., Girault, J., Nestler, E. J., Greengard, P. (1998) DARPP-32: regulator of the efficacy of dopaminergic neurotransmission. *Science*, **281**, 838-842.
- File, S. E., Cheeta, S., Irvine, E. E., Tucci, S., Akthar, M. (2002) Conditioned anxiety to nicotine. *Psychopharmacology*, **164**, 309-317.
- Fink, J. S., Weaver, D. R., Rivkees, S. A., Peterfreund, R. A., Pollack, A. E., Adler, E. M., Reppert, S. M. (1992) Molecular cloning of the rat A2 adenosine receptor: selective co-expression with D2 dopamine receptors in rat striatum. *Brain Res. Mol. Brain Res.*, **14**, 186-195.

- Fourgeaud, L., Mato, S., Bouchet, D., Hemar, A., Worley, P. F., Manzoni, O. J. (2004) A single in vivo exposure to cocaine abolishes endocannabinoid-mediated long-term depression in the nucleus accumbens. *J. Neurosci.*, **24**, 6939-6945.
- Fowler, C. J. (2005) Pharmacological properties and therapeutic possibilities for drugs acting upon endocannabinoid receptors. *Curr. Drug Targets. CNS Neurol. Disord.*, **4**, 685-696.
- Franco, R., Ferré, S., Agnati, L., Torvinen, M., Gines, S., Hillion, J., Casado, V., Lledo, P., Zoli, M., Lluís, C., Fuxe, K. (2000) Evidence for adenosine/ dopamine receptor interactions: indications for heteromerization. *Neuropsychopharmacology*. **23**, S50-S59.
- Fredholm, B. B., Chen, J. F., Cunha, R. A., Svenningsson, P., Vaugeois, J. M. (2005) Adenosine and brain function. *Int. Rev. Neurobiol.*, **63**, 191-270.
- Fredholm, B. B., IJzerman, A. P., Jacobson, K. A., Klotz, K. N., Linden, J. (2001) International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacol. Rev.*, **53**, 527-552.
- Fredholm, B. B., Abbracchio, M. P., Burnstock, G., Daly, J. W., Harden, T. K., Jacobson, K. A., Leff, P., Williams, M. (1994) Nomenclature and classification of purinoceptors. *Pharmacol. Rev.*, **46**, 143-156.
- Freedland, C. S., Sharpe, A. L., Samson, H. H., Porrino, L. J. (2001) Effects of SR141716A on ethanol and sucrose self-administration. *Alcohol Clin. Exp. Res.*, **25**, 277-282.
- Freund, T. F., Katona, I., Piomelli, D. (2003) Role of endogenous cannabinoids in synaptic signaling. *Physiol Rev.*, **83**, 1017-1066.
- Fride, E., Ginzburg, Y., Breuer, A., Bisogno, T., Di, M., V, Mechoulam, R. (2001) Critical role of the endogenous cannabinoid system in mouse pup suckling and growth. *Eur. J. Pharmacol.*, **419**, 207-214.
- Fuchs, R. A., Evans, K. A., Ledford, C. C., Parker, M. P., Case, J. M., Mehta, R. H., See, R. E. (2005) The role of the dorsomedial prefrontal cortex, basolateral amygdala, and dorsal hippocampus in contextual reinstatement of cocaine seeking in rats. *Neuropsychopharmacology*, **30**, 296-309.
- Fukuda, K., Kato, S., Morikawa, H., Shoda, T., Mori, K. (1996) Functional coupling of the delta-, mu-, and kappa-opioid receptors to mitogen-activated protein kinase and arachidonate release in Chinese hamster ovary cells. *J. Neurochem.*, **67**, 1309-1316.
- Fuxe, K., Agnati, L. F., Jacobsen, K., Hillion, J., Canals, M., Torvinen, M., Tinner-Staines, B., Staines, W., Rosin, D., Terasmaa, A., Popoli, P., Leo, G., Vergoni, V., Lluís, C., Ciruela, F., Franco, R., Ferré, S. (2003) Receptor heteromerization in adenosine A2A receptor signaling: relevance for striatal function and Parkinson's disease. *Neurology*, **61**, S19-S23.
- Fuxe, K., Ungerstedt, U. (1974) Action of caffeine and theophyllamine on supersensitive dopamine receptors: considerable enhancement of receptor response to treatment with DOPA and dopamine receptor agonists. *Med. Biol.* **52**, 48-54.

- Gal, K., Gyertyan, I. (2006) Dopamine D3 as well as D2 receptor ligands attenuate the cue-induced cocaine-seeking in a relapse model in rats. *Drug Alcohol Depend.* **81**, 63-70.
- Galiegue, S., Mary, S., Marchand, J., Dussossoy, D., Carriere, D., Carayon, P., Bouaboula, M., Shire, D., Le Fur, G., Casellas, P. (1995) Expression of central and peripheral cannabinoid receptors in human immune tissues and leukocyte subpopulations. *Eur. J. Biochem.*, **232**, 54-61.
- Gallate, J. E., McGregor, I. S. (1999) The motivation for beer in rats: effects of ritanserin, naloxone and SR 141716. *Psychopharmacology*, **142**, 302-308.
- Gallate, J. E., Saharov, T., Mallet, P. E., McGregor, I. S. (1999) Increased motivation for beer in rats following administration of a cannabinoid CB1 receptor agonist. *Eur. J. Pharmacol.*, **370**, 233-240.
- Gallistel, C. R. (1986) The role of the dopaminergic projections in MFB self-stimulation. *Behav., Brain Res.* **20**, 313-321.
- Gardner, E. L. (2005) Endocannabinoid signaling system and brain reward: emphasis on dopamine. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **81**, 263-284.
- Gardner, E. L. (2002) Addictive potential of cannabinoids: the underlying neurobiology. *Chem. Phys. Lipids*, **121**, 267-290.
- Gardner, E. L., Vorel, S. R. (1998) Cannabinoid transmission and reward-related events. *Neurobiol. Dis.* **5**, 502-533.
- Gasior, M., Jaszyna, M., Peters, J., Goldberg, S. R. (2000) Changes in the ambulatory activity and discriminative stimulus effects of psychostimulant drugs in rats chronically exposed to caffeine: effect of caffeine dose. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **295**, 1101-1111.
- Gatch, M. B., Selvig, M. (2002) Theophylline blocks ethanol withdrawal-induced hyperalgesia. *Alcohol Alcohol*, **37**, 313-317.
- Gawin, F.H., Elinwood, E.H. (1988) Cocaine and other stimulants. *N. Eng. J. Med.*, **318**, 1173- 1182.
- Gellert, V. F., Holtzman, S. G. (1978) Development and maintenance of morphine tolerance and dependence in the rat by scheduled access to morphine drinking solutions. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **205**, 536-546.
- Gerdeman, G. L., Partridge, J. G., Lupica, C. R., Lovinger, D. M. (2003) It could be habit forming: drugs of abuse and striatal synaptic plasticity. *Trends Neurosci.*, **26**, 184-192.
- Gerfen, C. R. (1992) The neostriatal mosaic: multiple levels of compartmental organization. *J. Neural Transm. Suppl*, **36**, 43-59.
- Ghozland, S., Matthes, H. W., Smonin, F., Filliol, D., Kieffer, B. L., Maldonado, R. (2002) Motivational effects of cannabinoids are mediated by mu-opioid and kappa-opioid receptors. *J Neurosci.*, **22**, 1146-1154.

- Giros, B., Jaber, M., Jones, S. R., Wightman, R. M., Caron, M. G. (1996) Hyperlocomotion and indifference to cocaine and amphetamine in mice lacking the dopamine transporter. *Nature*, **379**, 606-612.
- Giuffrida, A., Piomelli, D. (2000) The endocannabinoid system: a physiological perspective on its role in psychomotor control. *Chem. Phys. Lipids*, **108**, 151-158.
- Giuffrida, A., Parsons, L. H., Kerr, T. M., Rodríguez de Fonseca, F., Navarro, M., Piomelli, D. (1999) Dopamine activation of endogenous cannabinoid signaling in dorsal striatum. *Nat. Neurosci.*, **2**, 358-363.
- Glantz, M. D., Weinberg, N. Z., Miner, L. L., Colliver, J. D. (1999). The Etiology of Drug Abuse: Mapping the Paths. In M. D. Glantz, C. R. Hartell, (Eds.). *Drug Abuse: Origins and Interventions* (pp. 3-46). American Psychological Association. Washington, D. C.
- Glantz, M. D., and Pickens, R. W. (1992) Vulnerability to Drug Abuse. American Psychological Association Press, Washington, D. C.
- Glass, M., Felder, C. C. (1997) Concurrent stimulation of cannabinoid CB1 and dopamine D2 receptors augments cAMP accumulation in striatal neurons: evidence for a Gs linkage to the CB1 receptor. *J. Neurosci.*, **17**, 5327-5333.
- Goeders, N. E. (2002) Stress and cocaine addiction. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **301**, 785-789.
- Goeders, N. E., Guerin, G. F. (1994) Non-contingent electric footshock facilitates the acquisition of intravenous cocaine self-administration in rats. *Psychopharmacology*, **114**, 63-70.
- Goldman, M. S., Rather, B. C. (1993) Substance use disorders: Cognitive models and architecture. In: Dobson, K. S., and Kendall, P. C., eds. *Psychopathology and Cognition*. (pp. 245-292), Academic Press. San Diego, CA.
- Goldstein, R. Z., Volkow, N. D. (2002) Drug addiction and its underlying neurobiological basis: neuroimaging evidence for the involvement of the frontal cortex. *Am. J. Psychiatry*, **159**, 1642-1652.
- Goncalves, M. L., Cunha, R. A., Ribeiro, J. A. (1997) Adenosine A2A receptors facilitate 45Ca^{2+} uptake through class A calcium channels in rat hippocampal CA3 but not CA1 synaptosomes. *Neurosci. Lett.*, **238**, 73-77.
- Goparaju, S. K., Ueda, N., Yamaguchi, H., Yamamoto, S. (1998) Anandamide amidohydrolase reacting with 2-arachidonoylglycerol, another cannabinoid receptor ligand. *FEBS Lett.*, **422**, 69-73.
- Gubitz, A. K., Widdowson, L., Kurokawa, M., Kirkpatrick, K. A., Richardson, P. J. (1996) Dual signalling by the adenosine A2a receptor involves activation of both N- and P-type calcium channels by different G proteins and protein kinases in the same striatal nerve terminals. *J. Neurochem.*, **67**, 374-381.
- Hack, S. P., Christie, M. J. (2003) Adaptations in adenosine signaling in drug dependence: therapeutic implications. *Crit Rev. Neurobiol.*, **15**, 235-274.

- Haller, J., Bakos, N., Szirmay, M., Ledent, C., Freund, T. F. (2002) The effects of genetic and pharmacological blockade of the CB1 cannabinoid receptor on anxiety. *Eur. J. Neurosci.*, **16**, 1395-1398.
- Hampson, R. E., Deadwyler, S. A. (1998) Role of cannabinoid receptors in memory storage. *Neurobiol. Dis.*, **5**, 474-482.
- Hanus, L., Abu-Lafi, S., Fride, E., Breuer, A., Vogel, Z., Shalev, D. E., Kustanovich, I., Mechoulam, R. (2001) 2-arachidonyl glyceryl ether, an endogenous agonist of the cannabinoid CB1 receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **98**, 3662-3665.
- Harrison, J. M., Allen, R. G., Pellegrino, M. J., Williams, J. T., Manzoni, O. J. (2002) Chronic morphine treatment alters endogenous opioid control of hippocampal mossy fiber synaptic transmission. *J. Neurophysiol.*, **87**, 2464-2470.
- Heinrichs, S. C., Menzaghi, F., Schulteis, G., Koob, G. F., Stinus, L. (1995) Suppression of corticotropin-releasing factor in the amygdala attenuates aversive consequences of morphine withdrawal. *Behav. Pharmacol.*, **6**, 74-80.
- Heinz, A., Schafer, M., Higley, J. D., Krystal, J. H., Goldman, D. (2003) Neurobiological correlates of the disposition and maintenance of alcoholism. *Pharmacopsychiatry*, **36** Suppl 3:S255-S258.
- Hemby, S. E., Co, C., Koves, T. R., Smith, J. E., Dworkin, S. I. (1997) Differences in extracellular dopamine concentrations in the nucleus accumbens during response-dependent and response-independent cocaine administration in the rat. *Psychopharmacology*, **133**, 7-16.
- Herkenham, M., Lynn, A. B., Johnson, M. R., Melvin, L. S., de Costa, B. R., Rice, K. C. (1991) Characterization and localization of cannabinoid receptors in rat brain: a quantitative in vitro autoradiographic study. *J Neurosci.*, **11**, 563-583.
- Hermann, H., Marsicano, G., Lutz, B. (2002) Coexpression of the cannabinoid receptor type 1 with dopamine and serotonin receptors in distinct neuronal subpopulations of the adult mouse forebrain. *Neuroscience*, **109**, 451-460.
- Hettinger, B. D., Lee, A., Linden, J., Rosin, D. L. (2001) Ultrastructural localization of adenosine A2A receptors suggests multiple cellular sites for modulation of GABAergic neurons in rat striatum. *J. Comp Neurol.*, **431**, 331-346.
- Heyser, C. J., Fienberg, A. A., Greengard, P., Gold, L. H. (2000) DARPP-32 knockout mice exhibit impaired reversal learning in a discriminated operant task. *Brain Res.*, **867**, 122-130.
- Hillion, J., Canals, M., Torvinen, M., Casado, V., Scott, R., Terasmaa, A., Hansson, A., Watson, S., Olah, M. E., Mallol, J., Canela, E. I., Zoli, M., Agnati, L. F., Ibanez, C. F., Lluís, C., Franco, R., Ferré, S., Fuxe, K. (2002) Coaggregation, cointernalization, and codesensitization of adenosine A2A receptors and dopamine D2 receptors. *J Biol. Chem.*, **277**, 18091-18097.
- Hine, B., Torrelío, M., Gershon, S. (1975) Differential effect of cannabiniol and cannabidiol on THC-induced responses during abstinence in morphine-dependent rats. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.*, **12**, 185-188.

- Hiroi, N., Fienberg, A. A., Haile, C. N., Alburges, M., Hanson, G. R., Greengard, P., Nestler, E. J. (1999) Neuronal and behavioural abnormalities in striatal function in DARPP-32-mutant mice. *Eur. J. Neurosci.*, **11**, 1114-1118.
- Hoffman, A. F., Riegel, A. C., Lupica, C. R. (2003) Functional localization of cannabinoid receptors and endogenous cannabinoid production in distinct neuron populations of the hippocampus. *Eur. J. Neurosci.*, **18**, 524-534.
- Hoffman, A. F., Lupica, C. R. (2001) Direct actions of cannabinoids on synaptic transmission in the nucleus accumbens: a comparison with opioids. *J. Neurophysiol.*, **85**, 72-83.
- Hollerman, J. R., Schultz, W. (1998) Dopamine neurons report an error in the temporal prediction of reward during learning. *Nat. Neurosci.*, **1**, 304-309.
- Houchi, H., Babovic, D., Pierrefiche, O., Ledent, C., Daoust, M., Naassila, M. (2005) CB1 receptor knockout mice display reduced ethanol-induced conditioned place preference and increased striatal dopamine D2 receptors. *Neuropsychopharmacology*, **30**, 339-349.
- Howlett, A. C., Breivogel, C. S., Childers, S. R., Deadwyler, S. A., Hampson, R. E., Porrino, L. J. (2004) Cannabinoid physiology and pharmacology: 30 years of progress. *Neuropharmacology*, **47 Suppl 1**, 345-358.
- Howlett, A. C. (2002) The cannabinoid receptors. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.*, **68-69**, 619-631.
- Howlett, A. C. (1998) The CB1 cannabinoid receptor in the brain. *Neurobiol. Dis.*, **5**, 405-416.
- Howlett, A. C., Bidaut-Russell, M., Devane, W. A., Melvin, L. S., Johnson, M. R., Herkenham, M. (1990) The cannabinoid receptor: biochemical, anatomical and behavioral characterization. *Trends. Neurosci.*, **13**: 420-423.
- Huang, S. M., Bisogno, T., Trevisani, M., Al-Hayani, A., De Petrocellis, L., Fezza, F. y cols. (2002) An endogenous capsaicin-like substance with high potency at recombinant and native vanilloid vr1 receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**: 8400-8405.
- Huang, Y. C., Wang, S. J., Chiou, L. C., Gean, P. W. (2003) Mediation of amphetamine-induced long-term depression of synaptic transmission by CB1 cannabinoid receptors in the rat amygdala. *J. Neurosci.*, **23**, 10311-10320.
- Hungund, B. L., Szakall, I., Adam, A., Basavarajappa, B. S., Vadasz, C. (2003) Cannabinoid CB1 receptor knockout mice exhibit markedly reduced voluntary alcohol consumption and lack alcohol-induced dopamine release in the nucleus accumbens. *J. Neurochem.*, **84**, 698-704.
- Hungund, B. L., Basavarajappa, B. S., Vadasz, C., Kunos, G., Rodriguez, d. F., Colombo, G., Serra, S., Parsons, L., Koob, G. F. (2002) Ethanol, endocannabinoids, and the cannabinoidergic signaling system. *Alcohol Clin. Exp. Res.*, **26**, 565-574.
- Hutcheson, D. M., Tzavara, E. T., Smadja, C., Valjent, E., Roques, B. P., Hanoune, J., Maldonado, R. (1998) Behavioural and biochemical evidence for signs of abstinence in mice chronically treated with delta-9-tetrahydrocannabinol. *Br. J Pharmacol.*, **125**, 1567-1577.

- Hyman, S. E. (2005) Addiction: a disease of learning and memory. *Am.J.Psychiatry*, **162**, 1414-1422.
- Ingram, S. L., Vaughan, C. W., Bagley, E. E., Connor, M., Christie, M. J. (1998) Enhanced opioid efficacy in opioid dependence is caused by an altered signal transduction pathway. *J. Neurosci.*, **18**, 10269-10276.
- Ise, Y., Narita, M., Nagase, H., Suzuki, T. (2002) Modulation of kappa-opioidergic systems on mecamylamine-precipitated nicotine-withdrawal aversion in rats. *Neurosci. Lett.*, **323**, 164-166.
- Iversen, L. L. (1996) How does morphine work? *Nature*, **383**, 759-760.
- Jackson, D. M., Westlind-Danielsson, A. (1994) Dopamine receptors: molecular biology, biochemistry and behavioural aspects. *Pharmacol. Ther.*, **64**, 291-370.
- Jarrahian, A., Watts, V. J., Barker, E. L. (2004) D2 dopamine receptors modulate G α -subunit coupling of the CB1 cannabinoid receptor. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **308**, 880-886.
- Jin, W., Lee, N. M., Loh, H. H., Thayer, S. A. (1994) Opioids mobilize calcium from inositol 1, 4, 5-trisphosphate-sensitive stores in NG108-15 cells. *J. Neurosci.*, **14**, 1920-1929.
- Jolas, T., Nestler, E. J., Aghajanian, G. K. (2000) Chronic morphine increases GABA tone on serotonergic neurons of the dorsal raphe nucleus: association with an up-regulation of the cyclic AMP pathway. *Neuroscience*, **95**, 433-443.
- Jones, S. R., Gainetdinov, R. R., Wightman, R. M., Caron, M. G. (1998) Mechanisms of amphetamine action revealed in mice lacking the dopamine transporter. *J. Neurosci.*, **18**, 1979-1986.
- Juan-Pico, P., Fuentes, E., Javier Bermudez-Silva, F., Javier Díaz-Molina, F., Ripoll, C., Rodriguez de Fonseca, F., Nadal, A. (2006) Cannabinoid receptors regulate Ca²⁺ signals and insulin secretion in pancreatic beta-cell. *Cell Calcium*, **39**, 155-162.
- Justinova, Z., Solinas, M., Tanda, G., Redhi, G. H., Goldberg, S. R. (2005) The endogenous cannabinoid anandamide and its synthetic analog R(+)-methanandamide are intravenously self-administered by squirrel monkeys. *J. Neurosci.*, **25**, 5645-5650.
- Justinova, Z., Tanda, G., Munzar, P., Goldberg, S. R. (2004) The opioid antagonist naltrexone reduces the reinforcing effects of Delta 9 tetrahydrocannabinol (THC) in squirrel monkeys. *Psychopharmacology*, **173**, 186-194.
- Justinova, Z., Ferré, S., Segal, P. N., Antoniou, K., Solinas, M., Pappas, L. A., Highkin, J. L., Hockemeyer, J., Munzar, P., Goldberg, S. R. (2003) Involvement of adenosine A1 and A2A receptors in the adenosinergic modulation of the discriminative-stimulus effects of cocaine and methamphetamine in rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **307**, 977-986.
- Kalivas, P. W., Volkow, N. D. (2005) The neural basis of addiction: a pathology of motivation and choice. *Am.J.Psychiatry*, **162**, 1403-1413.
- Kalivas, P. W., McFarland, K. (2003) Brain circuitry and the reinstatement of cocaine-seeking behavior. *Psychopharmacology*, **168**, 44-56.

- Kanarek, R. B., Marks-Kaufman, R. (1988) Animal models of appetitive behavior: interaction of nutritional factors and drug seeking behavior. *Curr. Concepts. Nutr.*, **16**,1-25.
- Kaplan, M. P., Abel, T. (2003) Genetic approaches to the study of synaptic plasticity and memory storage. *CNS. Spectr.*, **8**, 597-610.
- Kaplan, G. B., Coyle, T. S. (1998) Adenosine kinase inhibitors attenuate opiate withdrawal via adenosine receptor activation. *Eur J Pharmacol.*, **362**, 1-8.
- Kaplan, G. B., Sears, M. T. (1996) Adenosine receptor agonists attenuate and adenosine receptor antagonists exacerbate opiate withdrawal signs. *Psychopharmacology*, **123**, 64-70.
- Karch SB (1999) Cocaine: history, use, abuse. *J. R. Soc. Med.*, **92**, 393-397.
- Katner, S. N., Davis, S. A., Kirsten, A. J., Taffe, M. A. (2004) Effects of nicotine and mecamylamine on cognition in rhesus monkeys. *Psychopharmacology*, **175**, 225-240.
- Katz, R. J., Gormezano, G. (1979) A rapid and inexpensive technique for assessing the reinforcing effects of opiate drugs. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **11**, 231-233.
- Kaymakcalan, S., Ayhan, I. H., Tulunay, F. C. (1977) Naloxone-induced or postwithdrawal abstinence signs in delta9-tetrahydrocannabinol-tolerant rats. *Psychopharmacology*, **55**, 243-249.
- Kenny, P. J., Paterson, N. E., Boutrel, B., Semenova, S., Harrison, A. A., Gasparini, F., Koob, G. F., Skoubis, P. D., Markou, A. (2003) Metabotropic glutamate 5 receptor antagonist MPEP decreased nicotine and cocaine self-administration but not nicotine and cocaine-induced facilitation of brain reward function in rats. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **1003**, 415-418.
- Kenny, P. J., Markou, A. (2001) Neurobiology of the nicotine withdrawal syndrome. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **70**, 531-549.
- Khalili, M., Semnanian, S., Fathollahi, Y. (2001) Caffeine increases paraventricular neuronal firing rate and induces withdrawal signs in morphine-dependent rats. *Eur. J. Pharmacol.*, **412**, 239-245.
- Khan, Z. U., Gutierrez, A., Martin, R., Penafiel, A., Rivera, A., de la, C. A. (2000) Dopamine D5 receptors of rat and human brain. *Neuroscience*, **100**, 689-699.
- Khanna, J. M., Mayer, J. M. (1982) An analysis of cross-tolerance among ethanol, other general depressants and opioids. *Subst. Alcohol Actions Misuse*, **3**, 243-257.
- Khantzian, E. J. (1985) The self-medication hypothesis of addictive disorders: focus on heroin and cocaine dependence. *Am. J. Psychiatry*, **142**, 1259-1264.
- Khroyan, T. V., Barrett-Larimore, R. L., Rowlett, J. K., Spealman, R. D. (2000) Dopamine D1- and D2-like receptor mechanisms in relapse to cocaine-seeking behavior: effects of selective antagonists and agonists. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **294**: 680-687.
- Kienast T, Heinz A (2006) Dopamine and the diseased brain. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 5: 109-131.

- Kirkham, T. C., Williams, C. M. (2001) Synergistic effects of opioid and cannabinoid antagonists on food intake. *Psychopharmacology*, **153**, 267-270.
- Kittner, H., Krugel, U., Hoffmann, E., Illes, P. (2004) Modulation of feeding behaviour by blocking purinergic receptors in the rat nucleus accumbens: a combined microdialysis, electroencephalographic and behavioural study. *Eur J Neurosci.*, **19**, 396-404.
- Klein, T. W., Newton, C., Friedman, H. (1998) Cannabinoid receptors and the cytokine network. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **437**, 215-222.
- Klinger, M., Freissmuth, M., Nanoff, C. (2002) Adenosine receptors: G protein-mediated signalling and the role of accessory proteins. *Cell Signal.*, **14**, 99-108.
- Knapp, C. M., Foye, M. M., Cottam, N., Ciraulo, D. A., Kornetsky, C. (2001) Adenosine agonists CGS 21680 and NECA inhibit the initiation of cocaine self-administration. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **68**, 797-803.
- Koch, J. E., Matthews, S. M. (2001) Delta9-tetrahydrocannabinol stimulates palatable food intake in Lewis rats: effects of peripheral and central administration. *Nutr. Neurosci.*, **4**, 179-187.
- Koob, G. F., Le Moal, M. (2005) Neurobiology of addiction. Academic Press Hardbound, San Diego, CA
- Koob, G. F., Ahmed, S. H., Boutrel, B., Chen, S. A., Kenny, P. J., Markou, A., O'Dell, L. E., Parsons, L. H., Sanna, P. P. (2004) Neurobiological mechanisms in the transition from drug use to drug dependence. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, **27**, 739-749.
- Koob, G. F., Le Moal, M. (2001) Drug addiction, dysregulation of reward, and allostasis. *Neuropsychopharmacology.*, **24**, 97-129.
- Koob, G. F. (1999a) Stress, corticotropin-releasing factor, and drug addiction. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **897**, 27-45.
- Koob, G. F. (1999b) The role of the striatopallidal and extended amygdala systems in drug addiction. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **877**, 445-4B60.
- Koob, G. F., Le Moal, M. (1997) Drug abuse: hedonic homeostatic dysregulation. *Science*, **278**, 52-58.
- Koob, G. F., Nestler, E. J. (1997) The neurobiology of drug addiction. *J. Neuropsychiatry Clin. Neurosci.*, **9**, 482-497.
- Koob, G. F. (1996) Hedonic valence, dopamine and motivation. *Mol. Psychiatry*, **1**, 186-189.
- Koob, G. F. (1992) Neural mechanisms of drug reinforcement. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **654**, 171-191.
- Koob, G. F., Sinus, L., Le Moal, M., Bloom, F. E. (1989) Opponent process theory of motivation: neurobiological evidence from studies of opiate dependence. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, **13**, 135-140.

- Koob, G. F., Bloom, F. E. (1988) Cellular and molecular mechanisms of drug dependence. *Science*, **242**, 715-723.
- Koob, G. F., Vaccarino, F. J., Amalric, M., Bloom, F. E. (1986) Neurochemical substrates for opiate reinforcement. *NIDA Res. Monogr.*, **71**, 146-164.
- Kornetsky, C., Bain, G. (1992) Brain-stimulation reward: a model for the study of the rewarding effects of abused drugs. *NIDA Res. Monogr.*, **124**, 73-93.
- Kornetsky, C., Esposito, R. U. (1979) Euphorogenic drugs: effects on the reward pathways of the brain. *Fed. Proc.*, **38**, 2473-2476.
- Kreek, M. J., LaForge, K. S., Butelman, E. (2002) Pharmacotherapy of addictions. *Nat. Rev. Drug Discov.*, **1**, 710-726.
- Kudlacek, O., Just, H., Korkhov, V. M., Vartian, N., Klinger, M., Pankevych, H., Yang, Q., Nanoff, C., Freissmuth, M., Boehm, S. (2003) The human D2 dopamine receptor synergizes with the A2A adenosine receptor to stimulate adenylyl cyclase in PC12 cells. *Neuropsychopharmacology*, **28**, 1317-1327.
- Kull, B., Svenningsson, P., Fredholm, B. B. (2000) Adenosine A(2A) receptors are colocalized with and activate g(olf) in rat striatum. *Mol. Pharmacol.*, **58**, 771-777.
- Kull, B., Ferré, S., Arslan, G., Svenningsson, P., Fuxe, K., Owman, C., Fredholm, B. B. (1999) Reciprocal interactions between adenosine A2A and dopamine D2 receptors in Chinese hamster ovary cells co-transfected with the two receptors. *Biochem. Pharmacol.*, **58**, 1035-1045.
- Kunos, G., Jarai, Z., Batkai, S., Goparaju, S. K., Ishac, E. J., Liu, J., Wang, L., Wagner, J. A. (2000) Endocannabinoids as cardiovascular modulators. *Chem. Phys. Lipids*, **108**, 159-168.
- Kuzmin, A., Johansson, B. (2000) Reinforcing and neurochemical effects of cocaine: differences among C57, DBA, and 129 mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **65**, 399-406.
- Kuzmin, A., Johansson, B., Zvartau, E. E., Fredholm, B. B. (1999) Caffeine, acting on adenosine A(1) receptors, prevents the extinction of cocaine-seeking behavior in mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **290**, 535-542.
- Laakso, A., Mohn, A. R., Gainetdinov, R. R., Caron, M. G. (2002) Experimental genetic approaches to addiction. *Neuron*, **36**, 213-228.
- Latini, S., Pedata, F. (2001) Adenosine in the central nervous system: release mechanisms and extracellular concentrations. *J. Neurochem.*, **79**, 463-484.
- Laviolette, S. R., Van Der Kooy, D. (2004) The neurobiology of nicotine addiction: bridging the gap from molecules to behaviour. *Nat. Rev. Neurosci.*, **5**, 55-65.
- Le Foll, B., Goldberg, S. R. (2005) Cannabinoid CB1 receptor antagonists as promising new medications for drug dependence. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **312**, 875-883.
- Le Foll, B., Goldberg, S. R. (2004) Rimonabant, a CB1 antagonist, blocks nicotine-conditioned place preferences. *Neuroreport*, **15**, 2139-2143.

- Le Foll, B., Frances, H., Díaz, J., Schwartz, J. C., Sokoloff, P. (2002) Role of the dopamine D3 receptor in reactivity to cocaine-associated cues in mice. *Eur. J. Neurosci.*, **15**, 2016-2026.
- Le Novere, N., Changeux, J. P. (1999) The Ligand Gated Ion Channel Database. *Nucleic Acids Res.*, **27**, 340-342.
- Ledent, C., Valverde, O., Cossu, G., Petitet, F., Aubert, J. F., Beslot, F., Bohme, G. A., Imperato, A., Pedrazzini, T., Roques, B. P., Vassart, G., Fratta, W., Parmentier, M. (1999) Unresponsiveness to cannabinoids and reduced addictive effects of opiates in CB1 receptor knockout mice. *Science*, **283**, 401-404.
- Ledent, C., Vaugeois, J. M., Schiffmann, S. N., Pedrazzini, T., El Yacoubi, M., Vanderhaeghen, J. J., Costentin, J., Heath, J. K., Vassart, G., Parmentier, M. (1997) Aggressiveness, hypoalgesia and high blood pressure in mice lacking the adenosine A2a receptor. *Nature*, **388**, 674-678.
- Leshner, A. I., Koob, G. F. (1999) Drugs of abuse and the brain. *Proc. Assoc. Am. Physicians*, **111**, 99-108.
- Libert, F., Schiffmann, S. N., Lefort, A., Parmentier, M., Gerard, C., Dumont, J. E., Vanderhaeghen, J. J., Vassart, G. (1991) The orphan receptor cDNA RDC7 encodes an A1 adenosine receptor. *EMBO J.*, **10**, 1677-1682.
- Lichtman, A. H., Sheikh, S. M., Loh, H. H., Martin, B. R. (2001) Opioid and cannabinoid modulation of precipitated withdrawal in delta(9)-tetrahydrocannabinol and morphine-dependent mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **298**, 1007-1014.
- Lichtman, A. H. (2000) SR 141716A enhances spatial memory as assessed in a radial-arm maze task in rats. *Eur. J. Pharmacol.*, **404**, 175-179.
- Lichtman, A. H., Martin, B. R. (1991) Spinal and supraspinal components of cannabinoid-induced antinociception. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **258**, 517-523.
- Lindsay, G. B., Rainey, J. (1997) Psychosocial and pharmacologic explanations of nicotine's "gateway drug" function. *J. Sch Health*, **67**, 123-126.
- Lindskog, M., Svenningsson, P., Pozzi, L., Kim, Y., Fienberg, A. A., Bibb, J. A., Fredholm, B. B., Nairn, A. C., Greengard, P., Fisone, G. (2002) Involvement of DARPP-32 phosphorylation in the stimulant action of caffeine. *Nature*, **418**, 774-778.
- Lindskog, M., Svenningsson, P., Fredholm, B. B., Greengard, P., Fisone, G. (1999) Activation of dopamine D2 receptors decreases DARPP-32 phosphorylation in striatonigral and striatopallidal projection neurons via different mechanisms. *Neuroscience*, **88**, 1005-1008.
- Liu, X., Weiss, F. (2002) Reversal of ethanol-seeking behavior by D1 and D2 antagonists in an animal model of relapse: differences in antagonist potency in previously ethanol-dependent versus nondependent rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **300**, 882-889.
- Ludwig, A. M., Wikler, A. (1974) "Craving" and relapse to drink. *Q. J. Stud. Alcohol*, **35**, 108-130.
- Lupica, C. R., Riegel, A. C., Hoffman, A. F. (2004) Marijuana and cannabinoid regulation of brain reward circuits. *Br. J. Pharmacol.*, **143**, 227-234.

- Macey, D. J., Schulteis, G., Heinrichs, S. C., Koob, G. F. (1996) Time-dependent quantifiable withdrawal from ethanol in the rat: effect of method of dependence induction. *Alcohol*, **13**, 163-170.
- Machado-Vieira, R., Lara, D. R., Souza, D. O., Kapczinski, F. (2002) Purinergic dysfunction in mania: an integrative model. *Med. Hypotheses*, **58**, 297-304.
- Mackintosh, N. J. (1983) Classical and instrumental conditioning (pg 24) in: *Conditioning and associative learning*. Oxford University Press, New York.
- Madras, B. K., Elmaleh, D. R., Meltzer, P. C., Liang, A. Y., Brownell, G. L., Brownell, A. L. (1994) Positron emission tomography of cocaine binding sites on the dopamine transporter. *NIDA Res. Monogr.*, **138**, 57-69.
- Madras, B. K., Fahey, M. A., Bergman, J., Canfield, D. R., Spealman, R. D. (1989) Effects of cocaine and related drugs in nonhuman primates. I. [3H] cocaine binding sites in caudate-putamen. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **251**, 131-141.
- Maenhaut, C., Van Sande, J., Libert, F., Abramowicz, M., Parmentier, M., Vanderhaegen, J. J., Dumont, J. E., Vassart, G., Schiffmann, S. (1990) RDC8 codes for an adenosine A2 receptor with physiological constitutive activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **173**, 1169-1178.
- Mailleux, P., Vanderhaeghen, J. J. (1992) Localization of cannabinoid receptor in the human developing and adult basal ganglia. Higher levels in the striatonigral neurons. *Neurosci. Lett.*, **148**, 173-176.
- Maldonado, R., Valverde, O., Berrendero, F. (2006) Involvement of the endocannabinoid system in drug addiction. *Trends Neurosci.*, **29**, 225-232.
- Maldonado, R. (2003) The neurobiology of addiction. *J. Neural Transm. Suppl.*, 1-14.
- Maldonado, R., Valverde, O. (2003) Participation of the opioid system in cannabinoid-induced antinociception and emotional-like responses. *Eur. Neuropsychopharmacol.*, **13**, 401-10.
- Maldonado, R. (2002) Study of cannabinoid dependence in animals. *Pharmacol. Ther.*, **95**, 153-164.
- Maldonado, R., Rodríguez de Fonseca (2002) Cannabinoid addiction: behavioral models and neural correlates. *J Neurosci.*, **22**, 3326-3331.
- Maldonado, R. (1997) Participation of noradrenergic pathways in the expression of opiate withdrawal: biochemical and pharmacological evidence. *Neurosci.Biobehav.Rev.*, **21**, 91-104.
- Maldonado, R., Saiardi, A., Valverde, O., Samad, T. A., Roques, B. P., Borrelli, E. (1997) Absence of opiate rewarding effects in mice lacking dopamine D2 receptors. *Nature*, **388**, 586-589.
- Maldonado, R., Blendy, J. A., Tzavara, E., Gass, P., Roques, B. P., Hanoune, J., Schutz, G. (1996) Reduction of morphine abstinence in mice with a mutation in the gene encoding CREB. *Science*, **273**, 657-659

- Maldonado, R., Valverde, O., Garbay, C., Roques, B. P. (1995) Protein kinases in the locus coeruleus and periaqueductal gray matter are involved in the expression of opiate withdrawal. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.*, **352**, 565-575.
- Maldonado, R., Koob, G. F. (1993) Destruction of the locus coeruleus decreases physical signs of opiate withdrawal. *Brain Res.*, **605**, 128-138.
- Maldonado, R., Negus, S., Koob, G. F. (1992) Precipitation of morphine withdrawal syndrome in rats by administration of mu-, delta- and kappa-selective opioid antagonists. *Neuropharmacology*, **31**, 1231-1241.
- Malin, D. H. (2001) Nicotine dependence: studies with a laboratory model. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **70**, 551-559.
- Malin, D. H., Lake, J. R., Newlin-Maultsby, P., Roberts, L. K., Lanier, J. G., Carter, V. A., Cunningham, J. S., Wilson, O. B. (1992) Rodent model of nicotine abstinence syndrome. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **43**, 779-784.
- Mansour, A., Fox, C. A., Akil, H., Watson, S. J. (1995) Opioid-receptor mRNA expression in the rat CNS: anatomical and functional implications. *Trends Neurosci.*, **18**, 22-29.
- Mansour, A., Khachaturian, H., Lewis, M. E., Akil, H., Watson, S. J. (1988) Anatomy of CNS opioid receptors. *Trends Neurosci.*, **11**, 308-314.
- Manzanares, J., Corchero, J., Romero, J., Fernandez-Ruiz, J. J., Ramos, J. A., Fuentes, J. A. (1999) Pharmacological and biochemical interactions between opioids and cannabinoids. *Trends Pharmacol. Sci.*, **20**, 287-294.
- Manzoni, O. J., Bockaert, J. (2001) Cannabinoids inhibit GABAergic synaptic transmission in mice nucleus accumbens. *Eur. J. Pharmacol.*, **412**, R3-R5.
- Marinelli, M., Piazza, P. V. (2002) Interaction between glucocorticoid hormones, stress and psychostimulant drugs. *Eur. J. Neurosci.*, **16**, 387-394.
- Markou, A., Koob, G. F. (1992) Construct validity of a self-stimulation threshold paradigm: effects of reward and performance manipulations. *Physiol Behav.*, **51**, 111-119.
- Markou, A., Koob, G. F. (1991) Postcocaine anhedonia. An animal model of cocaine withdrawal. *Neuropsychopharmacology*, **4**, 17-26.
- Marlatt, G. A. (1979) A cognitive-behavioral model of the relapse process. *NIDA Res. Monogr*, 191-200.
- Marsicano, G., Wotjak, C. T., Azad, S. C., Bisogno, T., Rammes, G., Cascio, M. G., Hermann, H., Tang, J., Hofmann, C., Zieglgansberger, W., Di, M., V, Lutz, B. (2002) The endogenous cannabinoid system controls extinction of aversive memories. *Nature*, **418**, 530-534.
- Martellotta, M. C., Cossu, G., Fattore, L., Gessa, G. L., Fratta, W. (1998) Self-administration of the cannabinoid receptor agonist WIN 55, 212-2 in drug-naive mice. *Neuroscience*, **85**, 327-330.

- Martin, G., Ahmed, S. H., Blank, T., Spiess, J., Koob, G. F., Siggins, G. R. (1999) Chronic morphine treatment alters NMDA receptor-mediated synaptic transmission in the nucleus accumbens. *J Neurosci.*, **19**, 9081-9089.
- Martín, M., Ledent, C., Parmentier, M., Maldonado, R., Valverde, O. (2000) Cocaine, but not morphine, induces conditioned place preference and sensitization to locomotor responses in CB1 knockout mice. *Eur J Neurosci.*, **12**, 4038-4046.
- Mato, S., Chevaleyre, V., Robbe, D., Pazos, A., Castillo, P. E., Manzoni, O. J. (2004) A single in-vivo exposure to delta 9THC blocks endocannabinoid-mediated synaptic plasticity. *Nat. Neurosci.*, **7**, 585-586.
- Matsuda, L. A., Bonner, T. I., Lolait, S. J. (1993) Localization of cannabinoid receptor mRNA in rat brain. *J. Comp Neurol.*, **327**, 535-550.
- Matsuda, L. A., Lolait, S. J., Brownstein, M. J., Young, A. C., Bonner, T. I. (1990) Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature*, **346**, 561-564.
- Matsuzawa, S., Suzuki, T., Misawa, M., Nagase, H. (1999) Involvement of dopamine D(1) and D(2) receptors in the ethanol-associated place preference in rats exposed to conditioned fear stress. *Brain Res.*, **835**, 298-305.
- Matthes, H. W., Maldonado, R., Simonin, F., Valverde, O., Slowe, S., Kitchen, I., Befort, K., Dierich, A., Le Meur, M., Dolle, P., Tzavara, E., Hanoune, J., Roques, B. P., Kieffer, B. L. (1996) Loss of morphine-induced analgesia, reward effect and withdrawal symptoms in mice lacking the mu-opioid-receptor gene. *Nature*, **383**, 819-823.
- Mattingly, B. A., Hart, T. C., Lim, K., Perkins, C. (1994) Selective antagonism of dopamine D1 and D2 receptors does not block the development of behavioral sensitization to cocaine. *Psychopharmacology*, **114**, 239-242.
- McFarland, K., Davidge, S. B., Lapish, C. C., Kalivas, P. W. (2004) Limbic and motor circuitry underlying footshock-induced reinstatement of cocaine-seeking behavior. *J. Neurosci.*, **24**, 1551-1560.
- McFarland, K., Ettenberg, A. (1997) Reinstatement of drug-seeking behavior produced by heroin-predictive environmental stimuli. *Psychopharmacology*, **131**, 86-92.
- Meador-Woodruff, J. H. (1994) Update on dopamine receptors. *Ann. Clin. Psychiatry*, **6**, 79-90.
- Mechoulam, R., Fride, E., Hanus, L., Sheskin, T., Bisogno, T., Di, M., V, Bayewitch, M., Vogel, Z. (1997) Anandamide may mediate sleep induction. *Nature*, **389**, 25-26.
- Mechoulam, R., Ben Shabat, S., Hanus, L., Ligumsky, M., Kaminski, N. E., Schatz, A. R., Gopher, A., Almog, S., Martin, B. R., Compton, D. R., (1995) Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochem. Pharmacol.*, **50**, 83-90.
- Mechoulam, R., Gaoni, Y. (1965) A total synthesis of DL-delta-1-tetrahydrocannabinol, the active constituent of hashish. *J. Am. Chem. Soc.*, **87**, 3273-3275.
- Melchior, C. L., Tabakoff, B. (1984) A conditioning model of alcohol tolerance. *Recent Dev. Alcohol*, **2**, 5-16.

- Meyer, R. E., Mirin, S. M. (1979). *The heroin stimulus*. Plenum Press, New York.
- Miller, L. L., Branconnier, R. J. (1983) Cannabis: effects on memory and the cholinergic limbic system. *Psychol. Bull.* **93**, 441-456.
- Minkoff, K. (1989) An integrated treatment model for dual diagnosis of psychosis and addiction. *Hosp. Community Psychiatry*, **40**, 1031-1036.
- Missale, C., Nash, S. R., Robinson, S. W., Jaber, M., Caron, M. G. (1998) Dopamine receptors: from structure to function. *Physiol Rev.*, **78**, 189-225.
- Monteggia, L. M., Nestler, E. J. (2003) Opiate addiction: role of the cAMP pathway and CREB. In: Maldonado R (ed) *Molecular biology of drug addiction* (p 37-44). Humana Press Inc, Totowa, NJ.
- Moore, R. J., Vinsant, S. L., Nader, M. A., Porrino, L. J., Friedman, D. P. (1998) Effect of cocaine self-administration on dopamine D2 receptors in rhesus monkeys. *Synapse*, **30**, 88-96.
- Moreau, J. L., Huber, G. (1999) Central adenosine A(2A) receptors: an overview. *Brain Res. Brain Res. Rev.*, **31**, 65-82.
- Munro, S., Thomas, K. L., Abu-Shaar, M. (1993) Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature*, **365**, 61-65.
- Naassila, M., Pierrefiche, O., Ledent, C., Daoust, M. (2004) Decreased alcohol self-administration and increased alcohol sensitivity and withdrawal in CB1 receptor knockout mice. *Neuropharmacology*, **46**, 243-253.
- Naassila, M., Ledent, C., Daoust, M. (2002) Low ethanol sensitivity and increased ethanol consumption in mice lacking adenosine A2A receptors. *J. Neurosci.*, **22**, 10487-10493.
- Nagel, J., Schladebach, H., Koch, M., Schwienbacher, I., Muller, C. E., Hauber, W. (2003) Effects of an adenosine A2A receptor blockade in the nucleus accumbens on locomotion, feeding, and prepulse inhibition in rats. *Synapse*, **49**, 279-286.
- Nagy, L. E., Diamond, I., Gordon, A. S. (1991) cAMP-dependent protein kinase regulates inhibition of adenosine transport by ethanol. *Mol. Pharmacol.*, **40**, 812-817.
- Nairn, A. C., Svenningsson, P., Nishi, A., Fisone, G., Girault, J. A., Greengard, P. (2004) The role of DARPP-32 in the actions of drugs of abuse. *Neuropharmacology*, **47 Suppl 1**, 14-23.
- Nava, F., Carta, G., Battasi, A. M., Gessa, G. L. (2000) D(2) dopamine receptors enable delta(9)-tetrahydrocannabinol induced memory impairment and reduction of hippocampal extracellular acetylcholine concentration. *Br. J Pharmacol.*, **130**, 1201-1210.
- Navarro, M., Carrera, M. R., Fratta, W., Valverde, O., Cossu, G., Fattore, L., Chwen, J. A., Gomez, R., Del, A., I, Villanua, M. A., Maldonado, R., Koob, G. F., de Fonseca, F. R. (2001) Functional interaction between opioid and cannabinoid receptors in drug self-administration. *J Neurosci.*, **21**, 5344-5350.

Navarro, M., Chowen, J., Rocio, A. C., Del Arco., I, Villanua, M. A., Martin, Y., Roberts, A. J., Koob, G. F., Rodriguez de Fonseca, F. (1998) CB1 cannabinoid receptor antagonist-induced opiate withdrawal in morphine-dependent rats. *Neuroreport*, **9**, 3397-3402.

Navarro, M., Rodriguez, d. F. (1998) The neurobiology of cannabinoid transmission: from anandamide signaling to higher cerebral functions and disease. *Neurobiol. Dis*, **5**, 379-385.

Nazarian, A., Russo, S. J., Festa, E. D., Kraish, M., Quinones-Jenab, V. (2004) The role of D1 and D2 receptors in the cocaine conditioned place preference of male and female rats. *Brain Res. Bull.*, **63**, 295-299.

Negrete, J. C. (2003) Clinical aspects of substance abuse in persons with schizophrenia. *Can.J.Psychiatry*, **48**, 14-21.

Negus, S. S., Mello, N. K. (2003) Effects of chronic d-amphetamine treatment on cocaine- and food-maintained responding under a second-order schedule in rhesus monkeys. *Drug Alcohol Depend.*, **70**, 39-52.

Nestler, E. J. (2005) Is there a common molecular pathway for addiction? *Nat. Neurosci.*, **8**, 1445-1449.

Nestler, E. J. (2004) Molecular mechanisms of drug addiction. *Neuropharmacology*, **47 Suppl 1**, 24-32.

Nestler, E. J. (2002) Common molecular and cellular substrates of addiction and memory. *Neurobiol.Learn.Mem.*, **78**, 637-647.

Nestler, E. J., Terwilliger, R. Z., Walker, J. R., Sevarino, K. A., Duman, R. S. (1990) Chronic cocaine treatment decreases levels of the G protein subunits Gi alpha and Go alpha in discrete regions of rat brain. *J. Neurochem.*, **55**, 1079-1082.

Nikolaev, S. V., Bychkov, E. R., Lebedev, A. A., Dambinova, S. A. (2002) [The influence of substance P central administration on ethanol intake in rats chronically exposed to alcohol]. *Ross. Fiziol. Zh. Im I. M. Sechenova*, **88**, 907-913.

Nishi, A., Liu, F., Matsuyama, S., Hamada, M., Higashi, H., Nairn, A. C., Greengard, P. (2003) Metabotropic mGlu5 receptors regulate adenosine A2A receptor signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **100**, 1322-1327.

Noble, F., Cox, B. M. (1995) Differential regulation of D1 dopamine receptor- and of A2a adenosine receptor-stimulated adenylyl cyclase by mu-, delta 1-, and delta 2-opioid agonists in rat caudate putamen. *J.Neurochem.*, **65**, 125-133.

O'Brien, M. S., Anthony, J. C. (2005) Risk of becoming cocaine dependent: epidemiological estimates for the United States, 2000-2001. *Neuropsychopharmacology*, **30**, 1006-1618.

Ohno, M., Watanabe, S. (1996) Working memory failure by stimulation of hippocampal adenosine A1 receptors in rats. *Neuroreport*, **7**, 3013-3016.

Ohno-Shosaku, T., Maejima, T., Kano, M. (2001) Endogenous cannabinoids mediate retrograde signals from depolarized postsynaptic neurons to presynaptic terminals. *Neuron*, **29**, 729-738.

- Okada, M., Mizuno, K., Kaneko, S. (1996) Adenosine A1 and A2 receptors modulate extracellular dopamine levels in rat striatum. *Neurosci. Lett.*, **212**, 53-56.
- Olds, J., Milner, P. (1954) Positive reinforcement produced by electrical stimulation of septal area and other regions of rat brain. *J. Comp Physiol Psychol.*, **47**, 419-427.
- Osei-Hyiaman, D., De Petrillo, M., Pacher, P., Liu, J., Radaeva, S., Batkai, S., Harvey-White, J., Mackie, K., Offertaler, L., Wang, L., Kunos, G. (2005) Endocannabinoid activation at hepatic CB1 receptors stimulates fatty acid synthesis and contributes to diet-induced obesity. *J.Clin.Invest*, **115**, 1298-1305.
- Panagis, G., Hildebrand, B. E., Svensson, T. H., Nomikos, G. G. (2000) Selective c-fos induction and decreased dopamine release in the central nucleus of amygdala in rats displaying a mecamylamine-precipitated nicotine withdrawal syndrome. *Synapse*, **35**, 15-25.
- Paria, B. C., Dey, S. K. (2000) Ligand-receptor signaling with endocannabinoids in preimplantation embryo development and implantation. *Chem. Phys. Lipids*, **108**, 211-220.
- Park, K. S., Jeong, S. W., Cha, S. K., Lee, B. S., Kong, I. D., Ikeda, S. R., Lee, J. W. (2001) Modulation of N-type Ca²⁺ currents by A1-adenosine receptor activation in male rat pelvic ganglion neurons. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **299**, 501-508.
- Paterson, D., Nordberg, A. (2000) Neuronal nicotinic receptors in the human brain. *Prog. Neurobiol.*, **61**, 75-111.
- Paterson, N. E., Myers, C., Markou, A. (2000) Effects of repeated withdrawal from continuous amphetamine administration on brain reward function in rats. *Psychopharmacology*, **152**, 440-446.
- Pennartz, C. M., Groenewegen, H. J., Lopes da Silva, F. H. (1994) The nucleus accumbens as a complex of functionally distinct neuronal ensembles: an integration of behavioural, electrophysiological and anatomical data. *Prog. Neurobiol.*, **42**, 719-761.
- Pertwee, R. G. (2001) Cannabinoid receptors and pain. *Prog. Neurobiol.*, **63**, 569-611.
- Pertwee, R. G. (1999) Pharmacology of cannabinoid receptor ligands. *Curr. Med. Chem.*, **6**, 635-664.
- Piazza, P. V., Deroche-Gamonet, V., Rouge-Pont, F., Le Moal, M. (2000) Vertical shifts in self-administration dose-response functions predict a drug-vulnerable phenotype predisposed to addiction. *J. Neurosci.*, **20**, 4226-4232.
- Piazza, P. V., Le Moal, M. (1998) The role of stress in drug self-administration. *Trends Pharmacol. Sci.*, **19**, 67-74.
- Piazza, P. V., Le Moal, M. L. (1996) Pathophysiological basis of vulnerability to drug abuse: role of an interaction between stress, glucocorticoids, and dopaminergic neurons. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **36**, 359-378.
- Piazza, P. V., Deminiere, J. M., Maccari, S., Mormede, P., Le Moal, M., Smon, H. (1990a) Individual reactivity to novelty predicts probability of amphetamine self-administration. *Behav. Pharmacol.*, **1**, 339-345.

- Piazza, P. V., Deminiere, J. M., Le Moal, M., Simon, H. (1990b) Stress- and pharmacologically-induced behavioral sensitization increases vulnerability to acquisition of amphetamine self-administration. *Brain Res.*, **514**, 22-26.
- Piazza, P. V., Deminiere, J. M., Le Moal, M., Simon, H. (1989) Factors that predict individual vulnerability to amphetamine self-administration. *Science*, **245**, 1511-1513.
- Picciotto, M. R., Zoli, M., Lena, C., Bessis, A., Lallemand, Y., Le Novere, N., Vincent, P., Pich, E. M., Brulet, P., Changeux, J. P. (1995) Abnormal avoidance learning in mice lacking functional high-affinity nicotine receptor in the brain. *Nature*, **374**, 65-67.
- Pierce, R. C., Kumaresan, V. (2006) The mesolimbic dopamine system: the final common pathway for the reinforcing effect of drugs of abuse? *Neurosci. Biobehav. Rev.*, **30**, 215-238.
- Pilla, M., Perachon, S., Sautel, F., Garrido, F., Mann, A., Wermuth, C. G., Schwartz, J. C., Everitt, B. J., Sokoloff, P. (1999) Selective inhibition of cocaine-seeking behaviour by a partial dopamine D3 receptor agonist. *Nature*, **400**, 371-375.
- Piomelli, D. (2003) The molecular logic of endocannabinoid signalling. *Nat. Rev. Neurosci.*, **4**, 873-884.
- Piomelli, D., Beltramo, M., Glasnapp, S., Lin, S. Y., Goutopoulos, A., Xie, X. Q., Makriyannis, A. (1999) Brain regional distribution of endocannabinoids: implications for their biosynthesis and biological function. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **256**, 377-380.
- Pistis, M., Muntoni, A. L., Pillolla, G., Gessa, G. L. (2002). Cannabinoids inhibit excitatory inputs to neurons in the shell of the nucleus accumbens: an in vivo electrophysiological study. *J. Neurosci.*, **15**, 1795-1802.
- Poleszak, E., Malec, D. (2003) Effects of adenosine receptor agonists and antagonists in amphetamine-induced conditioned place preference test in rats. *Pol. J Pharmacol.*, **55**, 319-326.
- Poncelet, M., Maruani, J., Calassi, R., Soubrie, P. (2003) Overeating, alcohol and sucrose consumption decrease in CB1 receptor deleted mice. *Neurosci. Lett.*, **343**, 216-218.
- Popoli, P., Pezzola, A., Torvinen, M., Reggio, R., Pintor, A., Scarchilli, L., Fuxe, K., Ferré, S. (2001) The selective mGlu(5) receptor agonist CHPG inhibits quinpirole-induced turning in 6-hydroxydopamine-lesioned rats and modulates the binding characteristics of dopamine D(2) receptors in the rat striatum: interactions with adenosine A(2a) receptors. *Neuropsychopharmacology*, **25**, 505-513.
- Porter, A. C., Felder, C. C. (2001) The endocannabinoid nervous system: unique opportunities for therapeutic intervention. *Pharmacol. Ther.*, **90**, 45-60.
- Porter, A. C., Sauer, J. M., Knierman, M. D., Becker, G. W., Berna, M. J., Bao, J., Nomikos, G. G., Carter, P., Bymaster, F. P., Leese, A. B., Felder, C. C. (2002) Characterization of a novel endocannabinoid, virodhamine, with antagonist activity at the CB1 receptor. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **301**, 1020-1024.

- Rasmussen, K., Beitner-Johnson, D. B., Krystal, J. H., Aghajanian, G. K., Nestler, E. J. (1990) Opiate withdrawal and the rat locus coeruleus: behavioral, electrophysiological, and biochemical correlates. *J. Neurosci.*, **10**, 2308-2317.
- Razdan, R. K. (1986) Structure-activity relationships in cannabinoids. *Pharmacol. Rev.*, **38**, 75-149.
- Rezayof, A., Zarrindast, M. R., Sahraei, H., Haeri-Rohani, A. H. (2002) Involvement of dopamine D2 receptors of the central amygdala on the acquisition and expression of morphine-induced place preference in rat. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **74**, 187-197.
- Ribeiro, J. A., Sebastiao, A. M., de Mendonca, A. (2003) Participation of adenosine receptors in neuroprotection. *Drug News Perspect.*, **16**, 80-86.
- Ribeiro, J. A., Sebastiao, A. M., de Mendonca, A. (2002) Adenosine receptors in the nervous system: pathophysiological implications. *Prog. Neurobiol.*, **68**, 377-392.
- Richardson, N. R., Gratton, A. (1996) Behavior-relevant changes in nucleus accumbens dopamine transmission elicited by food reinforcement: an electrochemical study in rat. *J. Neurosci.*, **16**, 8160-8169.
- Richter, R. M., Weiss, F. (1999) In vivo CRF release in rat amygdala is increased during cocaine withdrawal in self-administering rats. *Synapse*, **32**, 254-261.
- Riedel, G., Davies, S. N. (2005) Cannabinoid function in learning, memory and plasticity. *Handb. Exp. Pharmacol.*, 445-477.
- Rinaldi-Carmona, M., Barth, F., Congy, C., Martinez, S., Oustric, D., Perio, A., Poncelet, M., Maruani, J., Arnone, M., Finance, O., Soubrie, P., Le Fur, G. (2004) SR147778 [5-(4-bromophenyl)-1-(2, 4-dichlorophenyl)-4-ethyl-N-(1-piperidinyl)-1H-pyrazole-3-carboxamide], a new potent and selective antagonist of the CB1 cannabinoid receptor: biochemical and pharmacological characterization. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **310**, 905-914.
- Rinaldi-Carmona, M., Barth, F., Millan, J., Derocq, J. M., Casellas, P., Congy, C., Oustric, D., Sarran, M., Bouaboula, M., Calandra, B., Portier, M., Shire, D., Breliere, J. C., Le Fur, G. L. (1998) SR 144528, the first potent and selective antagonist of the CB2 cannabinoid receptor. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **284**, 644-650.
- Rinaldi-Carmona, M., Barth, F., Heaulme, M., Shire, D., Calandra, B., Congy, C., Martinez, S., Maruani, J., Neliat, G., Caput, D. (1994) SR141716A, a potent and selective antagonist of the brain cannabinoid receptor. *FEBS Lett.*, **350**, 240-244.
- Risinger, F. O., Freeman, P. A., Greengard, P., Fienberg, A. A. (2001) Motivational effects of ethanol in DARPP-32 knock-out mice. *J. Neurosci.*, **21**, 340-348.
- Risinger, F. O., Brown, M. M., Doan, A. M., Oakes, R. A. (1998) Mouse strain differences in oral operant ethanol reinforcement under continuous access conditions. *Alcohol Clin. Exp. Res.*, **22**, 677-684.
- Robbe, D., Alonso, G., Duchamp, F., Bockaert, J., Manzoni, O. J. (2001) Localization and mechanisms of action of cannabinoid receptors at the glutamatergic synapses of the mouse nucleus accumbens. *J. Neurosci.*, **21**, 109-116.

- Robbe, D., Kopf, M., Remaury, A., Bockaert, J., Manzoni, O. J. (2002) Endogenous cannabinoids mediate long-term synaptic depression in the nucleus accumbens. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **99**, 8384-8388.
- Roberts, A. J., McDonald, J. S., Heyser, C. J., Kieffer, B. L., Matthes, H. W., Koob, G. F., Gold, L. H. (2000) mu-Opioid receptor knockout mice do not self-administer alcohol. *J Pharmacol. Exp. Ther.*, **293**, 1002-1008.
- Roberts, D. C., Loh, E. A., Vickers, G. (1989) Self-administration of cocaine on a progressive ratio schedule in rats: dose-response relationship and effect of haloperidol pretreatment. *Psychopharmacology*, **97**, 535-538.
- Robinson, T. E., Berridge, K. C. (2003) Addiction. *Annu. Rev. Psychol.*, **54**, 25-53.
- Robinson, T. E., Berridge, K. C. (1993) The neural basis of drug craving: an incentive-sensitization theory of addiction. *Brain Res. Brain Res. Rev.*, **18**, 247-291.
- Robinson, T. E., Jurson, P. A., Bennett, J. A., Bentgen, K. M. (1988) Persistent sensitization of dopamine neurotransmission in ventral striatum (nucleus accumbens) produced by prior experience with (+)-amphetamine: a microdialysis study in freely moving rats. *Brain Res.*, **462**, 211-222.
- Rodriguez de Fonseca, F., Del, A., I, Bermudez-Silva, F. J., Bilbao, A., Cippitelli, A., Navarro, M. (2005) The endocannabinoid system: physiology and pharmacology. *Alcohol Alcohol*, **40**, 2-14.
- Rodriguez de Fonseca, F., Roberts, A. J., Bilbao, A., Koob, G. F., Navarro, M. (1999) Cannabinoid receptor antagonist SR141716A decreases operant ethanol self administration in rats exposed to ethanol-vapor chambers. *Zhongguo Yao Li Xue. Bao.*, **20**, 1109-1114.
- Rodriguez de Fonseca, F., Carrera, M. R., Navarro, M., Koob, G. F., Weiss, F. (1997) Activation of corticotropin-releasing factor in the limbic system during cannabinoid withdrawal. *Science*, **276**, 2050-2054.
- Rodriguez de Fonseca, F., Gorriti, M. A., Fernandez-Ruiz, J. J., Palomo, T., Ramos, J. A. (1994) Downregulation of rat brain cannabinoid binding sites after chronic delta 9-tetrahydrocannabinol treatment. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **47**, 33-40.
- Romero, J., Berrendero, F., Garcia-Gil, L., Ramos, J. A., Fernandez-Ruiz, J. J. (1998) Cannabinoid receptor and WIN-55, 212-2-stimulated [³⁵S]GTP gamma S binding and cannabinoid receptor mRNA levels in the basal ganglia and the cerebellum of adult male rats chronically exposed to delta 9-tetrahydrocannabinol. *J. Mol. Neurosci.*, **11**, 109-119.
- Rouge-Pont, F., Usiello, A., Benoit-Marand, M., Gonon, F., Piazza, P. V., Borrelli, E. (2002) Changes in extracellular dopamine induced by morphine and cocaine: crucial control by D2 receptors. *J Neurosci.*, **22**, 3293-3301.
- Roux, S., Froger, C., Porsolt, R. D., Valverde, O., Maldonado, R. (2002) Place preference test in the rat. In: *Current Protocols in Pharmacology* (Ch. 10, 10. 4. 1. – 10. 4. 14.). Enna, S.J., Williams, M. (Eds.), Wiley, New York.
- Rubino, T., Tizzoni, L., Vigano, D., Massi, P., Parolaro, D. (1997) Modulation of rat brain cannabinoid receptors after chronic morphine treatment. *Neuroreport*, **8**, 3219-3223.

- Sacco, K. A., Bannon, K. L., George, T. P. (2004) Nicotinic receptor mechanisms and cognition in normal states and neuropsychiatric disorders. *J. Psychopharmacol.*, **18**, 457-474.
- Salem, A., Hope, W. (1997) Effect of adenosine receptor agonists and antagonists on the expression of opiate withdrawal in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **57**, 671-679.
- Sapru, M. K., Diamond, I., Gordon, A. S. (1994) Adenosine receptors mediate cellular adaptation to ethanol in NG108-15 cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **271**, 542-548.
- Schenk, S., Gittings, D. (2003) Effects of SCH 23390 and eticlopride on cocaine-seeking produced by cocaine and WIN 35, 428 in rats. *Psychopharmacology*, **168**, 118-123.
- Schenk, S., Worley, C. M., McNamara, C., Valadez, A. (1996) Acute and repeated exposure to caffeine: effects on reinstatement of extinguished cocaine-taking behavior in rats. *Psychopharmacology*, **126**, 17-23.
- Schiffmann, S. N., Vanderhaeghen, J. J. (1993) Adenosine A2 receptors regulate the gene expression of striatopallidal and striatonigral neurons. *J. Neurosci.*, **13**, 1080-1087.
- Schiffmann, S. N., Libert, F., Vassart, G., Vanderhaeghen, J. J. (1991) Distribution of adenosine A2 receptor mRNA in the human brain. *Neurosci. Lett.*, **130**, 177-181.
- Schoffelmeer, A. N., De Vries, T. J., Wardeh, G., van de Ven, H. W., Vanderschuren, L. J. (2002) Psychostimulant-induced behavioral sensitization depends on nicotinic receptor activation. *J. Neurosci.*, **22**, 3269-3276.
- Schorling, J. B., Gutgesell, M., Klas, P., Smith, D., Keller, A. (1994) Tobacco, alcohol and other drug use among college students. *J. Subst. Abuse*, **6**, 105-115.
- Schultz, W. (2001) Reward signaling by dopamine neurons. *Neuroscientist.*, **7**, 293-302.
- Sebastiao, A. M., Ribeiro, J. A. (2000) Fine-tuning neuromodulation by adenosine. *Trends Pharmacol. Sci.*, **21**, 341-346.
- Sebastiao, A. M., Ribeiro, J. A. (1996) Adenosine A2 receptor-mediated excitatory actions on the nervous system. *Prog. Neurobiol.*, **48**, 167-189.
- See, R. E., Grimm, J. W., Kruzich, P. J., Rustay, N. (1999) The importance of a compound stimulus in conditioned drug-seeking behavior following one week of extinction from self-administered cocaine in rats. *Drug Alcohol Depend.*, **57**, 41-49.
- Self, D. W., Genova, L. M., Hope, B. T., Barnhart, W. J., Spencer, J. J., Nestler, E. J. (1998) Involvement of cAMP-dependent protein kinase in the nucleus accumbens in cocaine self-administration and relapse of cocaine-seeking behavior. *J. Neurosci.*, **18**, 1848-1859.
- Self, D. W. and Nestler, E. J. (1995) Molecular mechanisms of drug reinforcement and addiction. *Annual Reviews in Neuroscience*. **18**, 463-495.
- Shaham, Y., Shalev, U., Lu, L., De Wit, H., Stewart, J. (2002) The reinstatement model of drug relapse: history, methodology and major findings. *Psychopharmacology*, **168**, 3-20.

- Shaham, Y., Stewart, J. (1996) Effects of opioid and dopamine receptor antagonists on relapse induced by stress and re-exposure to heroin in rats. *Psychopharmacology*, **125**, 385-391.
- Sharma, S. K., Klee, W. A., Nirenberg, M. (1977) Opiate-dependent modulation of adenylate cyclase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **74**, 3365-3369.
- Shi, D., Daly, J. W. (1999) Chronic effects of xanthines on levels of central receptors in mice. *Cell Mol. Neurobiol.*, **19**, 719-732.
- Shoib, M., Swanner, L. S., Yasar, S., Goldberg, S. R. (1999) Chronic caffeine exposure potentiates nicotine self-administration in rats. *Psychopharmacology*, **142**, 327-333.
- Sibley, D. R., Monsma, F. J., Jr., Shen, Y. (1993) Molecular neurobiology of dopaminergic receptors. *Int. Rev. Neurobiol.*, **35**, 391-415.
- Sim, L. J., Hampson, R. E., Deadwyler, S. A., Childers, S. R. (1996) Effects of chronic treatment with delta9-tetrahydrocannabinol on cannabinoid-stimulated [35S]GTPgammaS autoradiography in rat brain. *J. Neurosci.*, **16**, 8057-8066.
- Smonin, F., Valverde, O., Smadja, C., Sowe, S., Kitchen, I., Dierich, A., Le Meur, M., Roques, B. P., Maldonado, R., Kieffer, B. L. (1998) Disruption of the kappa-opioid receptor gene in mice enhances sensitivity to chemical visceral pain, impairs pharmacological actions of the selective kappa-agonist U-50, 488H and attenuates morphine withdrawal. *EMBO J*, **17**, 886-897.
- Simonyi, A., Schachtman, T. R., Christoffersen, G. R. (2005) The role of metabotropic glutamate receptor 5 in learning and memory processes. *Drug News Perspect.*, **18**, 353-361.
- Skinner, B. F. (1938) *The Behavior of Organisms*. Appleton-Century-Crofts, New York
- Slawecki, C. J., Jimenez-Vasquez, P., Mathe, A. A., Ehlers, C. L. (2001) Substance P and neurokinin levels are decreased in the cortex and hypothalamus of alcohol-preferring (P) rats. *J. Stud. Alcohol*, **62**, 736-740.
- Smith, P. B., Welch, S. P., Martin, B. R. (1994) Interactions between delta 9-tetrahydrocannabinol and kappa opioids in mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **268**, 1381-1387.
- Solinas, M., Goldberg, S. R. (2005) Involvement of mu-, delta- and kappa-opioid receptor subtypes in the discriminative-stimulus effects of delta-9-tetrahydrocannabinol (THC) in rats. *Psychopharmacology*, **179**, 804-812.
- Solinas, M., Panlilio, L. V., Antoniou, K., Pappas, L. A., Goldberg, S. R. (2003) The cannabinoid CB1 antagonist SR-141716A, differentially alters the reinforcing effects of heroin under continuous-reinforcement, fixed-ratio and progressive-ratio schedules of drug self-administration in rats. *J Pharmacol. Exp. Ther.*, **306**, 93-102
- Solinas, M., Ferré, S., You, Z. B., Karcz-Kubicha, M., Popoli, P., Goldberg, S. R. (2002) Caffeine induces dopamine and glutamate release in the shell of the nucleus accumbens. *J Neurosci.*, **22**, 6321-6324.
- Solomon, R. L., Corbit, J. D. (1974) An opponent-process theory of motivation. I. Temporal dynamics of affect. *Psychol. Rev.*, **81**, 119-145.

- Sora, I., Takahashi, N., Funada, M., Ujike, H., Revay, R. S., Donovan, D. M., Miner, L. L., Uhl, G. R. (1997) Opiate receptor knockout mice define mu receptor roles in endogenous nociceptive responses and morphine-induced analgesia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **94**, 1544-1549.
- Soria, G., Castañé, A., Ledent, C., Parmentier, M., Maldonado, R., Valverde, O. (2006) The Lack of A(2A) Adenosine Receptors Diminishes the Reinforcing Efficacy of Cocaine. *Neuropsychopharmacology*, **31**, 978-87.
- Soria, G., Mendizábal, V., Touriño, C., Robledo, P., Ledent, C., Parmentier, M., Maldonado, R., Valverde, O. (2005) Lack of CB1 cannabinoid receptor impairs cocaine self-administration. *Neuropsychopharmacology*, **30**, 1670-1680.
- Soria, G., Castañé, A., Berrendero, F., Ledent, C., Parmentier, M., Maldonado, R., Valverde, O. (2004) Adenosine A2A receptors are involved in physical dependence and place conditioning induced by THC. *Eur. J. Neurosci.*, **20**, 2203-2213.
- Spanagel, R., Heilig, M. (2005) Addiction and its brain science. *Addiction*, **100**, 1813-1822.
- Spanagel, R., Almeida, O. F., Bartl, C., Shippenberg, T. S. (1994) Endogenous kappa-opioid systems in opiate withdrawal: role in aversion and accompanying changes in mesolimbic dopamine release. *Psychopharmacology*, **115**, 121-127.
- Spealman, R. D. (1988) Psychomotor stimulant effects of methylxanthines in squirrel monkeys: relation to adenosine antagonism. *Psychopharmacology*, **95**, 19-24.
- Stehle, J. H., Rivkees, S. A., Lee, J. J., Weaver, D. R., Deeds, J. D., Reppert, S. M. (1992) Molecular cloning and expression of the cDNA for a novel A2-adenosine receptor subtype. *Mol. Endocrinol.*, **6**, 384-393.
- Stella, N., Schweitzer, P., Piomelli, D. (1997) A second endogenous cannabinoid that modulates long-term potentiation. *Nature*, **388**, 773-778.
- Stewart, J., Badiani, A. (1993) Tolerance and sensitization to the behavioral effects of drugs. *Behav. Pharmacol.*, **4**, 289-312.
- Stewart, J., Vezina, P. (1988) A comparison of the effects of intra-accumbens injections of amphetamine and morphine on reinstatement of heroin intravenous self-administration behavior. *Brain Res.*, **457**, 287-294.
- Stone, T. W. (2002) Purines and neuroprotection. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **513**, 249-280.
- Striplin, C. D., Kalivas, P. W. (1992) Correlation between behavioral sensitization to cocaine and G protein ADP-ribosylation in the ventral tegmental area. *Brain Res.*, **579**, 181-186.
- Sudakov, S. K., Rusakova, I. V., Medvedeva, O. F. (2003) Effect of chronic caffeine consumption on changes in locomotor activity of WAG/G and Fischer-344 rats induced by nicotine, ethanol, and morphine. *Bull. Exp. Biol. Med.*, **136**, 563-565.
- Sugiura, T., Kondo, S., Kishimoto, S., Miyashita, T., Nakane, S., Kodaka, T., Suhara, Y., Takayama, H., Waku, K. (2000) Evidence that 2-arachidonoylglycerol but not N-palmitoylethanolamine or anandamide is the physiological ligand for the cannabinoid

CB2 receptor. Comparison of the agonistic activities of various cannabinoid receptor ligands in HL-60 cells. *J. Biol. Chem.*, **275**, 605-612.

Sugiura, T., Kondo, S., Sukagawa, A., Nakane, S., Shinoda, A., Itoh, K., Yamashita, A., Waku, K. (1995) 2-Arachidonoylglycerol: a possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **215**, 89-97.

Sullivan, J. M. (2000) Cellular and molecular mechanisms underlying learning and memory impairments produced by cannabinoids. *Learn.Mem.*, **7**, 132-139.

Surprenant, A., Shen, K. Z., North, R. A., Tatsumi, H. (1990) Inhibition of calcium currents by noradrenaline, somatostatin and opioids in guinea-pig submucosal neurones. *J. Physiol.*, **431**, 585-608.

Svenningsson, P., Nishi, A., Fisone, G., Girault, J. A., Nairn, A. C., Greengard, P. (2004) DARPP-32: an integrator of neurotransmission. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **44**, 269-296.

Svenningsson, P., Nomikos, G. G., Fredholm, B. B. (1995) Biphasic changes in locomotor behavior and in expression of mRNA for NGFI-A and NGFI-B in rat striatum following acute caffeine administration. *J. Neurosci.*, **15**, 7612-7624.

Svingos, A. L., Periasamy, S., Pickel, V. M. (2000) Presynaptic dopamine D(4) receptor localization in the rat nucleus accumbens shell. *Synapse*, **36**, 222-232.

Swanson, J. A., Lee, J. W., Hopp, J. W. (1994) Caffeine and nicotine: a review of their joint use and possible interactive effects in tobacco withdrawal. *Addict. Behav.*, **19**, 229-256.

Sweeney, M. I., White, T. D., Sawynok, J. (1991) Intracerebroventricular morphine releases adenosine and adenosine 3', 5'-cyclic monophosphate from the spinal cord via a serotonergic mechanism. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **259**, 1013-1018.

Sweeney, M. I., White, T. D., Jhamandas, K. H., Sawynok, J. (1987) Morphine releases endogenous adenosine from the spinal cord in vivo. *Eur. J. Pharmacol.*, **141**, 169-170.

Tanda, G., Munzar, P., Goldberg, S. R. (2000) Self-administration behavior is maintained by the psychoactive ingredient of marijuana in squirrel monkeys. *Nat. Neurosci.*, **3**, 1073-1074.

Tanda, G., Pontieri, F. E., Di Chiara, G. (1997) Cannabinoid and heroin activation of mesolimbic dopamine transmission by a common mu1 opioid receptor mechanism. *Science*, **276**, 2048-2050.

Terenius, L. (1977) Opioid peptides and opiates differ in receptor selectivity. *Psychoneuroendocrinology*, **2**, 53-58.

Terwilliger, R. Z., Beitner-Johnson, D., Sevarino, K. A., Crain, S. M., Nestler, E. J. (1991) A general role for adaptations in G-proteins and the cyclic AMP system in mediating the chronic actions of morphine and cocaine on neuronal function. *Brain Res.*, **548**, 100-110.

Tessari, M., Pilla, M., Andreoli, M., Hutcheson, D. M., Heidbreder, C. A. (2004) Antagonism at metabotropic glutamate 5 receptors inhibits nicotine- and cocaine-taking

- behaviours and prevents nicotine-triggered relapse to nicotine-seeking. *Eur. J. Pharmacol.*, **499**, 121-133.
- Thanos, P. K., Dimitrakakis, E. S., Rice, O., Gifford, A., Volkow, N. D. (2005) Ethanol self-administration and ethanol conditioned place preference are reduced in mice lacking cannabinoid CB1 receptors. *Behav. Brain Res.*, **164**, 206-213.
- Thomas, M. J., Beurrier, C., Bonci, A., Malenka, R. C. (2001) Long-term depression in the nucleus accumbens: a neural correlate of behavioral sensitization to cocaine. *Nat. Neurosci.*, **4**, 1217-1223.
- Thorat, S. N., Bhargava, H. N. (1994) Evidence for a bidirectional cross-tolerance between morphine and delta 9-tetrahydrocannabinol in mice. *Eur. J. Pharmacol.*, **260**, 5-13.
- Tiffany, S. T. (1990) A cognitive model of drug urges and drug-use behavior: role of automatic and nonautomatic processes. *Psychol. Rev.*, **97**, 147-168.
- Turgeon, S. M., Pollack, A. E., Schusheim, L., Fink, J. S. (1996) Effects of selective adenosine A1 and A2a agonists on amphetamine-induced locomotion and c-Fos in striatum and nucleus accumbens. *Brain Res.*, **707**, 75-80.
- Tzavara, E. T., Valjent, E., Firmo, C., Mas, M., Beslot, F., Defer, N., Roques, B.P., Hanoune, J., Maldonado, R. (2000) Cannabinoid withdrawal is dependent upon PKA activation in the cerebellum. *Eur. J. Neurosci.* **12**, 1038-1046.
- Ugedo, L., Ruiz, E. (2000) Influencia de la herencia genética en las drogodependencias *Transtornos Adictivos*, **2**, 114-121.
- Uhl, G. R., Grow, R. W. (2004) The burden of complex genetics in brain disorders. *Arch. Gen. Psychiatry*, **61**, 223-229.
- Uhl, G. R. (1999) Molecular genetics of substance abuse vulnerability: a current approach. *Neuropsychopharmacology*, **20**, 3-9.
- Valdes, J. J., McGuire, P. S., Annau, Z. (1982) Xanthines alter behavior maintained by intracranial electrical stimulation and an operant schedule. *Psychopharmacology*, **76**, 325-328.
- Valjent, E., Pascoli, V., Svenningsson, P., Paul, S., Enslin, H., Corvol, J. C., Stipanovich, A., Caboche, J., Lombroso, P. J., Nairn, A. C., Greengard, P., Herve, D., Girault, J. A. (2005) Regulation of a protein phosphatase cascade allows convergent dopamine and glutamate signals to activate ERK in the striatum. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **102**, 491-496.
- Valjent, E., Mitchell, J. M., Besson, M. J., Caboche, J., Maldonado, R. (2002) Behavioural and biochemical evidence for interactions between Delta 9-tetrahydrocannabinol and nicotine. *Br. J. Pharmacol.*, **135**, 564-578.
- Valjent, E., Pages, C., Rogard, M., Besson, M. J., Maldonado, R., Caboche, J. (2001) Delta 9-tetrahydrocannabinol-induced MAPK/ERK and Elk-1 activation in vivo depends on dopaminergic transmission. *Eur. J. Neurosci.*, **14**, 342-352.
- Valjent, E., Maldonado, R. (2000) A behavioural model to reveal place preference to delta 9-tetrahydrocannabinol in mice. *Psychopharmacology*, **147**, 436-438.

Valverde, O., Karsak, M., Zimmer, A. (2005) Analysis of the endocannabinoid system by using CB1 cannabinoid receptor knockout mice. *Handb. Exp. Pharmacol.*, 117-145.

Valverde, O., Maldonado, R. (2005) Neurobiología de la adicción a opiáceos. *Adicciones: revista de sociodrogalcohol. Monografía opiáceos*, **17**, 41-56

Valverde, O., Noble, F., Beslot, F., Dauge, V., Fournie-Zaluski, M. C., Roques, B. P. (2001) Delta9-tetrahydrocannabinol releases and facilitates the effects of endogenous enkephalins: reduction in morphine withdrawal syndrome without change in rewarding effect. *Eur. J. Neurosci.*, **13**, 1816-1824.

Valverde, O., Maldonado, R., Valjent, E., Zimmer, A. M., Zimmer, A. (2000) Cannabinoid withdrawal syndrome is reduced in pre-proenkephalin knock-out mice. *J Neurosci.*, **20**, 9284-9289.

Valverde, O., Tzavara, E., Hanoune, J., Roques, B. P., Maldonado, R. (1996) Protein kinases in the rat nucleus accumbens are involved in the aversive component of opiate withdrawal. *Eur. J. Neurosci.*, **8**, 2671-2678.

van den Brink, W., van Ree, J. M. (2003) Pharmacological treatments for heroin and cocaine addiction. *Eur. Neuropsychopharmacol.*, **13**, 476-487.

van der Stelt, M., Di Marzo, V (2003) The endocannabinoid system in the basal ganglia and in the mesolimbic reward system: implications for neurological and psychiatric disorders. *Eur. J. Pharmacol.*, **480**, 133-150.

van Ree, J. M., Gerrits, M. A., Vanderschuren, L. J. (1999) Opioids, reward and addiction: An encounter of biology, psychology, and medicine. *Pharmacol. Rev.*, **51**, 341-396.

Van Sickle, M. D., Duncan, M., Kingsley, P. J., Mouihate, A., Urbani, P., Mackie, K., Stella, N., Makriyannis, A., Piomelli, D., Davison, J. S., Marnett, L. J., Di, M., V, Pittman, Q. J., Patel, K. D., Sharkey, K. A. (2005) Identification and functional characterization of brainstem cannabinoid CB2 receptors. *Science*, **310**, 329-332.

Vanderschuren, L. J., De Vries, T. J., Wardeh, G., Hogenboom, F. A., Schoffelmeer, A. N. (2001) A single exposure to morphine induces long-lasting behavioural and neurochemical sensitization in rats. *Eur. J. Neurosci.*, **14**, 1533-1538.

Vanderschuren, L. J., Schmidt, E. D., De Vries, T. J., Van Moorsel, C. A., Tilders, F. J., Schoffelmeer, A. N. (1999) A single exposure to amphetamine is sufficient to induce long-term behavioral, neuroendocrine, and neurochemical sensitization in rats. *J. Neurosci.*, **19**, 9579-9586.

Venance, L., Maldonado, R., Manzoni, O. (2004) Endocannabinoids in the central nervous system. *Med. Sci.*, **20**, 45-53.

Vezina, P. (2004) Sensitization of midbrain dopamine neuron reactivity and the self-administration of psychomotor stimulant drugs. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, **27**, 827-839.

Vidal, C. (1996) Nicotinic receptors in the brain. Molecular biology, function, and therapeutics. *Mol. Chem. Neuropathol.*, **28**, 3-11.

- Vinklerova, J., Novakova, J., Sulcova, A. (2002) Inhibition of methamphetamine self-administration in rats by cannabinoid receptor antagonist AM 251. *J. Psychopharmacol.*, **16**, 139-143.
- Viveros, M. P., Marco, E. M., File, S. E. (2005) Endocannabinoid system and stress and anxiety responses. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **81**, 331-342.
- Vlachou, S., Nomikos, G. G., Panagis, G. (2003) WIN 55, 212-2 decreases the reinforcing actions of cocaine through CB1 cannabinoid receptor stimulation. *Behav. Brain Res.*, **141**, 215-222.
- Volkow, N. D., Li, T. K. (2004) Drug addiction: the neurobiology of behaviour gone awry. *Nat. Rev. Neurosci.*, **5**, 963-970.
- Volkow, N. D., Wang, G. J., Ma, Y., Fowler, J. S., Zhu, W., Maynard, L., Telang, F., Vaska, P., Ding, Y. S., Wong, C., Swanson, J. M. (2003) Expectation enhances the regional brain metabolic and the reinforcing effects of stimulants in cocaine abusers. *J. Neurosci.*, **23**, 11461-11468.
- Volkow, N. D., Fowler, J. S., Wang, G. J., Goldstein, R. Z. (2002) Role of dopamine, the frontal cortex and memory circuits in drug addiction: insight from imaging studies. *Neurobiol. Learn. Mem.*, **78**, 610-624.
- Volkow, N. D., Wang, G. J., Fowler, J. S., Logan, J., Gatley, S. J., Wong, C., Hitzemann, R., Pappas, N. R. (1999) Reinforcing effects of psychostimulants in humans are associated with increases in brain dopamine and occupancy of D(2) receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **291**, 409-415.
- Vortherms, T. A., Watts, V. J. (2004) Sensitization of neuronal A2A adenosine receptors after persistent D2 dopamine receptor activation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **308**, 221-227.
- Wang, B., Shaham, Y., Zitzman, D., Azari, S., Wise, R. A., You, Z. B. (2005) Cocaine experience establishes control of midbrain glutamate and dopamine by corticotropin-releasing factor: a role in stress-induced relapse to drug seeking. *J. Neurosci.*, **25**, 5389-5396.
- Wang, H., Matsumoto, H., Guo, Y., Paria, B. C., Roberts, R. L., Dey, S. K. (2003) Differential G protein-coupled cannabinoid receptor signaling by anandamide directs blastocyst activation for implantation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **100**, 14914-14919.
- Weerts, E. M., Griffiths, R. R. (2003) The adenosine receptor antagonist CGS15943 reinstates cocaine-seeking behavior and maintains self-administration in baboons.
- Weiner, D. M., Levey, A. I., Sunahara, R. K., Niznik, H. B., O'Dowd, B. F., Seeman, P., Brann, M. R. (1991) D1 and D2 dopamine receptor mRNA in rat brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **88**, 1859-1863.
- Weiss, F., Maldonado-Vlaar, C. S., Parsons, L. H., Kerr, T. M., Smith, D. L., Ben Shahar, O. (2000) Control of cocaine-seeking behavior by drug-associated stimuli in rats: effects on recovery of extinguished operant-responding and extracellular dopamine levels in amygdala and nucleus accumbens. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **97**, 4321-4326.
- Wenger, T., Mouldrich, G., Furst, S. (2003) Neuromorphological background of cannabis addiction. *Brain Res. Bull.*, **61**, 125-128.

- Williams, C.M. & Kirkham, T.C. (2002) Observational analysis of feeding induced by Delta9-THC and anandamide. *Physiol Behav.*, **76**, 241-250.
- Wilson, R. I., Nicoll, R. A. (2002) Endocannabinoid signaling in the brain. *Science*, **296**, 678-682.
- Winger, G., Woods, J. H. (2001) The effects of chronic morphine on behavior reinforced by several opioids or by cocaine in rhesus monkeys. *Drug Alcohol Depend.*, **62**, 181-189.
- Wise, R. (2002) Brain reward circuitry. Insights from unsensed incentives. *Neuron*, **36**, 229.
- Wise, R. A. (1996) Neurobiology of addiction. *Curr. Opin. Neurobiol.*, **6**, 243-251.
- Wise, R. A., Bozarth, M. A. (1985) Brain mechanisms of drug reward and euphoria. *Psychiatr. Med.*, **3**, 445-460.
- Wise, R. A., Bozarth, M. A. (1984) Brain reward circuitry: four circuit elements "wired" in apparent series. *Brain Res. Bull.*, **12**, 203-208.
- Wise, R. A., Bozarth, M. A. (1987) A psychomotor stimulant theory of addiction. *Psychol. Rev.*, **94**, 469-492.
- World Drug Report (2005) UNODC <http://www.unis.unvienna.org>
- Worley, C. M., Valadez, A., Schenk, S (1994) Reinstatement of extinguished cocaine-taking behavior by cocaine and caffeine. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **48**, 217-221.
- Xi, Z. X., Gilbert, J., Campos, A. C., Kline, N., Ashby, C. R., Jr., Hagan, J. J., Heidbreder, C. A., Gardner, E. L. (2004) Blockade of mesolimbic dopamine D3 receptors inhibits stress-induced reinstatement of cocaine-seeking in rats. *Psychopharmacology*, **176**, 57-65.
- Yamamoto, T., Anggadiredja, K., Hiranita, T. (2004) New perspectives in the studies on endocannabinoid and cannabis: a role for the endocannabinoid-arachidonic acid pathway in drug reward and long-lasting relapse to drug taking. *J. Pharmacol. Sci.*, **96**, 382-388.
- Yamashita, I., Ohmori, T., Koyama, T., Mori, H., Boyadjive, S., Kielholz, P., Gastpar, M., Moussaoui, D., Bouzekraoui, M., Sethi, B. B., . (1990) Biological study of alcohol dependence syndrome with reference to ethnic difference: report of a WHO Collaborative Study. *Jpn. J. Psychiatry Neurol.*, **44**, 79-84.
- Yao, L., Fan, P., Jiang, Z., Mailliard, W. S., Gordon, A. S., Diamond, I. (2003) Addicting drugs utilize a synergistic molecular mechanism in common requiring adenosine and Gi-beta gamma dimers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **100**, 14379-14384.
- Yao, L., Arolfo, M. P., Dohrman, D. P., Jiang, Z., Fan, P., Fuchs, S., Janak, P. H., Gordon, A. S., Diamond, I. (2002) betagamma Dimers mediate synergy of dopamine D2 and adenosine A2 receptor-stimulated PKA signaling and regulate ethanol consumption. *Cell*, **109**, 733-743.
- Zachariou, V., Benoit-Marand, M., Allen, P. B., Ingrassia, P., Fienberg, A. A., Gonon, F., Greengard, P., Picciotto, M. R. (2002) Reduction of cocaine place preference in mice

-
- lacking the protein phosphatase 1 inhibitors DARPP 32 or Inhibitor 1. *Biol. Psychiatry*, **51**, 612-620.
- Zarrindast, M. R., Moghadamnia, A. A. (1997) Adenosine receptor agents and conditioned place preference. *Gen. Pharmacol.*, **29**, 285-289.
- Zarrindast, M. R., Shafaghi, B. (1994) Effects of adenosine receptor agonists and antagonists on acquisition of passive avoidance learning. *Eur. J. Pharmacol.*, **256**, 233-239.
- Zetterstrom, T., Fillenz, M. (1990) Adenosine agonists can both inhibit and enhance in vivo striatal dopamine release. *Eur. J. Pharmacol.*, **180**, 137-143.
- Zhou, Q. Y., Li, C., Olah, M. E., Johnson, R. A., Stiles, G. L., Civelli, O. (1992) Molecular cloning and characterization of an adenosine receptor: the A3 adenosine receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **89**, 7432-7436.
- Zimmer, A., Valjent, E., Konig, M., Zimmer, A. M., Robledo, P., Hahn, H., Valverde, O., Maldonado, R. (2001) Absence of delta -9-tetrahydrocannabinol dysphoric effects in dynorphin-deficient mice. *J Neurosci.*, **21**, 9499-9505.
- Zimmer, A., Zimmer, A. M., Hohmann, A. G., Herkenham, M., Bonner, T. I. (1999) Increased mortality, hypoactivity, and hypoalgesia in cannabinoid CB1 receptor knockout mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **96**, 5780-5785.
- Zoli, M., Agnati, L. F., Hedlund, P. B., Li, X. M., Ferré, S., Fuxe, K. (1993) Receptor-receptor interactions as an integrative mechanism in nerve cells. *Mol. Neurobiol.*, **7**, 293-334.

A decorative horizontal border at the bottom of the page, featuring a repeating pattern of stylized, light gray floral and scrollwork motifs. The motifs include large, swirling acanthus-like leaves and smaller, more delicate floral elements.

ANEXO

José Manuel Trigo · Fany Panayi · Guadalupe Soria ·
Rafael Maldonado · Patricia Robledo

A reliable model of intravenous MDMA self-administration in naïve mice

Received: 7 June 2005 / Accepted: 22 September 2005 / Published online: 15 December 2005
© Springer-Verlag 2005

Abstract *Rationale:* MDMA is one of the most widely consumed recreational drugs in Europe. However, the mechanisms involved in the reinforcing properties of MDMA are still unclear. In this sense, the establishment of a reliable model of MDMA self-administration in mice could represent an important approach to study the neuronal substrates associated with MDMA reward by using genetically modified mice. *Objectives:* To develop a reliable model of operant intravenous MDMA self-administration in drug-naïve mice. *Materials and methods:* Mice were trained to acquire intravenous self-administration of MDMA at different doses (0, 0.06, 0.125, 0.25, 0.5 and 1.0 mg/kg/infusion) on a FR1 schedule of reinforcement for 15 consecutive days. The motivational value of different doses of MDMA (0.125, 0.25 and 0.5 mg/kg/infusion) was then tested using a progressive ratio paradigm. Finally, [³H]-mazindol autoradiographic studies were carried out in order to quantitatively assess presynaptic dopamine transporter (DAT) binding sites in the striatum of mice trained to self-administer MDMA (0 and 1.0 mg/kg/infusion) during 15 days. *Results:* The latency for discrimination between the active and inactive holes, as well as the number of animals acquiring stability criteria, varied as a function of the dose of MDMA. The mice responding for intermediate doses (0.125, 0.25 and 0.5 mg/kg/infusion) discriminated earlier than those responding for low (0.06 mg/kg/infusion) or high (1.0 mg/kg/infusion) doses. The percentage of animals achieving stability criteria increased with days of testing and was inversely proportional to the dose of MDMA. The breaking points achieved for doses of 0.125 and 0.25 mg/kg/infusion were

significantly higher than for a dose of 0.5 mg/kg/infusion. No significant DAT neurotoxicity was observed in the striatum of animals self-administering MDMA at a dose of 1 mg/kg/infusion. *Conclusions:* The present results show that MDMA can be reliably self-administered by drug-naïve mice.

Keywords DAT · Ecstasy · Mazindol binding · Operant responding · Progressive ratio · Reinforcement

Introduction

MDMA (3,4-methylenedioxymethamphetamine) is a ring-substituted amphetamine derivative widely used as a recreational drug. The positive acute effects of MDMA in humans include euphoria, feelings of pleasure and emotional closeness, but it can also produce negative effects such as mental confusion, behavioural hyperactivity and hyperthermia (Parrott 2001). Long-term MDMA use can induce persistent neuropsychological disorders such as depression, psychosis and cognitive impairment (for review, see Parrott 2001; Green et al. 2003). Although MDMA is mostly used occasionally in the context of rave parties with users consuming one or two tablets, some experienced individuals may consume 10 or 25 tablets in a single session. In addition, some less frequent erratic patterns of MDMA use are now being described such as “bingeing” or intravenous administration (see Parrott 2005 for review). However, there are very limited data on how these changing patterns of MDMA use can influence the development of addictive behaviour.

In experimental animals, MDMA increases locomotion and induces rewarding effects. Indeed, conditioned place preference to MDMA administration has been shown in rats (Bilsky et al. 1991) and mice (Salzmann et al. 2003; Robledo et al. 2004a,b). The mesolimbic dopamine system has been implicated in the rewarding effects of MDMA as revealed in electrophysiological and neurochemical studies (Yamamoto and Spanos 1988; Marona-Lewicka et al. 1996; White et al. 1996; Bilsky et al. 1998; Kankaanpää et

J. M. Trigo · F. Panayi · G. Soria · R. Maldonado (✉) ·
P. Robledo
Universitat Pompeu Fabra,
Calle Dr. Aiguader, 80,
08003 Barcelona, Spain
e-mail: rafael.maldonado@upf.edu
Tel.: +34-93-5422830

P. Robledo
Institut Municipal d'Investigació Mèdica (IMTM),
Barcelona, Spain

al. 1998; Robledo et al. 2004b). However, MDMA also increases the synaptic availability of serotonin (Iravani et al. 2000) by blockade of serotonin uptake sites, and the subsequent activation of different types of serotonin receptors has been shown to modulate MDMA-induced reward (Fletcher et al. 2002; Fantegrossi et al. 2002; see Cole and Sumnall 2003 for review). Using the operant intravenous self-administration technique, the reinforcing efficacy of MDMA was demonstrated in monkeys (Beardsley et al. 1986; Lamb and Griffiths 1987; Fantegrossi et al. 2002) and rats (Ratzenboeck et al. 2001; Schenk et al. 2003). Recently, it has been shown that the dopamine D1 antagonist, SCH 23390, is capable of attenuating the reinforcing properties of MDMA in rats (Daniela et al. 2004), and a role for serotonin has been reported in the modulation of MDMA self-administration in monkeys (Fantegrossi et al. 2002). Nevertheless, there is still a paucity of data evaluating how the different neurotransmitter systems influenced by MDMA administration interact to produce reinforcing effects.

In contrast, our knowledge as to the neuronal systems implicated in the reinforcing effects of other drugs of abuse such as cocaine (Rocha 2003; Hall et al. 2004; Soria et al. 2005), opioids (Maldonado 2003), nicotine (Castañe et al. 2005), alcohol (Schumann et al. 2003) and cannabinoids (Valverde et al. 2004) has greatly advanced with the introduction of genetically modified mice. With this in mind, the aim of the present study was to develop a model of operant intravenous MDMA self-administration in mice, a paradigm considered to be the most suitable model to study abuse liability in animals. For that purpose, we examined the acquisition and the maintenance of MDMA self-administration at different training doses, under a fixed-ratio 1 (FR1) schedule of reinforcement in naïve mice. Moreover, we studied the motivational properties of MDMA using the progressive ratio paradigm, where we evaluated the amount of work an animal was willing to perform for different doses of MDMA. Finally, since repeated administration of MDMA generally produces more prominent dopaminergic than serotonergic neurotoxicity (Colado et al. 2001; O'Shea et al. 2001; Itzhak et al. 2003), we assessed the possible changes in dopamine transporters (DAT) in mice self-administering MDMA (1.0 mg/kg/infusion) for 15 consecutive days using autoradiography of [³H]-mazindol binding sites.

Material and methods

Animals

Experiments were performed in CD1 male mice, weighing 22–24 g upon their arrival in the laboratory. The mice were initially housed at five animals per cage in a room with controlled temperature (21±1°C) and humidity (65±10%), with a reversed 12-h/12-h light/dark cycle (lights off from 08:00 to 20:00) and with ad libitum food and water. The experiments took place during the dark phase. Behavioural tests and animal care were conducted in ac-

cordance with the standard ethical guidelines (National Institutes of Health, 1995; European Communities Directive 86/609 EEC) and approved by the local ethical committee (CEEA-IMAS-LPF).

Drugs

MDMA hydrochloride [(+/-) 3,4-methylenedioxymethamphetamine] was obtained from Lipomed, A.G. (Arllesheim, Switzerland), and dissolved in 0.9% physiological saline.

Drug self-administration

Apparatus Self-administration training and testing occurred in 16 operant chambers (Model ENV-307A-CT, Medical Associates, Georgia, VT, USA) equipped with two holes, one was selected as the active hole for delivering the reinforcer and the other as the inactive hole. Acquisition of drug self-administration was performed using a FR1 schedule of reinforcement such that one nose-poke in the active hole resulted in one MDMA infusion, while nose-poking in the inactive hole had no consequences. The chambers were housed in sound- and light-attenuated boxes equipped with fans to provide ventilation and ambient noise. A stimulus light, located above the active hole, was paired contingently with the delivery of the reinforcer.

Infusions were delivered in a volume of 23.5 µl over 2 s. MDMA was infused via a syringe that was mounted on a microinfusion pump (PHM-100A, Med-Associates, Georgia, VT, USA) and connected, via a Tygon tubing (0.96 mm o.d., Portex Fine Bore Polythene Tubing, Portex, Kent, England), to a single-channel liquid swivel (375/25, Instech Laboratories, Plymouth Meeting, PA, USA) and to the mouse intravenous catheter. The swivel was mounted on a counter-balanced arm above the operant chamber.

Surgery The mice were deeply anaesthetized with isoflurane (1.5–2.0%) and then implanted with indwelling i.v. silastic catheters in the right jugular vein, as previously described (Soria et al. 2005). Briefly, a 5-cm length of silastic tubing (0.3 mm inner diameter, 0.6 mm outer diameter) (Silastic, Dow Corning, United Kingdom) was fitted to a 22-gauge steel cannula (Scnat, England) bent at a right angle and then embedded in a cement disk (Dentalon Plus, Heraeus Kulzer, Germany) with an underlying nylon mesh. The external jugular vein was isolated, and the catheter was inserted 1.3 cm into the vein and anchored with sutures. The remaining tubing ran subcutaneously to the cannula, which exited at the mid-scapular region. All incisions were sutured and coated with antibiotic ointment (Bactroban, GlaxoSmithKline, Spain). After surgery, the animals were individually housed and allowed 4 days for recovery before the behavioural testing. The patency of the catheters was evaluated periodically (once a week), and whenever drug self-administration behaviour appeared to deviate dramatically from the one previously observed, by infusing 0.1 ml of thiopental (5 mg/ml) through

the catheter. If prominent signs of anaesthesia were not apparent within 3 s of the infusion, the animal was removed from the experiment.

Drug self-administration procedure Four days after surgery, different groups of mice were trained to nose-poke under a FR1 schedule of reinforcement in order to receive different doses of MDMA (0.06, 0.125, 0.25, 0.5 and 1.0 mg/kg/infusion) or saline during 15 days. Daily self-administration started with a priming injection of the drug, lasted for 120 min, and was conducted 6 days per week. After each session, the mice were returned to their home-cages. The number of reinforcers was limited to 50 infusions per session except for doses of 0.125 and 0.06 mg/kg/infusion, where the number of reinforcers was limited to 100 infusions per session. Each infusion was followed by a 30-s timeout period during which an active nose-poke had no consequence. The criterion for stable acquisition of self-administration behaviour was to achieve all of the following conditions: (1) less than 20% deviation from the mean of the total number of reinforcers earned in three consecutive sessions (80% stability), (2) at least 65% responding on the active hole, and (3) a minimum of five reinforcers earned per session. For the progressive ratio study, other animals were operated and were first trained to nose-poke for different doses of MDMA (0.125, 0.25 and 0.5 mg/kg/infusion) under a FR1 schedule of reinforcement. When stability had been acquired, the mice were tested on a progressive ratio schedule for the dose they were trained on. In this paradigm, the requirement to earn an injection escalated according to the following series: 1-2-3-5-12-18-27-40-60-90-135-200-300-450-675-1000. The breaking point, defined as the last ratio completed before self-administration behaviour extinguished in a 2-h session, was determined for each animal once.

Autoradiography of [³H]-mazindol binding

Twenty-four hours after the last self-administration session on day 15, the mice trained to self-administer MDMA (0 and 1.0 mg/kg/infusion) were sacrificed in order to quantitatively assess presynaptic dopamine transporter (DAT) binding sites. The [³H]-mazindol autoradiographic studies were carried out according to the protocol used by Ryan et al. (2001) with slight modifications, as previously described (Robledo et al. 2004a). Briefly, the animals were decapitated and their brains were quickly removed and frozen by immersion in 2-methyl-butane surrounded by dry ice. All samples were stored at -80°C before use. Coronal sections at 20-µm thick were cut in a cryostat and thaw-mounted on gelatine/chrome-coated slides. The sections were then pre-incubated at 4°C for 15 min in 50 mM Tris buffer (pH 7.9), containing 300 mM NaCl and 5 mM KCl, before incubation for 60 min in the same buffer containing 300 nM desipramine (Sigma Chemical, Madrid Spain) and 4 nM [³H]-mazindol (New England Nuclear, specific activity 24 Ci/mmol). Desipramine was included to block [³H]-mazindol binding to noradrenaline uptake sites. The

sections were then washed twice for 3 min in the Tris HCl pre-incubation buffer and dried under a stream of cold-dry air. To determine non-specific binding, consecutive sections were incubated in the same buffer for 60 min at 4°C with the addition of 100 µM nomifensine (Sigma Chemical, Madrid Spain). Autoradiograms were generated by apposing the labelled tissues, together with autoradiographic standards ([³H] micro-scales, Amersham), to tritium-sensitive film (Hyperfilm-³H, Amersham) for a period of 6 weeks. These were developed for 5 min at 20°C. The films were analysed and quantified with a computer-assisted video-densitometer (MCID, St. Catherine, Ontario Canada) using the standard curve generated from [³H]-standards. Specific binding measured in the entire striatum was determined by subtracting the non-specific binding image from that of total binding.

Statistical analysis

For the MDMA self-administration acquisition data, responses on the active hole were analysed using two-way ANOVAs with DOSE as a between-subjects factor, and DAY as a within-subject factor for each block of 5-day training, followed by one-way ANOVA between doses for each day and Dunnett post-hoc for comparisons with saline. The breaking point values, the data for the dose-response curve, and the intake data were analysed using one-way ANOVA followed by Dunnett post-hoc test. Biochemical studies were analysed using one-way ANOVA. Differences were considered significant if the probability of error was less than 5%.

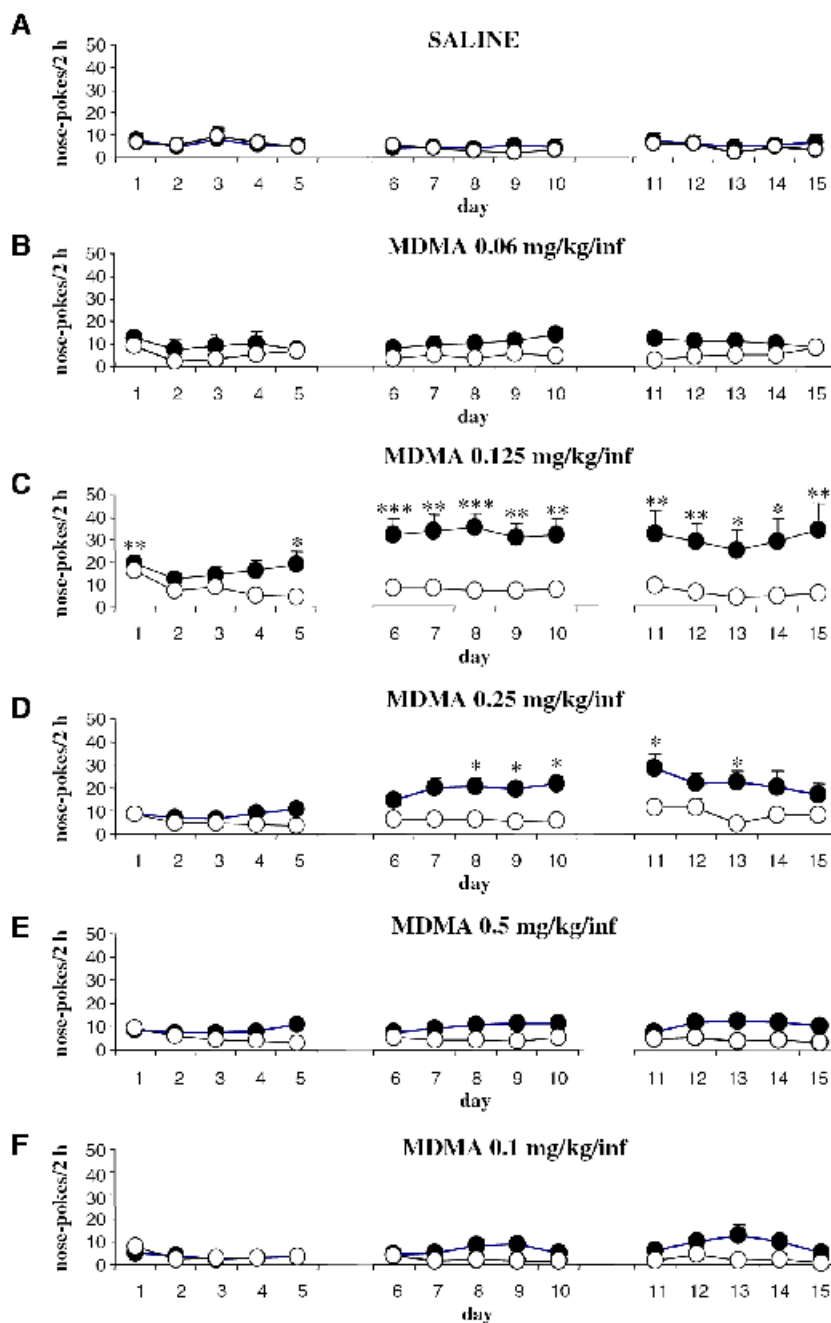
Results

Acquisition and maintenance of MDMA self-administration

Figure 1 shows the acquisition of MDMA self-administration at different doses for 15 consecutive days. The data were analysed in three blocks of 5 days each in order to maximize clarity. Because some mice were lost during the course of training, animals were added to each group until an adequate number was reached for each dose. Thus, Fig. 1 represents the data for all animals even if they did not complete 15 days of training.

During the first five sessions, some animals responding for MDMA at doses of 0.125, 0.25 and 0.5 mg/kg/infusion started to discriminate between the active and the inactive holes, and a higher percentage of animals reached stability criteria for doses of 0.125 and 0.25 mg/kg/infusion (0% at a dose of 1.0 mg/kg/infusion, 7.1% at a dose of 0.5 mg/kg/infusion, 20.8% at a dose of 0.25 mg/kg/infusion, 33.3% at a dose of 0.125 mg/kg/infusion, and 11.7% at a dose of 0.06 mg/kg/infusion). Two-way ANOVA revealed significant effects of DAY [$F(4,468)=2.637, p<0.05$] and DOSE [$F(5,117)=4.186, p<0.01$], but with no interaction between these two factors. One-way ANOVA for each day revealed a significant effect of DOSE on days 1 [$F(5,122)=7.900,$

Fig. 1 Acquisition of intravenous MDMA self-administration in drug-naïve mice. Average number of nose pokes +SEM in both the active (filled circles) and the inactive (empty circles) holes in 2-h sessions. The 15 days of acquisition are represented in three blocks of 5 days for each of the doses tested: **a** Saline: days 1–5 ($n=6$), days 6–10 ($n=6$), and days 11–15 ($n=6$); **b** 0.06 mg/kg/infusion: days 1–5 ($n=17$), days 6–10 ($n=11$), and days 11–15 ($n=9$); **c** 0.125 mg/kg/infusion: days 1–5 ($n=18$), days 6–10 ($n=16$), and days 11–15 ($n=7$); **d** 0.25 mg/kg/infusion: days 1–5 ($n=24$), days 6–10 ($n=18$), and days 11–15 ($n=6$); **e** 0.5 mg/kg/infusion: days 1–5 ($n=42$), days 6–10 ($n=25$), and days 11–15 ($n=12$); and **f** 1.0 mg/kg/infusion: days 1–5 ($n=16$), days 6–10 ($n=11$), and days 11–15 ($n=4$). * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$ vs. saline for the active hole (Dunnett post-hoc test)



$p<0.001$) and 5 [$F(5,122)=2.901$, $p<0.05$], with the animals responding at significantly higher rates for a dose of 0.125 mg/kg/infusion than for saline on days 1 ($p<0.01$) and 5 ($p<0.05$) (Fig. 1).

Throughout the second block of five sessions, animals responding for 0.06 and 1.0 mg/kg/infusion also started to discriminate between holes, and the percentage of animals reaching stability increased for all doses (27.2% at a dose of 1.0 mg/kg, 17.8% at a dose of 0.5 mg/kg, 52.6% at a

dose of 0.25 mg/kg, 70.5% at a dose of 0.125 mg/kg and 45.4% at a dose of 0.06 mg/kg). Two-way ANOVA revealed a significant effect of DOSE [$F(5,81)=8.536$, $p<0.001$], but with no significant main effect of DAY or interaction between these two factors. One-way ANOVA for each day revealed a significant effect of DOSE on days 6 to 10 (day 6 [$F(5,86)=7.633$, $p<0.001$]; day 7 [$F(5,86)=6.949$, $p<0.001$]; day 8 [$F(5,86)=7.385$, $p<0.001$]; day 9 [$F(5,86)=5.851$, $p<0.001$]; day 10 [$F(5,86)=6.065$, $p<0.001$]).

216

with the animals responding at significantly higher rates for a dose of 0.125 mg/kg/infusion than for saline on days 6 to 10 ($p < 0.01$), and for a dose of 0.25 mg/kg/infusion as compared to saline on days 8 to 10 ($p < 0.05$) (Fig. 1).

In the last block of five sessions, the percentage of animals achieving stability criteria continued to increase: 0.06 mg/kg/infusion (66.6%), 0.125 mg/kg/infusion (80%), 0.25 mg/kg/infusion (100%), 0.5 mg/kg/infusion (47%), and 1.0 mg/kg/infusion (83.3%). Two-way ANOVA revealed a significant effect of DOSE [$F(5,38)=4.354$, $p < 0.01$], but with no significant main effect of DAY or interaction between these two factors. One-way ANOVA for each day revealed a significant effect of DOSE on days 11, 12, 14 and 15 (day 11 [$F(5,43)=5.433$, $p < 0.01$]; day 12 [$F(5,43)=3.264$, $p < 0.05$]; day 14 [$F(5,43)=2.391$, $p < 0.05$]; day 15 [$F(5,43)=3.550$, $p < 0.01$]), with the animals responding at significantly higher rates for a dose of 0.125 mg/kg/infusion than for saline on days 11 to 15 ($p < 0.01$ and $p < 0.05$ at days 11, 12, 15 and 13, 14, respectively), and for a dose of 0.25 mg/kg/infusion as compared to saline on day 11 and 13 ($p < 0.05$) (Fig. 1).

The average number of sessions required to achieve stability criteria varied as a function of the dose, such that fewer number of sessions were needed for animals acquiring MDMA self-administration at intermediate doses (Mean±SEM=5.58±0.63 and 6.27±0.71, for doses of 0.125 and 0.25 mg/kg/infusion, respectively), and more sessions were needed for animals acquiring MDMA self-administration at lower doses (Mean±SEM=7.33±1.35 at a dose of 0.06 mg/kg/infusion) and higher doses (Mean±SEM=8.0±1.38 and 9.40±0.68 at doses of 0.5 and 1.0 mg/kg/infusion, respectively).

Table 1 presents the number of infusions taken on each day by those animals that completed 15 days of self-administration. The statistical analysis performed for each

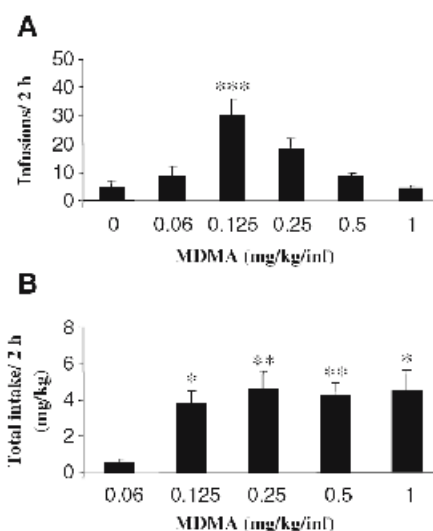


Fig. 2 The data represent the average number of infusions (a), and the total MDMA intake (b) in animals trained with different doses of MDMA (0, 0.06, 0.125, 0.25, 0.5 and 1.0 mg/kg/infusion) on day 7 of acquisition±SEM. In (a), **** $p < 0.001$ vs. saline. In (b) * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. 0.06 mg/kg/infusion (Dunnett post-hoc test)

block of 5 days showed similar results to those obtained for all animals shown in Fig. 1.

Figure 2a shows the dose-response curve in a 2-h session at day 7, where most doses supported discrimination between the active and the inactive holes. The total MDMA intake in a 2-h session on day 7 is shown in Fig. 2b for all the MDMA doses tested. A significant effect of dose was revealed [$F(4,80)=3.01$, $p < 0.05$] and post-hoc analysis showed significant differences between doses of 0.125,

Table 1 Mean number of infusions for each day earned by the group of animals that completed the full 15 days

	Saline (N=6)	MDMA 0.06 mg/kg/infusion (N=9)	MDMA 0.125 mg/kg/infusion (N=7)	MDMA 0.25 mg/kg/infusion (N=7)	MDMA 0.5 mg/kg/infusion (N=12)	MDMA 1 mg/kg/infusion (N=4)
Day 1	7.83±2.74	12.89±3.32	18.57±4.20*	11.00±3.36	8.50±1.19	5.50±2.53
Day 2	4.50±2.17	3.78±0.86	13.14±4.17*	7.83±3.03	7.67±1.36	3.00±0.40
Day 3	8.00±3.94	3.89±1.22	15.14±4.46	9.33±4.04	7.25±1.50	1.00±0.00
Day 4	5.66±2.31	5.22±1.47	14.86±5.12	14.17±5.92	5.83±1.18	1.50±0.28
Day 5	5.66±2.60	7.00±1.72	21.00±9.57*	16.33±4.37	6.33±1.66	2.00±0.70
Day 6	4.33±1.78	8.11±2.56	28.43±9.22**	22.17±5.08*	4.92±0.60	3.00±0.57
Day 7	4.66±1.80	10.22±3.91	34.29±11.77***	26.17±6.26*	6.25±1.32	3.50±1.25
Day 8	4.00±2.44	7.89±2.48	33.86±10.19**	24.00±6.46*	7.25±1.88	7.00±3.34
Day 9	5.16±2.49	10.44±3.01	24.67±11.52*	21.50±5.10	8.58±2.54	9.25±4.25
Day 10	5.00±3.10	11.00±2.25	32.57±12.06**	26.67±6.11*	8.25±2.07	6.00±2.16
Day 11	7.50±3.50	11.22±2.48	29.00±8.71**	26.50±5.09*	6.83±1.75	5.75±1.37
Day 12	6.50±3.23	10.56±2.20	25.86±7.17**	20.33±3.96	11.00±2.78	9.25±1.49
Day 13	5.00±2.23	10.22±2.09	22.14±8.15*	20.83±4.25*	11.42±2.72	11.75±3.88
Day 14	5.50±2.74	9.33±2.06	25.57±9.31*	18.83±6.32	11.25±2.04	9.00±1.08
Day 15	7.00±3.62	7.89±1.25	30.29±10.52**	15.67±4.78	9.67±1.95	4.50±2.53

The number of animals in each group is shown in parenthesis
* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ vs. saline (Dunnett post-hoc test)

0.25, 0.5 and 1.0 mg/kg/infusion with respect to 0.06 mg/kg/infusion ($p < 0.05$, Dunnett).

Figure 3 shows representative patterns of responding by separate mice for the different doses of MDMA tested (0, 0.06, 0.125, 0.25, 0.5 and 1.0 mg/kg/infusion) in a 2-h session on day 7 of self-administration (FR1 schedule of reinforcement). The inter-response interval for MDMA self-administration showed a dose-dependent effect, being shorter for doses of 0.125 and 0.25 mg/kg/infusion than for low (0.06 mg/kg/infusion) and high (1.0 mg/kg/infusion) doses.

Progressive ratio paradigm

Figure 4 shows the breaking points achieved by mice responding on a progressive ratio schedule of reinforcement for the different doses of MDMA tested (0.125, 0.25 and 0.5 mg/kg/infusion). One-way ANOVAs showed a significant effect of the dose [$F(2,18) = 8.6, p < 0.01$], and post-hoc analysis revealed a significant difference between doses of 0.125 and 0.25 mg/kg/infusion compared to a dose of 0.5 mg/kg/infusion ($p < 0.05$, Dunnett).

Autoradiography of [^3H]-mazindol binding

In order to quantitatively assess presynaptic dopamine transporter (DAT) binding sites, the mice self-administering MDMA (1.0 mg/kg/infusion) or saline during 15 days

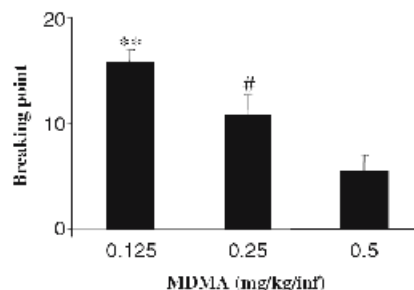
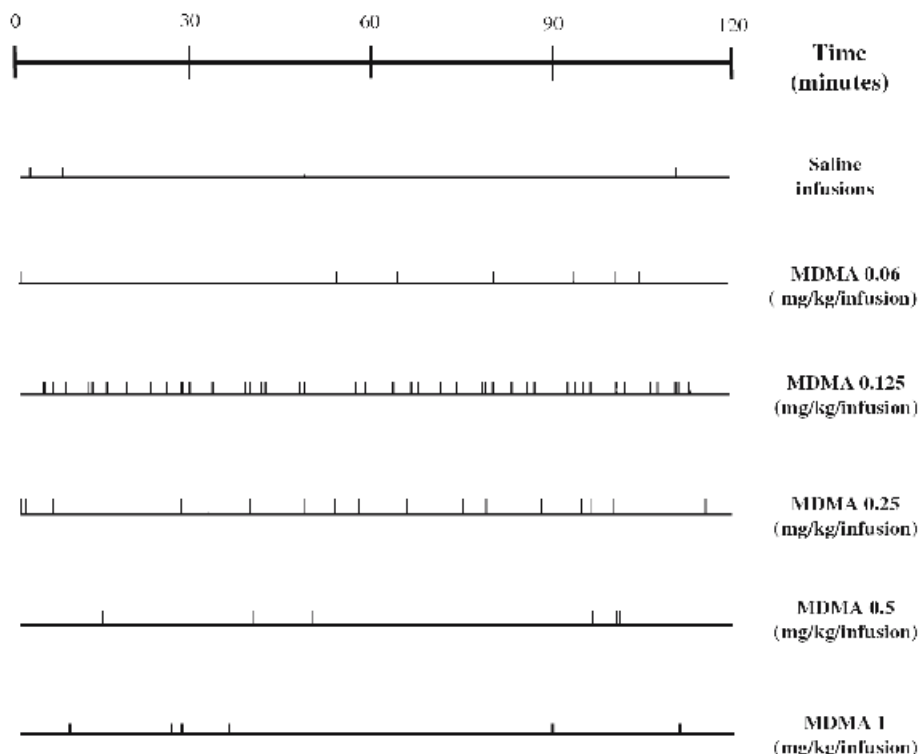


Fig. 4 MDMA self-administration under a progressive ratio schedule of reinforcement. The data represent the breaking points achieved with different doses of MDMA [0.125 ($n=5$), 0.25 ($n=6$) and 0.5 ($n=6$) mg/kg/infusion]+SEM. *** $p < 0.01$, 0.125 mg/kg/infusion vs. 0.5 mg/kg/infusion, # $p < 0.05$, 0.25 mg/kg/infusion vs. 0.5 mg/kg/infusion (Dunnett post-hoc test)

were sacrificed 1 day after the last self-administration session. The levels of [^3H]-mazindol binding in the striatum of animals self-administering saline (106.93 ± 3.18 fmol/mg, $n=6$) were similar to those obtained in previous studies in our laboratory. Thus, in two separate experiments, the animals treated with saline chronically for 4 or 6 days show levels of 80.74 ± 7.71 and 88.5 ± 9.7 fmol/mg, respectively. No significant differences were observed between the saline group and the group self-administering MDMA at a dose of 1.0 mg/kg/infusion (99.50 ± 9.32 fmol/mg, $n=4$) ($p > 0.05$), indicating that MDMA self-administration under these conditions does not produce neurotoxicity to DAT.

Fig. 3 Representative patterns of MDMA self-administration from animals responding for the different doses of MDMA (0, 0.06, 0.125, 0.25, 0.5 and 1.0 mg/kg/infusion) on day 7 of training. Each vertical line represents one active nose-poke during a 2-h session.



Discussion

In this study, we show for the first time that it is possible to establish a reliable model of intravenous MDMA self-administration in drug-naïve mice. Dose-dependent effects were observed for acquisition of operant responding under a fixed ratio schedule of reinforcement, and for the breaking points obtained in a progressive ratio schedule.

Previous studies have shown that rats (Ratzenboeck et al. 2001; Schenk et al. 2003) and non-human primates (Beardsley et al. 1986; Lamb and Griffiths 1987; Fantegrossi et al. 2002, 2004) acquire MDMA self-administration behaviour. However, some important differences between experiments performed in monkeys and the present study in mice should be pointed out. For instance, monkeys were either trained first on cocaine and had MDMA substituted afterwards, or were maintained on cocaine while MDMA self-administration was evaluated. In contrast, our experiments were carried out in naïve mice. This is an important issue since the reinforcing properties of drugs of abuse may be affected by previous experience with other drugs (Young et al. 1981; Pierre and Vezina, 1997; Lorrain et al. 2000). However, in subsequent self-administration studies performed in rats, MDMA was self-administered by naïve as well as by cocaine-experienced rats (Ratzenboeck et al. 2001; Schenk et al. 2003). These data indicate that no previous "sensitization" of reward mechanisms is necessary for establishing MDMA self-administration in rats. An important difference we found in mice with respect to rats had to do with the temporal pattern of responding for each dose. In our experiments, we did not observe the "loading" phenomenon seen in rats (Schenk et al. 2003), rather, responses were mostly spread out during 2 h. In addition, during 15 days of MDMA self-administration, no overt changes in the pattern or the rate of responding were observed, indicating the lack of acute tolerance or sensitization to the reinforcing properties of MDMA in mice. Regarding the average drug intake per session, it is interesting to note that the mice adjusted the rate of responding for each reinforcing dose to obtain an average amount of 5 mg/kg, whereas in rats the total amount of drug intake at any given dose was four times higher (20 mg/kg) in the same time period (Schenk et al. 2003). The differences observed in the total effective amount of MDMA intake between rats and mice could be due to species differences with respect to the pharmacokinetics of MDMA (Lim et al. 1992). Interestingly, the average single-session intake of MDMA in monkeys (2 or 3 mg/kg in 1-h sessions) has been reported to be more like the one observed in mice (Fantegrossi et al. 2004).

In the current study, a dose-response curve was established for the acquisition of operant responding in different groups of untrained mice, while in previous studies with rats and monkeys, the dose-response curves were obtained once the animals had acquired self-administration of a training dose. Such an approach has the limitation of training animals with a high dose, which may influence the rate of responding for subsequent low doses. The present experimental model may be useful for future experiments intended to evaluate the neurobiological mechanism in-

involved in the acquisition of MDMA self-administration, in particular when using genetically modified mice. Under these conditions, dose-dependent effects for the acquisition of MDMA self-administration were evidenced in several different parameters. First of all, the rate of responding observed was inversely proportional to the dose of MDMA tested. Thus, similar to what has been shown for self-administration of other psychostimulants such as cocaine, MDMA exhibited an inverted U dose-effect curve, with doses of 0.125 and 1.0 mg/kg/infusion producing the highest and lowest rate of responding, respectively. Unexpectedly, however, the number of sessions required for achieving acquisition criteria was greater in mice responding for the highest dose of 1.0 mg/kg/infusion than for those responding for intermediate doses (0.125 and 0.25 mg/kg/infusion). In addition, the percentage of mice acquiring stability was less for high than for intermediate doses of MDMA. These findings contrast with previous studies carried out in our laboratory with cocaine in mice where self-administration with high doses (1.0 mg/kg/infusion) was acquired faster and more efficiently than with low doses (0.32 mg/kg/infusion) (Soria et al. 2005). Although the specific pharmacokinetic properties of MDMA, such as its long-lasting effects, may contribute to the low rates of responding observed with high doses, it is also possible that the pharmacodynamics of MDMA may differ depending on the dose. In this regard, drug discrimination studies in rats have shown that high doses of MDMA (1.5 and 2.0 mg/kg) generalized more to the norfenfluramine-appropriate lever, whereas low doses (0.125 mg/kg) generalized more to the amphetamine-appropriate levers (Schechter 1997). These findings suggest that low doses of MDMA may produce more "dopaminergic-like" behavioural effects. In agreement, our results showing that animals acquire responding for low doses of MDMA faster and more efficiently than for higher doses support a main role of the dopaminergic system in the acquisition of MDMA self-administration. However, at present there are no clear data available in monkeys or rats to support this contention since the reinforcing potency of different doses of MDMA has not been tested in untrained animals. In addition, very few systematic studies evaluating the role of different neurotransmitter systems in the reinforcing or incentive properties of MDMA exist. One study in rats shows that the dopamine D1 antagonist, SCH 23390, produces a rightward shift in the dose-response curve for MDMA self-administration (Daniela et al. 2004). In monkeys, the effects of serotonin 5-HT_{2A} antagonists have been evaluated on the dose-response curve for each MDMA stereoisomer separately, but not for the racemic compound (Fantegrossi et al. 2002). Thus, further experiments are necessary in order to fully understand how these two neurotransmitter systems modulate the acquisition and maintenance of MDMA self-administration in experimental animals.

When the motivational strength of the different doses of MDMA was evaluated with the progressive ratio paradigm, the breaking points achieved were found to be inversely proportional to the dose of MDMA tested (0.125 mg/kg/infusion, BP=15.6±1.46; 0.25 mg/kg/infusion, BP=10.66±

2.02; and 0.5 mg/kg/infusion, $BP=5.75\pm 1.42$) indicating that mice were more motivated to obtain lower than higher doses of MDMA. This was also a surprising result since the amount of work that the mice are willing to perform in the progressive ratio paradigm to seek cocaine appears to be directly proportional to the dose tested, i.e. for the highest dose tested (1 mg/kg/infusion), the mice completed approximately twice as many ratios than for the lowest dose tested (0.25 mg/kg/inf) (Colby et al. 2003). One possible explanation for these discrepancies is that cocaine and MDMA have different pharmacokinetic profiles. In this sense, both linear and non-linear kinetics have been observed for cocaine (Mets et al. 1999), while non-linear pharmacokinetics has been suggested for MDMA (de la Torre et al. 2000). Thus, it may be possible that high doses of MDMA accumulate more than high doses of cocaine, and could potentially reduce responding due to some adverse effects. Alternatively, the discrepancies observed between cocaine and MDMA may be due to differences in their pharmacodynamic profile. Thus, the behavioural effects of these two substances may diverge because of a differential activation of serotonergic, dopaminergic, and/or noradrenergic neurotransmitter systems. Interestingly, in drug discrimination studies cocaine and MDMA show asymmetric generalization (Khorana et al. 2004). These data, as well as our observations showing differences between MDMA and cocaine as to the dose-effect pattern for the speed of acquisition and for the motivation to seek the drug, may be related to differential modulation of these three neurotransmitters.

Repeated administration of MDMA has been shown to produce serotonergic neurotoxicity in several animal species (for review see Green et al. 2003). In mice, it is well established that MDMA induces more prominent dopaminergic than serotonergic neurotoxicity (Colado et al. 2001; O'Shea et al. 2001; Itzhak et al. 2003). In order to verify that prolonged exposure to self-administered MDMA did not damage dopaminergic terminals, we performed autoradiography experiments. These experiments evaluated the possible changes in [3 H]-mazindol binding in the striatum of mice self-administering the highest dose of MDMA tested (1.0 mg/kg) during the entire period of 15 days (average daily intake of 5 mg/kg). No neurotoxicity to DAT was evidenced in these animals as compared to those mice self-administering saline for 15 days. These findings are in line with a recent study in monkeys showing that low doses of MDMA self-administered for extended periods of time do not produce dopaminergic or serotonergic neurotoxicity (Fantegrossi et al. 2004).

In summary, the current experiments show, for the first time, that MDMA can be reliably self-administered by naïve mice. We also show that mice acquire self-administration of low doses more readily than of higher doses, and that low doses of MDMA show greater motivational strength than higher doses do. These findings provide the opportunity of using this mouse model of MDMA self-administration in future research concerning the neurobiological substrates involved in this behaviour.

Acknowledgements The authors would like to thank Dr. Fernando Berrendero for his expert help in the autoradiography experiments. This work was supported by FIS grant number 03/0305, Redes del Instituto de Salud Carlos III (C03/06 and G03/05), Marató de TV3, Generalitat de Catalunya 2002SGR00193 and European Commission grant number OJ 2003/C164-005166. FP and JMI contributed equally to this work.

References

- Beardsley PM, Balster RL, Harris LS (1986) Self-administration of methylenedioxyamphetamine (MDMA) by rhesus monkeys. *Drug Alcohol Depend* 18:149–157
- Bilsky EJ, Hubbell CL, Delconte JD, Reid LD (1991) MDMA produces a conditioned place preference and elicits ejaculation in male rats: a modulatory role for the endogenous opioids. *Pharmacol Biochem Behav* 40:443–447
- Bilsky EJ, Montegut MJ, Nichols ML, Reid LD (1998) CGS 10746B, a novel dopamine release inhibitor, blocks the establishment of cocaine and MDMA conditioned place preferences. *Pharmacol Biochem Behav* 59:215–220
- Castañé A, Berrendero F, Maldonado R (2005) The role of the cannabinoid system in nicotine addiction. *Pharmacol Biochem Behav* (in press)
- Colado MI, Camarero J, Mechan AO, Sanchez V, Esteban B, Elliott JM, Green AR (2001) A study of the mechanisms involved in the neurotoxic action of 3,4-methylenedioxyamphetamine (MDMA, "ecstasy") on dopamine neurons in mouse brain. *Br J Pharmacol* 134:1711–1723
- Colby CR, Whisler K, Staffen C, Nestler EJ, Self DW (2003) Striatal cell type-specific overexpression of DeltaFosB enhances incentive for cocaine. *J Neurosci* 23:2488–2493
- Cole JC, Sumnall HR (2003) The pre-clinical behavioural pharmacology of 3,4-methylenedioxyamphetamine (MDMA). *Neurosci Biobehav Rev* 27:199–217
- Daniela E, Brennan K, Gittings D, Holy L, Schenk S (2004) Effect of SCII 23390 on (+)-3,4-methylenedioxyamphetamine hyperactivity and self-administration in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 77:745–750
- de la Torre R, Farré M, Ortuno J, Mas M, Brenneisen R, Roset PN, Segura J, Camí J (2000) Non-linear pharmacokinetics of MDMA ("ecstasy") in humans. *Br J Clin Pharmacol* 49:104–109
- Fantegrossi WB, Ullrich T, Rice KC, Woods JH, Winger G (2002) 3,4-Methylenedioxyamphetamine (MDMA, "ecstasy") and its stereoisomers as reinforcers in rhesus monkeys: serotonergic involvement. *Psychopharmacology (Berl)* 161:356–364
- Fantegrossi WB, Woolverton WT, Kilbourn M, Sherman P, Yuan J, Pätzidimitriou G, Ricaurte GA, Woods JH, Winger G (2004) Behavioural and neurochemical consequences of long-term intravenous self-administration of MDMA and its enantiomers by rhesus monkeys. *Neuropsychopharmacology* 29:1270–1281
- Fletcher PJ, Korth KM, Robinson SR, Baker GB (2002) Multiple 5-HT receptors are involved in the effects of acute MDMA treatment: studies on locomotor activity and responding for conditioned reinforcement. *Psychopharmacology (Berl)* 62:282–291
- Green AR, Mechan AO, Elliott JM, O'Shea E, Colado MI (2003) The pharmacology and clinical pharmacology of 3,4-methylenedioxyamphetamine (MDMA, "ecstasy"). *Pharmacol Rev* 55:463–508
- Hall FS, Sora I, Drzonova J, Li XF, Goeb M, Uhl GR (2004) Molecular mechanisms underlying the rewarding effects of cocaine. *Ann NY Acad Sci* 1025:47–56
- Travani MM, Asari D, Patel J, Wiczorek WJ, Kruk ZI (2000) Direct effects of 3,4-methylenedioxyamphetamine (MDMA) on serotonin or dopamine release and uptake in the caudate putamen, nucleus accumbens, substantia nigra reticulata, and the dorsal raphe nucleus slices. *Synapse* 36:275–285

- Itzhak Y, Ali SF, Achat SN, Anderson KL (2003) Relevance of MDMA ("ecstasy") induced neurotoxicity to long-lasting psychomotor stimulation in mice. *Psychopharmacology (Berl)* 166:241–248
- Kankaampää A, Meririnne E, Lillsunde P, Seppala T (1998) The acute effects of amphetamine derivatives on extracellular serotonin and dopamine levels in rat nucleus accumbens. *Pharmacol Biochem Behav* 59:1003–1009
- Khorana N, Pullagurta MR, Young R, Glennon RA (2004) Comparison of the discriminative stimulus effects of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) and cocaine: asymmetric generalization. *Drug Alcohol Depend* 74:281–287
- Lamb RJ, Griffiths RR (1987) Self-injection of *d,l*-3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) in the baboon. *Psychopharmacology (Berl)* 91:268–272
- Lim HK, Zeng S, Choi DM, Foltz RL (1992) Comparative investigation of disposition of 3,4-(methylenedioxy)methamphetamine (MDMA) in the rat and the mouse by a capillary gas chromatography–mass spectrometry assay based on perfluorotributylamine-enhanced ammonia positive ion chemical ionization. *J Pharm Biomed Anal* 10:657–665
- Lorain DS, Arnold GM, Vezina P (2000) Previous exposure to amphetamine increases incentive to obtain the drug: long-lasting effects revealed by the progressive ratio schedule. *Behav Brain Res* 107:9–19
- Maldonado R (2003) Molecular biology of drug addiction. Humana, Totowa, New Jersey, p 346
- Marona-Lewicka D, Rice GS, Sprague JE, Nichols DE (1996) Reinforcing effects of certain serotonin-releasing amphetamine derivatives. *Pharmacol Biochem Behav* 53:99–105
- Mets B, Diaz J and Jamdar S (1999) Cocaine, norcocaine, ecgonine methylester and benzoylecgonine pharmacokinetics in the rat. *Life Sci* 65:1317–1328
- O'Shea L, Esteban B, Camarero J, Green AR, Colado MI (2001) Effect of GBR 12909 and fluoxetine on the acute and long term changes induced by MDMA ("ecstasy") on the 5-HT and dopamine concentrations in mouse brain. *Neuropharmacology* 40:65–74
- Parrott AC (2001) Human psychopharmacology of Ecstasy (MDMA): a review of 15 years of empirical research. *Hum Psychopharmacol* 16:557–577
- Parrott AC (2005) Chronic tolerance to recreational MDMA (3,4-methylene-dioxymethamphetamine) or Ecstasy. *J Psychopharmacol* 19:71–83
- Picre PJ, Vezina P (1997) Predisposition to self-administer amphetamine: the contribution of response to novelty and prior exposure to the drug. *Psychopharmacology (Berl)* 129:277–284
- Ratzenboeck T, Saria A, Kriechbaum N, Zernig G (2001) Reinforcing effects of MDMA ("ecstasy") in drug-naïve and cocaine-trained rats. *Pharmacology* 62:138–144
- Robledo P, Balerio G, Berrendero F, Maldonado R (2004a) Study of the behavioural responses related to the potential addictive properties of MDMA in mice. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 369:338–349
- Robledo P, Mendizabal V, Ortuno J, de la Torre R, Kieffer BL, Maldonado R (2004b) The rewarding properties of MDMA are preserved in mice lacking mu-opioid receptors. *Eur J Neurosci* 20:853–858
- Rocha BA (2003) Stimulant and reinforcing effects of cocaine in monoamine transporter knockout mice. *Eur J Pharmacol* 479:107–115
- Ryan RF, Ross SA, Drago J, Loiacono RF (2001) Dose-related neuroprotective effects of chronic nicotine in 6-hydroxydopamine treated rats, and loss of neuroprotection in α_4 nicotinic receptor subunit knockout mice. *Br J Pharmacol* 132:1650–1656
- Salzmann J, Marie-Claire C, Le Guen S, Roques BP, Noble F (2003) Importance of ERK activation in behavioral and biochemical effects induced by MDMA in mice. *Br J Pharmacol* 140:831–838
- Schechter MD (1997) Drug–drug discrimination: stimulus properties of drugs of abuse upon a serotonergic dopaminergic continuum. *Pharmacol Biochem Behav* 56:89–96
- Schenk S, Gittings D, Johnstone M, Daniela E (2003) Development, maintenance and temporal pattern of self-administration maintained by ecstasy (MDMA) in rat. *Psychopharmacology (Berl)* 169:21–27
- Schumann G, Spanagel R, Mann K (2003) Candidate genes for alcohol dependence: animal studies. *Alcohol Clin Exp Res* 27:880–888
- Soria G, Mendizabal V, Touriño C, Robledo P, Ledent C, Parmentier M, Maldonado R, Valverde O (2005) Lack of CB-1 cannabinoid receptor impairs cocaine self-administration. *Neuropsychopharmacology* 30:1670–1680
- Valverde O, Robledo P, Maldonado R (2004) Involvement of the endogenous opioid system in cannabinoid-induced responses. *Curr Med Chem* 4:183–193
- White SR, Obradovic T, Inzel KM, Wheaton MJ (1996) The effects of methylenedioxymethamphetamine (MDMA, "Ecstasy") on monoaminergic neurotransmission in the central nervous system. *Prog Neurobiol* 49:455–479
- Yamamoto BK, Spanos LJ (1988) The acute effects of methylenedioxymethamphetamine on dopamine release in the awake-behaving rat. *Eur J Pharmacol* 148:195–203
- Young AM, Herling S, Woods JH (1981) History of drug exposure as a determinant of drug self-administration. *NIDA Res Monogr* 37:75–88

*Breath it in and breath it out
and pass it on it's almost out
We're so creative and so much more
We're high above, but on the floor*

*It's not a habit, it's cool
I feel alive
If you don't have it your on
the other side*

*The deeper you stick it in your vein
The deeper the thoughts there's no more pain
I'm in heaven, I'm a god
I'm everywhere, I feel so hot*

*It's not a habit, it's cool
I feel alive
If you don't have it your on
the other side
I'm not an addict (maybe that's a lie)*

*Oohoo, Oohoo, Oohoo, Oohoo,
Oohoo, Oohoo, Oohoo Oohoo*

*It's over now, I'm cold, alone
I'm just a person on my own
Nothing means a thing to me
Oh, nothing means a thing to me*

*It's not a habit, it's cool
I feel alive
If you don't have it your on
the other side
I'm not an addict (maybe that's a lie)*

*Free me, leave me
Watch me as I'm going down
Free me, see me
Look at me I'm falling
And I'm falling.....*

*It is not a habit, it is cool
I feel alive I feel.....
It is not a habit, it is cool
I feel alive*

I'm not an addict, I'm not an addict, I'm not an addict.

Not and addict. K's Choice

This document was created with Win2PDF available at <http://www.daneprairie.com>.
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.