

Participación de los receptores cannabinoides CB1 en la reinstalación de la preferencia condicionada a cocaína inducida por estrés en ratas: influencia en la homeostasis de glutamato en Núcleo Accumbens

TESIS DE DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

Bióloga Andrea Susana Guzmán

Departamento de Farmacología
Facultad de Ciencias Químicas
Universidad Nacional de Córdoba

IFEC-CONICET

Argentina

- 2021-

DIRECTORA DE TESIS

Dra. Liliana M. Cancela

MIEMBROS DE LA COMISIÓN ASESORA DE TESIS

Dra. Miriam B. Virgolini

Dra. Silvia Correa

Dra. Paula Abate

EVALUADORA EXTERNA

Dra. Cecilia Scorza

El presente trabajo de tesis ha sido realizado en el Instituto de Farmacología Experimental de Córdoba (IFEC) perteneciente al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Departamento de Farmacología de la Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba, de acuerdo a la reglamentación vigente en dicha facultad para optar por el título de Doctor/ra en Ciencias Químicas.

Durante la ejecución de este trabajo, la autora fue beneficiada con una beca doctoral de 5 años por parte de CONICET, durante el periodo 2014-2019. A partir de tu admisión en la carrera de doctorado en Ciencias Químicas, en abril 2015, la autora cumplimentó satisfactoriamente con todos los requisitos necesarios para la obtención del título, habiendo realizado todos los cursos requeridos y se desempeñándose destacadamente como Profesora Asistente en el Departamento de Farmacología desde el año 2015 hasta la fecha.

Para la realización del presente trabajo de tesis, el grupo de investigación contó con el apoyo financiero de subsidios otorgados por CONICET, la Secretaria de Ciencia y Tecnología de la Universidad Nacional de Córdoba (SECyT-UNC), la Agencia Nacional de Promoción Científica y Técnica (FONCyT) y el Ministerio de Ciencia y Tecnología de Córdoba (MINCyT).

Los resultados del presente trabajo de tesis fueron publicados en una revista revisada por pares, de acceso libre. A continuación se indican también los trabajos realizados en colaboración por parte de la tesista:

- **Guzman AS**, Avalos MP, De Giovanni LN, Euliarte PV, Sanchez, M, Rigoni D, Mongi Bragato B, Virgolini MB, Bollati FA, Cancela LM. CB1R activation in nucleus accumbens core promotes stress-induced reinstatement of cocaine seeking by elevating extracellular glutamate in a drug-paired context. *Sci Rep* 11, 12964 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-92389-4>
- Avalos MP, **Guzmán AS**, Rigoni D, Gorostiza EA, Sanchez MA, Mongi-Bragato B, García-Keller C, Perassi EM, Virgolini MB, Peralta-Ramos JM, Iribarren P, Calfa GD, Bollati FA, Cancela LM. Minocycline prevents chronic restraint stress-induced vulnerability to developing cocaine self-administration and associated glutamatergic mechanisms: a potential role of microglia. Manuscrito enviado a la revista *Brain Behav Immun* (2021). En revisión.
- Rigoni D, Avalos MP, Boezio MJ, **Guzman AS**, Calfa GD, Perassi EM, Pierotti SM, Bisbal M, García-Keller C, Cancela LM, Bollati F. Stress-induced vulnerability to develop cocaine addiction depends on cofilin modulation. *Neurobiol Stress* 15, 100349 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.ynstr.2021.100349>
- Avalos MP, **Guzman AS***, García-Keller C*, Esparza MA, Rigoni D, Mongi-Bragato B, Calfa G, Bollati, F, Cancela L.M. Chronic restraint stress -induced persistent enhancement of cocaine-induced dopamine overflow and impairment of glutamate homeostasis in nucleus accumbens core but not shell. **igual contribución*. Manuscrito en preparación.

- Mongi-Bragato B, Ávalos MP, **Guzman AS**, García-Keller C, Bollati F, Cancela LM. Endogenous enkephalin is necessary for cocaine-induced alteration in glutamate transmission within the nucleus Accumbens. *Eur J Neurosci* 53,1441 (2020) <https://doi.org/10.1111/ejn.15035>
- Mongi-Bragato B, Ávalos MP, **Guzman AS**, Bollati F, Cancela LM. Enkephalin as a Pivotal Player in Neuroadaptations Related to Psychostimulant Addiction. *Frontiers in Psychiatry* 9,222 (2018) <https://doi.org/10.3389/fpsy.2018.00222>
- De Giovanni LN, **Guzman AS**, Virgolini MB, Cancela LM. NMDA antagonist MK 801 in nucleus accumbens core but not shell disrupts the restraint stress-induced reinstatement of extinguished cocaine-conditioned place preference in rats”. *Behav Brain Res* 315, 150-9 (2016). <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2016.08.011>

AGRADECIMIENTOS

- A mi directora, Dra. Liliana Cancela, por el apoyo y por permitirme desarrollar mi trabajo junto a su excelente grupo de trabajo, pero sobre todo por permitirme aprender y crecer junto a ella. Gracias por la confianza, los consejos, la paciencia y el respeto.

- A las Doctoras que integran la Comisión Asesora, por guiarme a lo largo de todas las reuniones y revisar el manuscrito. Gracias por sus aportes, su tiempo y predisposición.

- A Cecilia Scorza por su valioso tiempo dedicado a evaluar este trabajo.

- Al Dpto. de Farmacología e IFEC por brindarme el espacio para la realización de esta tesis.

- A CONICET, SECyT y FONCyT por el apoyo económico brindado.

- A la Facultad de Ciencias Químicas por crear un espacio confortable, serio y prestigioso que potencia nuestras capacidades y nuestro crecimiento profesional.

- A la Universidad Nacional de Córdoba, pública y gratuita. El mejor lugar que podría haber elegido y que me hizo crecer en muchos aspectos de mi vida.

- A la Sociedad Argentina de Neurociencias por el espacio brindado para presentar nuestros trabajos, establecer vínculos y crecer en este campo.

- Al los integrantes de los grupos de Jóvenes Investigadores en Neurociencias y Neurociencias de los Sentidos por la motivación e inspiración para dejar nuestro granito de arena en la sociedad.

- Al equipo del LIADE, en especial a Juan Cruz y Ezequiel, quienes tuvieron siempre buena predisposición para solucionar cualquier inconveniente con el aparato de CPP.

- Al “grupito Cancela”, Pauli, Pía, Flavia, Dai, Betha, Mari y Juli por su apoyo, por aconsejarme, escucharme, ayudarme y tenerme paciencia. También a Coty que nunca nos soltó la mano, incluso estando muy lejos. Y a Lauri, quien me ayudó y enseñó con mucha paciencia a trabajar en este proyecto.

- A toda la familia de Farmacología, por hacer más amenos todos los días de trabajo en el laboratorio, por su alegría, buena onda y todos los consejos. Lxs directivos, lxs profes regulares, y en especial al Docs Team, el original y el actual también.

- A todo el cuerpo docente de las materias de Farmacología y Toxicología, por crear y mantener un grupo de trabajo agradable. Gracias por su enseñanza constante.

- A quienes compartí tareas de gestión, Romi, Pedro, Silvia y Dani, gracias por el apoyo, la escucha y la enseñanza constante.

- A lxs técnicxs de laboratorio, Estela, Lorena y Leandro, siempre dispuestxs a ayudar y a aconsejar.

- A lxs chicxs del bioterio, Javi, Nico, Yani y Walter por mantener en buenas condiciones a nuestros animales y el lugar de trabajo, y por su buena onda de todos los días.

- A lxs secretarixs, Silvi, María José y Pedro, por la buena predisposición, ayuda y buena onda.

- Un agradecimiento más que especial a mi *labmate* y amiga Pauli, en quien encontré apoyo e inspiración. Este logro es, en gran parte, por su ayuda incondicional.

- A Pía, quién confió siempre en mí, más que yo misma. Gracias por escucharme, ayudarme y aguantar mis retos.

- A Mari, la *labmate* más divertida y dulce, que ayudó muchísimo en esta tesis también.

- A Leo, por su enorme colaboración con el HPLC. Gracias por la buena predisposición y la amistad también.

- A Flavia, Dai y Juli, que me enseñaron Western Blot, que si bien no pudimos terminar esos experimentos aún, estoy súper agradecida por su paciencia y ayuda.

- A mis amigxs, Xime, Sofi, Adri, Aldi, Leda, Romi, Lugi, Jose, Dani, Shofi, Flori, Vane, Carlita y las biolocas. Tengo mucha suerte de tenerlxs en mi vida. Siempre me escucharon, me contuvieron y estuvieron en las buenas y en las malas. ¡Lxs quiero mucho!

- A la danza, que me salvó.

- A mi familia, mis abuelas, tíxs, primxs, y hasta las mascotas!, son mi motor. En especial al Grupo Sarulero y la Sarulera mayor, mis lingotes de oro.

- A Benja, mi compañero incondicional. Gracias por tanto amor y por ser mi sostén.

- A mis padres Susana y Héctor, mi hermana Araceli, y mi perra Niza, simplemente Gracias por Todo. Son mi razón principal para no bajar los brazos, mi apoyo incondicional. Gracias por estar, motivarme, contenerme y darle alegría a mi vida.

A todos y todas, ¡*MUCHAS GRACIAS!*

INDICE

ABREVIATURAS	1
RESUMEN	4
INTRODUCCIÓN	10
MARCO CONCEPTUAL PARA ADICCIÓN A COCAÍNA	11
Recaída	12
Recaída inducida por estrés	14
REINSTALACIÓN: MODELO ANIMAL DE RECAÍDA	15
Reinstalación inducida por estrés	17
Reinstalación inducida por estrés bajo el paradigma de preferencia condicionada a un lugar asociado a cocaína	20
NEUROBIOLOGÍA DE LA ADICCIÓN A COCAÍNA.....	24
El efecto de la cocaína sobre el circuito de la motivación	25
El rol de Núcleo Accumbens en el comportamiento de búsqueda de cocaína.....	29
Neurobiología de la reinstalación de la búsqueda de cocaína inducida por estrés.....	35
Desregulación de la homeostasis de glutamato en Núcleo Accumbens y reinstalación de la búsqueda de cocaína.....	39
Monitoreo <i>in vivo</i> de los niveles de glutamato extracelular.....	43
EL SISTEMA ENDOCANNABINOIDE	45
Receptores Cannabinoides.....	45
Cannabinoides Endógenos	49
Los receptores cannabinoides CB ₁ y el comportamiento de búsqueda de droga	52
Los receptores cannabinoides CB ₁ y la reinstalación inducida por estrés	55
Los receptores cannabinoides CB ₁ , plasticidad sináptica y homeostasis de glutamato	56
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	61
HIPÓTESIS	62
OBJETIVO GENERAL	63
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	63

MATERIALES Y MÉTODOS	68
GENERALIDADES METODOLÓGICAS	69
Animales	69
Drogas	69
Histología.....	70
MODELO EXPERIMENTAL	71
Aparato de preferencia condicionada a un lugar.....	71
Procedimiento general de reinstalación de la preferencia condicionada a un lugar	72
Procedimiento de microinyección	76
Estrés por inmovilización	77
Análisis estadístico de los datos comportamentales	79
CIRUGÍAS.....	80
Cirugía para implantación de cánulas guía	80
Cirugía para implantación de <i>probes</i> de microdiálisis	81
ESTUDIOS NEUROQUÍMICOS	83
Cánulas de microdiálisis (<i>probes</i>).....	83
Procedimiento general de microdiálisis <i>in vivo</i>	85
Microdiálisis reversa para la administración de ligandos	88
Identificación y cuantificación de glutamato	90
Análisis estadístico de la cuantificación de glutamato.....	91
Ensayo de recuperación <i>in vitro</i>	92
RESULTADOS	94
A. Consideraciones metodológicas del modelo de reinstalación inducida por estrés bajo el paradigma de preferencia condicionada a un sitio asociado a cocaína.....	95
B. RESULTADOS EN FUNCIÓN DE LOS OBJETIVOS ESPECÍFICOS	101
Objetivo 1: Influencia de la administración local de ligandos para los CB ₁ Rs, en NAc Core o en NAc Shell, en la reinstalación de la preferencia condicionada a cocaína inducida por estrés	101
Objetivo 2: Cambios en los niveles de glutamato extracelular de NAc Core en relación a la conducta de preferencia condicionada por el contexto asociado a cocaína, evaluada bajo nuestro protocolo de reinstalación inducida por estrés.....	118

Objetivo 3: Influencia de AM251 y de ACEA sobre los niveles de glutamato extracelular de NAc Core luego de una sesión de estrés por inmovilización y re-exposición al contexto asociado a cocaína, en animales que extinguieron la preferencia condicionada a la droga	132
Objetivo 4: Influencia de la activación de los receptores CB ₁ sobre los niveles basales de glutamato extracelular de NAc Core, en animales que extinguieron la preferencia condicionada a la droga	140
DISCUSIÓN	147
Antagonismo de los receptores cannabinoides CB ₁ y supresión de la reinstalación inducida por estrés	149
Agonismo de los receptores cannabinoides CB ₁ e inducción de la reinstalación luego del estrés sub-umbral	158
Participación diferencial de los receptores cannabinoides CB ₁ de Núcleo Accumbens Core vs. Shell	161
El rol de los receptores cannabinoides CB ₁ de Núcleo Accumbens Core en la reinstalación inducida por estrés involucra cambios en los niveles extracelulares de glutamato	165
Mecanismos neuroquímicos que subyacen al rol modulador de los receptores cannabinoides CB ₁ sobre los niveles de glutamato extracelular	170
El estrés como potenciador de las claves contextuales asociadas a cocaína	178
CONCLUSIONES	181
BIBLIOGRAFÍA	183

ABREVIATURAS

Δ^9 -THC= (-)- Δ^9 -tetrahydrocannabinol

2-AG= 2-araquidonil-glicerol

AA= Autoadministración

ACEA= Arachidonyl-2'-chloroethylamide hydrate; Agonista de los receptores CB₁

AM251= 1-(2,4-Dichlorophenyl)-5-(4-iodophenyl)-4-methyl-N-1-piperidinyl-1H-pyrazole-3-carboxamide; Antagonista/agonista inverso de los receptores CB₁

AMPA= Receptor glutamatérgico α -amino-3-hidroxi-4-isoxazole ácido propiónico

AMPC= Adenosín monofosfato cíclico

ATV= Área tegmental ventral

BLA= Amígdala basolateral

BNST= Núcleo del lecho de la estría terminal

Ca⁺²= Ion Calcio

CB₁R= Receptores cannabinoides tipo 1

COC= Inyección intraperitoneal de cocaína, 10 mg/kg

CPf= Corteza prefrontal

CPA= Aversión condicionada a un lugar

CPP= Preferencia condicionada a un lugar (siglas en inglés de "conditioned place preference")

CRF= Factor liberador de corticotrofina

D₁= Receptores dopaminérgicos tipo 1

D₂= Receptores dopaminérgicos tipo 2

DAGLa= Diacilglicerol lipasa A

DMSO= Dimetilsulfóxido

DSI= Supresión de la inhibición inducida por despolarización

DSE= Supresión de la excitación inducida por despolarización

E15= Estrés por inmovilización durante 15 min

E30= Estrés por inmovilización durante 30 min

EAAT= Transportadores de Amino Ácido Excitatorio

FAAH= Amida hidrolasa de ácido graso

GABA= Acido gamma-amino butírico

Gi= Proteína G inhibitoria

GLT-1= Transportador Glutamatérgico (EAAT2)

Gq= Proteína G asociada a la enzima fosfolipasa C

Gs= Proteína G estimuladora asociada a la enzima adenilato ciclasa

HHA= Eje hipotálamo-hipofisario-adrenal

HPLC= Cromatografía líquida de alta performance

HU-210= 1,1-Dimethylheptyl- 11-hydroxy-tetrahydrocannabinol; Agonista de los receptores CB₁

i.c.v.= Administración intracerebroventricular

i.p.= Administración intraperitoneal

IP₃= Inositol trifosfato

K⁺= Ion potasio

LTD= Depresión a largo plazo

LTP= Potenciación a largo plazo

mGluR= Receptores metabotrópicos de glutamato

MAPKs= Proteínas quinasas activadas por mitógenos

MSNs= Neuronas espinosas medianas

MGL= Monoacilglicerol lipasa

Na⁺= Ion Sodio

NAC= Núcleo Accumbens

NAPE= N-acilfosfatidil-etanolamina

NE= No Estrés

NMDA= Receptor glutamatérgico N-metil-d-aspartato

PKA= Proteinkinasa A

PLC= Fosfolipasa C

PV= Pálido ventral

Rimonabant= SR141716A; Antagonista/agonista inverso de los receptores CB₁

SAL= Inyección intraperitoneal de Solución Salina

SEC= Sistema Endocannabinoide

SNC= Sistema nervioso central

STD= Depresión a corto plazo

TB= Test Basal

TC= Test de Condicionamiento

TE= Test de Extinción

TR= Test de Reinstalación

TRPV1= Receptor vanilloide de potencial transitorio tipo 1

VGLUT= Transportador vesicular de glutamato

WIN 55,212-2 = 5-methyl-3-(morpholin-4-ylmethyl)-2,3-dihydro[1,4]oxazino[2,3,4-hi]indol, Agonista de los receptores CB₁

Xc-= Intercambiador cisteína-glutamato



RESUMEN

La adicción a drogas de abuso es considerada una enfermedad crónica que afecta principalmente al sistema nervioso central y se caracteriza por la gran probabilidad de reincidencia o recaída al consumo de la droga, incluso después de un largo período de abstinencia. Además de los factores individuales de la persona adicta, los factores externos tales como la ocurrencia de eventos estresantes, contribuyen significativamente a la persistente vulnerabilidad a reincidir en el abuso de drogas, siendo este uno de los aspectos más problemáticos en el tratamiento de la adicción. En animales de laboratorio, el modelo de *reinstalación* ha resultado válido para estudiar el fenómeno de la recaída basándose en los fundamentos de los paradigmas conductuales de aprendizaje asociativo, tales como la autoadministración y la preferencia condicionada a un lugar asociado a la droga (CPP, por sus siglas en inglés). Resultados previos de nuestro y otros laboratorios demostraron robustamente que la exposición aguda a un estresor induce la reinstalación del CPP asociado a la administración de cocaína. Modelos como éste han generado un gran avance en el conocimiento de los mecanismos neurobiológicos que subyacen a la reinstalación inducida por diversos estímulos.

Las investigaciones dentro del área de la neurociencia, acerca de la influencia del estrés sobre la recaída al consumo de cocaína, se han focalizado en el estudio de los circuitos neuronales comunes que subyacen a distintos comportamientos en respuesta tanto al estrés como a la droga. En relación a las áreas cerebrales involucradas, el Núcleo Accumbens (NAc), subdividido en dos áreas anatómica y fisiológicamente diferentes, Core y Shell, constituye un área fundamental en los procesos de recompensa de reforzadores naturales y de drogas de abuso. Si bien ambas estructuras participan de los procesos de aprendizaje y el control sobre las conductas apetitivas, sería el NAc Core el área crítica de integración de proyecciones glutamatérgicas y dopaminérgicas aferentes de otras áreas motoras y límbicas durante la etapa de reinstalación. En este sentido, un trabajo previo de nuestro laboratorio demostró el importante rol de los receptores glutamatérgicos de NAc Core, pero no Shell, en la reinstalación del CPP asociado a cocaína, luego de la exposición a estrés por inmovilización. Estos resultados son consistentes con numerosos estudios que demuestran que la neurotransmisión glutamatérgica en NAc Core cumple un rol crucial en la reinstalación de la conducta de

búsqueda de cocaína. Más aún, numerosos estudios reportan la importancia de la homeostasis de glutamato en NAc y su impacto sobre otros procesos celulares que subyacen al comportamiento relacionado a la reinstalación. En este sentido, las investigaciones actuales hacen foco especialmente en las estrategias farmacológicas que puedan reestablecer la homeostasis de glutamato con el objetivo de prevenir la recaída.

Estudios recientes reportan que el sistema cannabinoide endógeno, particularmente a nivel de los receptores CB₁ (CB₁Rs), cumple un rol clave en la modulación de los procesos de reforzamiento de las drogas de abuso, como así también en la modulación de los efectos del estrés. En relación a esto, se ha observado, a través de diferentes manipulaciones farmacológicas, que los CB₁Rs median la reinstalación de la conducta de búsqueda de psicoestimulantes, luego de una re-exposición a la droga o a claves ambientales asociadas. Teniendo en cuenta que los CB₁Rs se expresan en las terminales nerviosas aferentes glutamatérgicas y/o GABAérgicas de NAc, se ha propuesto que los cannabinoides endógenos y exógenos podrían afectar la conducta de reinstalación por acción sobre estas terminales. Si bien los estudios realizados en preparados *in vitro* de NAc muestran que la activación de los CB₁Rs es la que inhibe de manera directa la liberación presináptica de glutamato, en modelos *in vivo* también se reportan resultados inconsistentes con el mecanismo canónico y se propone que los CB₁Rs podrían participar de la regulación de la homeostasis de glutamato a través de la inhibición de la liberación de glutamato no sináptico. Este último efecto sobre los niveles de glutamato extrasináptico ha sido asociado a la influencia de los CB₁Rs en la recaída, al ejercer una influencia sobre otros receptores perisinápticos, específicamente los receptores metabotrópicos glutamatérgicos mGluR-2/3, que controlan la liberación sináptica de glutamato inducida por el estrés, la cual es necesaria para la expresión de la conducta de búsqueda de droga.

Debido entonces a las inconsistencias encontradas entre resultados *in vitro* e *in vivo*, en relación a la modulación de los CB₁Rs sobre los niveles de glutamato en el NAc y su influencia sobre la conducta de búsqueda de droga inducida por estrés, resulta importante profundizar en la comprensión de los mecanismos celulares y moleculares que subyacen al complejo rol de los CB₁Rs. Para ello, en el presente trabajo se planteó

combinar técnicas de neuropsicofarmacología y de neuroquímica cerebral para intentar dilucidar la relación entre el comportamiento de búsqueda de cocaína, bajo un modelo de reinstalación inducida por estrés, y los cambios en los niveles de glutamato extracelular de NAc, ambos bajo la influencia de la manipulación farmacológica localizada de los CB₁Rs. De esta manera, el objetivo general del presente trabajo de tesis fue evaluar farmacológicamente la participación de los CB₁Rs, administrando un antagonista o un agonista de tales receptores directamente en NAc Core o en NAc Shell, en la reinstalación de la preferencia condicionada a cocaína inducida por la exposición aguda a estrés por inmovilización; y la influencia de dicha manipulación farmacológica sobre los niveles de glutamato extracelular, en las áreas mencionadas, determinados a partir de muestras colectadas a través de la técnica de microdiálisis *in vivo*.

Los experimentos del presente trabajo de tesis fueron realizados con ratas adultas macho de la cepa Wistar. El protocolo general de reinstalación del CPP inducida por estrés consistió en el condicionamiento de los animales con cocaína (10 mg/kg i.p.) a uno de los dos contextos del aparato de CPP, durante ocho sesiones alternadas entre la droga y la administración de solución salina en el compartimento opuesto. Una vez demostrada la preferencia por el compartimento asociado a cocaína, los animales fueron sometidos a la extinción de dicha preferencia, mediante sucesivas asociaciones entre la administración de solución salina y ambos contextos del aparato de CPP. Para evaluar la reinstalación, el día posterior al test de extinción los animales recibieron una microinyección bilateral en NAc Core o en NAc Shell con un antagonista CB₁R (AM251; 2,5 o 5 nmol/0,5 µl/lado), un agonista CB₁R (ACEA; 0,01 o 0,001 fmol/0,5 µl/lado) o solución vehículo (VEH), según el experimento, y seguidamente fueron asignados a los siguientes tratamientos: 1) Estrés: inmovilización durante 15 ó 30 min según el experimento; 2) No estrés: permanencia en las cajas-hogar. Inmediatamente después, todos los animales fueron re-expuestos al aparato de CPP durante 15 min para evaluar el tiempo de permanencia en cada uno de los compartimentos. Los resultados obtenidos en el presente estudio mostraron, por un lado, que la microinyección de AM251 en su dosis más alta en NAc Core, pero no en Shell, inmediatamente antes de la exposición a estrés por inmovilización de 30 min, previno la reinstalación del CPP asociado a cocaína, la cual sí pudo observarse en los otros grupos sometidos a estrés, tanto administrados

con VEH como con AM251 en una dosis más baja. Por otro lado, la activación de los CB₁Rs mediante la microinyección local de ACEA en su dosis más alta, directamente en NAc Core, pero no Shell, indujo reinstalación del CPP al ser combinada con una sesión de estrés que por sí sola no induce aumento de la preferencia condicionada (15 min de inmovilización). Estos resultados parciales demuestran que los CB₁Rs de NAc Core, pero no de Shell, participan en la reinstalación del CPP a cocaína inducida por la exposición al estrés por inmovilización.

Por otra parte, teniendo en cuenta las evidencias que resaltan el rol modulador de los CB₁Rs de NAc en la neurotransmisión glutamatérgica y que los receptores glutamatérgicos de NAc Core, pero no Shell, participan en la reinstalación inducida por estrés, se sugiere que los CB₁Rs tienen una estrecha relación funcional con el sistema glutamatérgico en NAc Core para mediar el comportamiento de búsqueda de droga, bajo nuestro protocolo experimental. Para demostrar esto, en el presente trabajo de tesis se desarrolló un modelo de monitoreo *in vivo* de los niveles de glutamato extracelular de NAc Core en la reinstalación del CPP el cual permitió determinar una correlación entre la conducta de preferencia por un contexto asociado a la droga y el cambio en los niveles de glutamato extracelular luego del estrés. Específicamente, en ratas que extinguieron el CPP asociado a cocaína, el estrés por inmovilización indujo un aumento en los niveles de glutamato extracelular en NAc Core solo durante la re-exposición al contexto asociado con la droga, pero no al no asociado. De manera interesante, este aumento de glutamato dependiente del contexto fue suprimido en el grupo de animales que recibió previamente una microinyección de AM251 directamente en NAc Core. Además, un aumento similar en los niveles de glutamato extracelular en NAc Core fue observado cuando los animales fueron administrados localmente con ACEA inmediatamente antes de una sesión de estrés sub-umbral. En conjunto, estos experimentos aportan evidencias acerca del mecanismo glutamatérgico que subyace a la participación de los CB₁Rs en la reinstalación de la preferencia condicionada a cocaína inducida por estrés.

Con el objetivo de evaluar si la homeostasis de glutamato en NAc Core se ve comprometida al activar farmacológicamente a los CB₁Rs, se diseñó un experimento en donde cada animal recibió dosis crecientes de ACEA, el agonista de CB₁R, a través de la

membrana de microdiálisis ubicada en NAc Core, mientras permanecía en su caja-hogar sin exposición a ningún otro estímulo en particular. De esta manera, demostramos que ACEA tiene la capacidad de disminuir los niveles basales (no inducidos por estímulo) de glutamato en NAc Core. Estos hallazgos pueden relacionarse con las evidencias previas que demuestran que la disminución en los niveles basales de glutamato extracelular en NAc promueven la reinstalación de la búsqueda de cocaína y que la misma puede ser prevenida si estos niveles se normalizan, probablemente por una falta de tono inhibitorio de los auto-receptores glutamatérgicos mGluR-2/3, los cuales modulan negativamente la liberación de glutamato inducida por cocaína y la conducta de búsqueda de droga.

El presente trabajo demuestra que la manipulación farmacológica de los CB₁Rs en nuestro modelo regula directamente los niveles basales (no inducidos por estímulo) de glutamato e influye en los niveles de glutamato medidos luego del estrés y en el contexto asociado a la droga (inducidos por estímulo). También queda demostrado que tal influencia está estrechamente relacionada con la conducta de preferencia condicionada en animales que previamente extinguieron tal aprendizaje.

En conclusión, los resultados del presente estudio demuestran que la participación de los CB₁Rs sobre la reinstalación de la preferencia condicionada a cocaína inducida por estrés, se asocia a la modulación que ejercen estos receptores sobre la liberación de glutamato en NAc Core, la cual cumple un rol clave en el comportamiento de búsqueda de droga. Este estudio proporciona una plataforma para continuar investigando los mecanismos que subyacen a la participación de los CB₁Rs en la reinstalación de la búsqueda de droga inducida por estrés. Cabe destacar que los estudios de microdiálisis *in vivo* como el nuestro, en combinación con técnicas farmacológicas y comportamentales, resultan de gran importancia para el estudio de los mecanismos de neuroplasticidad relacionados con la adicción, significando un medio valioso en el descubrimiento de nuevas estrategias de prevención y tratamiento de los cambios inducidos por las drogas y eventos estresantes.



INTRODUCCIÓN

MARCO CONCEPTUAL PARA ADICCIÓN A COCAÍNA

La **adicción** se define como una enfermedad crónica del cerebro con gran probabilidad de reincidencia y caracterizada por síntomas cognitivos, conductuales y fisiológicos que llevan al uso compulsivo de drogas a pesar de las consecuencias negativas (ver revisión: Cami & Farre, 2003). En el presente trabajo, el término *adicción* será usado como un equivalente al “trastorno grave por consumo de estimulantes” definido en la quinta edición del Manual Diagnóstico y Estadístico de los Trastornos Mentales DSM-5 (A.P.A., 2013) y a los criterios establecidos para el “síndrome de dependencia a cocaína” en la décima edición de la Clasificación Internacional de las Enfermedades y Trastornos relacionados con la Salud Mental CIE-10 (O.M.S., 1992). En estos trabajos se especifica que el perfil clínico de una persona adicta/dependiente a sustancias psicoestimulantes, como la cocaína, se caracteriza por presentar sensibilización a los efectos conductuales, tolerancia, autoadministración compulsiva y, en ocasiones, síntomas de abstinencia cuando interrumpe el consumo. Además, suele ser muy llamativo que la motivación del individuo queda completamente secuestrada por el deseo de consumir, lo cual lleva a un descuido marcado de sus intereses y responsabilidades personales. Al igual que otras enfermedades, la adicción altera el funcionamiento normal del organismo, lo cual muchas veces puede llevar a que la salud general de un paciente adicto se vea seriamente comprometida. Afortunadamente, existe numerosa evidencia de que la adicción es una patología que se puede prevenir y se puede tratar, también al igual que otras enfermedades. Sin embargo, la alta tasa de recaídas en un paciente adicto es uno de los mayores impedimentos para que el tratamiento sea efectivo. Por todos estos motivos, la adicción a drogas de abuso actualmente constituye una de las mayores preocupaciones a nivel de políticas públicas sanitarias y sociales, no sólo por las consecuencias sobre la salud individual sino también por los problemas interpersonales asociados, sumado a la estigmatización y criminalización de las personas que presentan este patrón de consumo. En este contexto, resulta importante la atención integral de la problemática. En cuanto al abordaje terapéutico de una adicción ya establecida, el mismo debe ser diseñado en base a estrategias farmacológicas y psicosociales integradas que también contemplen la influencia de factores externos.

Desafortunadamente, en los últimos años el **consumo de cocaína** se ha incrementado en nuestro país. De hecho, la tendencia de consumo de “alguna vez en la vida” se duplicó en

el 2017 con respecto al 2010 (SEDRONAR, 2017c). Si bien está establecido que no todas las personas que tienen contacto con las drogas desarrollan adicción (C. P. O'Brien y col., 1992; M. S. O'Brien & Anthony, 2005), el consumo problemático de cocaína junto con el de marihuana son el mayor motivo de demanda de tratamiento en los distintos centros y programas de atención de la Secretaría de Políticas Integrales sobre Drogas de la Nación Argentina (SEDRONAR, 2017b). Incluso, la cocaína es la droga de abuso con más probabilidad de desarrollar adicción en nuestro país, siendo que del total de consumidores de cocaína, el 36,0 % alcanzó los criterios de dependencia para esta sustancia (SEDRONAR, 2017a). Desafortunadamente, la adicción a la cocaína es una de las más difíciles de tratar y actualmente el tratamiento consiste principalmente en una combinación entre terapia psicobiológica y farmacológica, pero no existe un fármaco efectivo para tratar esta dependencia (Kampman, 2019).

Recaída

La **recaída** puede ser definida como la reincidencia al consumo de una droga luego de un período de abstinencia forzada o voluntaria, y justamente la alta probabilidad de que esto suceda es una de las características cruciales de la adicción (Jaffe, 1990; C. P. O'Brien y col., 1992). Si bien la recaída es un proceso normal que puede ocurrir durante la recuperación de un paciente adicto, en algunos casos puede ser muy peligrosa, e incluso producir la muerte, sobre todo porque la persona puede alcanzar fácilmente un estado de "sobredosis". Interesantemente, el campo de investigación en adicción ha concluido que la ocurrencia de la recaída no es fácil de predecir sólo a partir del historial de consumo de un individuo, es decir de la duración de la adicción o del tipo o de la pureza de las drogas utilizadas. Para comprender mejor este fenómeno se requiere especial atención a las señales ambientales que predicen la disponibilidad de la droga, como así también otras consideraciones de tipo farmacológicas, cognitivas, contextuales y afectivas. Estas observaciones estuvieron acompañadas de un cambio de paradigma en la comprensión de cuáles son y cómo influyen los distintos factores que aumentan la vulnerabilidad a desarrollar y a recaer en la adicción (Marlatt & Donovan, 2005; Piazza y col., 1998). En el paradigma clásico o "centrado en la droga" se sostiene que la adicción es consecuencia de modificaciones inducidas en el cerebro por el consumo repetido de la misma. Es decir, desde esta perspectiva se sostiene que las propiedades farmacológicas

y fisicoquímicas de una droga, que determinan un inicio rápido y una mayor intensidad de sus efectos, incrementan el potencial de la misma a ser abusada (Roset y col., 2001). En esta misma línea, se cree que la recaída está determinada por un impulso o “deseo” causado por la dependencia física y por la presencia de los síntomas de abstinencia, llevando a una pérdida de control y a la recaída de forma inevitable (Miller & Hester, 1986). Sin embargo, este punto de vista no tiene en cuenta los estudios epidemiológicos que indican que factores socio-demográficos y genéticos influyen en la probabilidad de adquirir un comportamiento compulsivo en el consumo de drogas (Anthony y col., 1997; Kessler y col., 2005; Swendsen y col., 2009), ni tampoco tiene en cuenta la existencia de factores circunstanciales y personales que interactúan para precipitar la aparición de la recaída. Un modelo más actualizado, el “centrado en el individuo”, considera que la adicción es consecuencia de las acciones particulares de la droga ejercidas sobre un sustrato biológico con un fenotipo funcional específico. Dicho estado psicobiológico, determinado por factores clínicos, genéticos y biológicos, hace que un sujeto sea intrínsecamente más vulnerable a la adicción (Koob & Le Moal, 2001; Kreek y col., 2005). Esta teoría ha sido respaldada por estudios que indican que el metabolismo individual (Crabbe, 2002; Volkow & Baler, 2014), alteraciones epigenéticas (Nielsen y col., 2012), y ciertos rasgos de personalidad así como los trastornos psiquiátricos se asocian con un mayor riesgo de abuso (Conway y col., 2002; Grant y col., 2004). Sumado a esto, los síntomas de abstinencia que resultan en neuroadaptaciones son agravados por factores de riesgo tales como enfermedades psiquiátricas, condiciones socioeconómicas y la percepción de disponibilidad de droga (Altman y col., 1996; Swendsen y col., 2009). Para intentar explicar la recaída, este modelo ha sido nuevamente reformulado por el grupo del Dr. Marlatt (Hendershot y col., 2011; Witkiewitz & Marlatt, 2004), resaltando que hay factores individuales que son más bien “estáticos o tónicos” y que interactúan de forma dinámica con otros factores más “fásicos”. Los primeros estarían determinando una susceptibilidad individual inicial, que podría influir *a priori* en la probabilidad de recaída, mientras que la ocurrencia de la misma o de un “lapso” (primer consumo luego de la abstinencia) está finalmente determinada en gran medida por las respuestas fásicas, que son más inmediatas y transitorias. Entre estas respuestas se incluyen los procesos cognitivos y afectivos que pueden fluctuar a lo largo del tiempo y según el contexto, como los impulsos o el deseo, el estado de ánimo, la expectativa o la motivación. Además, las estrategias de afrontamiento del momento

también actúan como eventos fásicos que pueden determinar si una situación de alto riesgo culmina en la recaída. Dentro de las situaciones de alto riesgo se encuentran aquellos disparadores externos que han sido estudiados exhaustivamente en humanos y en diversos modelos animales, y que se caracterizan justamente por ser incontrolables o inevitables y que pueden suceder después de un tratamiento, lo cual implica que requieren de especial atención. En pacientes adictos, estos disparadores pueden ser una re-exposición a la droga (Jaffe y col., 1989), una re-exposición a estímulos previamente asociados a su consumo (Childress y col., 1999; C. P. O'Brien y col., 1992; See, 2002) o una exposición situaciones estresantes (Kosten y col., 1986; Kreek & Koob, 1998; Sinha, 2001). Bajo este marco conceptual, existe una gran cantidad de trabajos de investigación relacionados a la adicción que intentan contribuir a la comprensión de la naturaleza de las recaídas y de cuáles son los factores de riesgo junto con los procesos neurobiológicos y comportamentales subyacentes, lo cual es fundamental para el desarrollo de tratamientos eficientes.

Recaída inducida por estrés

El **estrés** es una construcción psicológica compleja que, a pesar de muchas décadas de investigación (Cannon, 1935; Selye, 1998), carece de una definición operativa única (Cohen y col., 2013; Chrousos & Gold, 1992). En modelos animales, el estrés puede definirse en términos generales como la exposición forzada a eventos o condiciones que normalmente se evitan (Piazza & Le Moal, 1998). En los seres humanos, el estrés se entiende como “una condición en la que las demandas ambientales superan las capacidades de afrontamiento del individuo”, tal como sugiere Cohen y col. (2013), considerando de esta manera los procesos cognitivos y emocionales. La investigación clínica indica que las experiencias estresantes de la vida no sólo son un factor de riesgo en el desarrollo de la adicción (Jacobsen y col., 2001; Kosten y col., 1986), sino también un importante disparador para la recaída en el uso de drogas. Estudios en humanos, tanto transversales como longitudinales, aseguran que eventos estresantes o estados de ánimo negativos están asociados con un mayor deseo de la droga previamente consumida e incluso con la recaída o la no remisión (S. A. Brown y col., 1995; Dewart y col., 2006; McCabe y col., 2016; Ouimette y col., 2007; Sinha, 2001). Podemos mencionar ejemplos como el conflicto y el estrés familiar, la falta de empleo o problemas interpersonales en el ámbito laboral, el fallecimiento o una enfermedad grave de un pariente

o amigo, un divorcio o separación, una crisis financiera, ser víctima de un delito o abuso, entre otros. Debido a que la exposición a situaciones adversas es común entre los consumidores, también es importante considerar la eficacia y la disponibilidad de las estrategias/habilidades de carácter emocional y comportamental para afrontar estas situaciones. Sin embargo, la importancia del estrés como disparador radica en que la recaída, entendida como un proceso, ocurre más frecuentemente en un contexto de sucesos estresantes significativos en asociación a los estados de ánimo negativos generados, por lo cual es especialmente importante prevenir el consumo sobre todo cuando el mismo se emplea como estrategia de afrontamiento o para “disminuir el estrés”.

Las investigaciones acerca de la influencia del estrés sobre la recaída, desde la perspectiva de la neurociencia, se han focalizado en el estudio de los circuitos neuronales que subyacen a la respuesta a estresores y el entrecruzamiento con aquellos que participan en la respuesta a la droga, indicando que ambos factores conducen a la activación de áreas cerebrales similares. De esta manera, a lo largo de las últimas tres décadas se han desarrollado diversos modelos animales que han contribuido a demostrar la importancia que tienen los distintos disparadores de la recaída y a explorar los mecanismos neurobiológicos que subyacen al comportamiento de búsqueda de droga en respuesta a dichos estímulos (Bossert y col., 2013). Especialmente, mediante el uso de estos modelos, denominados de “reinstalación”, se ha logrado establecer el rol de diferentes tipos de estresores en la potenciación de conductas relacionadas con el deseo y la búsqueda de psicoestimulantes y de otras drogas de abuso, luego de un periodo de abstinencia o de extinción de un aprendizaje relacionado con las drogas (Mantsch y col., 2016).

REINSTALACIÓN: MODELO ANIMAL DE RECAÍDA

El proceso de aprendizaje asociativo es crítico para el mantenimiento de la adicción y la recaída, por el cual un estímulo o señales ambientales asociadas al consumo de la droga adquieren un valor incentivo y motivacional evocando la expectativa de la disponibilidad de la droga (Hyman y col., 2006). Tales estímulos condicionados pueden generar respuestas emocionales o psicológicas involuntarias activando los circuitos cerebrales de la misma manera que lo hace la droga y, de esta forma, pueden mantener su consumo en el tiempo y generar el deseo o “craving” por la misma durante la abstinencia y precipitar la recaída frente

a la aparición del estímulo relacionado con la droga. En animales de laboratorio, los paradigmas conductuales de aprendizaje asociativo o condicionamiento, ya sea de tipo operante o de tipo clásico, como la autoadministración (AA) de una droga o la preferencia condicionada a un lugar asociado a la misma (CPP) respectivamente, son los mayormente empleados al momento de modelar tanto el proceso de adquisición como el de reinstalación de un comportamiento relacionado con la droga.

En términos prácticos, la **reinstalación** se refiere a la reanudación de una respuesta condicionada, sometida previamente a un proceso gradual de *extinción*, luego de la exposición a un estímulo desencadenante (Bossert y col., 2013; de Wit & Stewart, 1981). A pesar de que se ha debatido que el modelo de reinstalación en realidad no simula las situaciones que llevan a la abstinencia en el caso de los humanos (Marlatt, 1996), este modelo posee validez aparente o similitud fenomenológica para la mayoría de las drogas de abuso porque los diferentes estímulos externos que tienen la capacidad de reestablecer el comportamiento de búsqueda de droga en animales de laboratorio también tienen la capacidad de provocar la recaída y el deseo compulsivo en humanos (Bossert y col., 2013). Estos estímulos “desencadenantes” de la reinstalación pueden ser: una dosis desafío (“priming”) de la droga (de Wit & Stewart, 1981; Mueller & Stewart, 2000), claves discretas (Meil & See, 1996), claves discriminativas (Weiss y col., 2000), claves contextuales (Crombag & Shaham, 2002) o la exposición a ciertos estresores (Erb y col., 1996; Shalev y col., 2000) que, como se mencionó anteriormente, emulan las situaciones de alto riesgo que llevan a reincidir en el consumo. Por lo tanto, este modelo puede ser empleado para estudiar los mecanismos neuronales que subyacen a la recaída a pesar del hecho de que las condiciones que llevan a la abstinencia en animales son diferentes a la de los humanos (Self & Nestler, 1998). Desafortunadamente, la validez predictiva del modelo de reinstalación aún no ha sido establecida para cocaína y metanfetamina porque todavía no se han encontrado medicaciones efectivas en humanos para el tratamiento de la adicción y la recaída a las mismas.

Para comprender mejor los mecanismos comportamentales y neurobiológicos de la reinstalación primero es necesario indagar en el concepto de **sensibilización motivacional**, propuesto por Robinson y Berridge (1993) para explicar que el comportamiento de búsqueda y de administración compulsiva de una droga no se produce solamente por el deseo de experimentar efectos hedónicos positivos o por el deseo de evitar los efectos adversos de los

síntomas de la abstinencia. En esta teoría se postula que la sensibilización inducida por drogas a nivel de circuitos neurales está relacionada con una atribución excesiva de la saliencia motivacional (*incentive salience*) por la recompensa, lo cual lleva a la expresión de respuestas conductuales sensibilizadas que pueden aumentar la susceptibilidad a reinstalar aún después de largos períodos sin consumo (Vezina, 2007). Resulta interesante que los experimentos de sensibilización conductual demuestran una clara dependencia al contexto al igual que los experimentos de reinstalación, es decir que en ambos procesos es importante el valor incentivo motivacional asignado a los estímulos ambientales previamente asociados a la droga. De hecho, está ampliamente demostrado que la sensibilización induce una persistente hiperreactividad del sistema de recompensa cerebral en respuesta a los estímulos asociados a la droga (Vanderschuren & Pierce, 2010). Estos conceptos derivan en la definición actual de la *adicción*, concebida desde la neurobiología, que plantea que "...está basada en los cambios patológicos en el funcionamiento del cerebro producidos por las alteraciones farmacológicas repetidas a los circuitos cerebrales que regulan la manera en que una persona interpreta los estímulos motivacionalmente relevantes y cómo responde conductualmente ante los mismos..." (Kalivas & O'Brien, 2008). Este marco conceptual también va acompañado de la concepción de la adicción como un desorden del aprendizaje (Keramati y col., 2017) caracterizado por inflexibilidad comportamental para evitar la búsqueda de droga y adaptarse a las contingencias ambientales, lo cual resulta justamente de las adaptaciones neuronales a largo plazo en el cerebro (Neuhofner & Kalivas, 2018). En conjunto, la reinstalación no es más que una manifestación clara de que las conductas adictivas son hábitos aprendidos con base en los procesos de plasticidad sináptica que conducen a la asociación de estímulos relacionados con la droga (Hyman y col., 2006). Teniendo en cuenta este marco conceptual, una gran parte de las distintas estrategias farmacológicas planteadas hasta la fecha para prevenir la adicción y la recaída han hecho foco en la manipulación de los procesos homeostáticos y plásticos que suceden en el cerebro durante o luego del consumo de una droga en presencia de señales ambientales relevantes.

Reinstalación inducida por estrés

En animales de laboratorio, la exposición a estresores es uno de los factores que más influencia tiene sobre la reinstalación en comparación con otras manipulaciones

experimentales para inducir la búsqueda de droga, como la inyección de la droga o la exposición a claves ambientales o claves discretas asociadas (Bossert y col., 2013; Mantsch y col., 2016). Los estímulos que actúan como estresores producen una respuesta compleja y coordinada a nivel del sistema nervioso central (SNC), lo cual involucra cambios en el estado de ánimo, la cognición, el comportamiento y en las funciones autónoma y endocrina. Numerosos autores proponen que el cerebro puede discriminar o distinguir entre dos principales categorías de estresores: aquellos que son más “fisiológicos” porque afectan directamente mecanismos homeostáticos específicos, como una hemorragia o una infección, y aquellos que son más “psicológicos” porque representan una amenaza externa para el individuo y requieren de un procesamiento sensorial de orden superior (Dayas y col., 2001). Dentro de esta última categoría el grupo del Dr. Shaham distingue dos subgrupos (L. Lu, Shepard, y col., 2003). El primero engloba aquellas manipulaciones experimentales que consisten en exponer al sujeto a un ambiente aversivo, como en el caso de una inmovilización, un shock eléctrico en las patas o un pinchazo en la cola. El segundo grupo incluye manipulaciones experimentales en función de remover o modificar condiciones ambientales importantes para mantener al sujeto en condiciones fisiológicas y psicológicas estables, por ejemplo, restricción de comida, aislamiento social y separación de la madre. Al momento de emplear un estresor como disparador de la reinstalación, también es importante tener en cuenta que existe una serie de factores que pueden modificar la respuesta al mismo, como la relación temporal entre el estrés y la exposición un estímulo condicionado o incondicionado, la intensidad del estresor, y si es aplicado en forma aguda o crónica, si al aplicarlo en forma repetida éste es predecible o impredecible, y si el animal puede controlar o no la aplicación del estresor, pudiendo todos estos factores influenciar la relación entre el efecto del estrés y la respuesta conductual relacionada a una droga (Piazza & Le Moal, 1998).

En la versión operante del modelo de reinstalación en roedores, se han usado principalmente cuatro tipos de estresores: shock eléctrico intermitente en las patas (Ahmed & Koob, 1997; Erb y col., 1996), privación de comida por un día (Shalev y col., 2003), nado forzado (Conrad y col., 2010) y yohimbina (Funk y col., 2006; Lee y col., 2004; Shepard y col., 2004), un antagonista alfa-2 adrenérgico que induce respuestas similares al estrés y la ansiedad en humanos y en animales de laboratorio (Bremner y col., 1996). En la versión de CPP, los estresores usados para inducir reinstalación han sido: inmovilización (Briand &

Blendy, 2013; Sanchez y col., 2003); nado forzado (Briand & Blendy, 2013; Vaughn y col., 2012), shock eléctrico en las patas (Erb y col., 1996; Sanchez & Sorg, 2001; Shalev y col., 2000) y estrés social (Ribeiro Do Couto y col., 2006). A partir de resultados obtenidos de estos y otros estudios, se ha sugerido que el estrés es capaz de aumentar las propiedades reforzantes de las drogas de abuso y el valor motivacional de las claves externas asociadas a las mismas, a partir de acciones ejercidas sobre sustratos neurobiológicos comunes (Mantsch y col., 2014). En este sentido, se ha demostrado que el estrés, en términos generales, activa al eje hipotálamo-hipofisario-adrenal (HHA) (Herman y col., 2016) e incrementa la actividad de los circuitos neurobiológicos implicados en la motivación y la recompensa (Kreek & Koob, 1998; Piazza & Le Moal, 1998). De esta forma, un mayor entendimiento de los mecanismos neurobiológicos que comparten la respuesta al estrés y el consumo de drogas guían los estudios neurofarmacológicos de la recaída.

Desde otra perspectiva, se ha planteado que el estrés logra inducir reinstalación de búsqueda de droga debido a la capacidad que posee para mimetizar ciertas claves interoceptivas, o estados internos, provocados por la cocaína durante el condicionamiento induciendo un estado motivacional positivo (Ahmed & Koob, 1997). Adicionalmente, Highfield y col. (2000) proveen evidencia de que el estrés podría provocar la recaída interfiriendo con un proceso neuronal subyacente a la inhibición del comportamiento cuya función es detener la actividad cuando los reforzadores no están disponibles, como sucede durante la extinción (Pavlov & Anrep, 1927; ver discusión en: Shaham y col., 2000). En el presente trabajo adherimos a la propuesta de que el estrés funciona como un factor “preparador de la escena” (*stage setter* en inglés) para la búsqueda de cocaína al incrementar la sensibilidad a los efectos gratificantes de la droga y el valor incentivo de las claves previamente asociadas a su consumo (Mantsch y col., 2014). Esta hipótesis va de la mano con evidencias en humanos que muestran una mayor reactividad a las claves apareadas a una droga luego de la exposición a memorias traumáticas o a estímulos aversivos (Back y col., 2010; Coffey y col., 2002; Duncan y col., 2007; Fox y col., 2005), y evidencias en animales que muestran que la reinstalación inducida por estrés es potenciada o requiere de la presentación conjunta de claves apareadas o de una dosis de la droga (Buffalari & See, 2009; Feltenstein & See, 2006; Graf y col., 2013; McReynolds y col., 2016; Shelton & Beardsley, 2005).

Reinstalación inducida por estrés bajo el paradigma de preferencia condicionada a un lugar asociado a cocaína

El paradigma conductual de **CPP** (*conditioned place preference*, por sus siglas en inglés) forma parte del grupo de modelos que se basan en la administración no contingente de la droga para estudiar las distintas fases del proceso adictivo. El CPP es una forma simple de condicionamiento clásico o pavloviano, un proceso de aprendizaje que implica asociaciones positivas o negativas entre dos estímulos o experiencias. En el CPP esto corresponde a la asociación repetida entre la administración no contingente de una droga (estímulo incondicionado) y un contexto reconocible por el animal, que por lo general es una caja con características diferenciables (estímulo condicionado). De esta manera, se puede evaluar la percepción del valor gratificante, incentivo o hedónico de diferentes tipos de reforzadores (Tzschentke, 2007) ya que la conducta de acercamiento y permanencia de los animales en el contexto previamente apareado con la droga puede ser considerada como una medida del comportamiento de búsqueda. Por el contrario, si una droga induce un estado motivacional negativo es posible observar que el sujeto evita el contexto asociado, lo cual se interpreta como el desarrollo de una aversión condicionada por el contexto (CPA).

El CPP tiene ciertas limitaciones si se lo compara con los modelos de administración contingente, es decir los basados en el condicionamiento operante en donde el animal ejecuta una acción específica para recibir la infusión de una droga (Bardo & Bevins, 2000). En este sentido, se cree que el CPP podría tener poca relevancia en la evaluación del uso compulsivo de la droga debido al bajo nivel de exposición total a la misma (de Wit & Stewart, 1981; Epstein & Preston, 2003). Sin embargo, está ampliamente aceptado que esta prueba resulta adecuada para estudiar los mecanismos neurobiológicos que subyacen a la reinstalación de la conducta de búsqueda de droga y su uso continúa siendo una herramienta muy valiosa no solo en laboratorios de neurofarmacología o farmacología comportamental sino también en laboratorios de biología molecular (Kuhn y col., 2019). Además, la ventaja de usar el CPP radica en que se trata de una técnica de bajo costo, de uso simple y no invasiva para los animales bajo estudio.

En el modelo de reinstalación del CPP asociado a una droga (ver protocolo general en la [Figura 1](#)) primero se evalúa la preferencia innata de los animales de laboratorio, mediante un test basal, y se descartan aquellos que expresen preferencia incondicionada por alguno de los

compartimentos principales del aparato de CPP. Posteriormente, los animales que no fueron descartados son entrenados mediante un número determinado de sesiones alternadas, a los fines de asociar los efectos de una droga con las claves contextuales de un determinado compartimento del CPP, y la ausencia de tales efectos con el compartimento opuesto. Esta asociación se logra confinando cada animal a alguno de los compartimentos inmediatamente después de recibir la inyección de la droga o de solución vehículo según corresponda el día de la sesión. Luego de este entrenamiento, se realiza un test libre de droga en el cual los animales pueden explorar todo el aparato de CPP durante un tiempo determinado mientras se registra el tiempo de permanencia en cada compartimento. En este test, se considera que los animales que prefieren pasar más tiempo en el compartimento previamente asociado con la droga, con respecto al compartimento asociado al vehículo, adquirieron y expresaron el CPP por la misma. Esta preferencia condicionada puede ser extinguida cuando los animales son sujetos a un entrenamiento en donde son expuestos diariamente a los mismos contextos previamente condicionados, pero en ausencia de la droga. Se ha demostrado la reanudación de la expresión del CPP previamente extinguido, es decir la reinstalación, luego de una exposición aguda a un estresor o luego de una inyección no contingente de la droga, ya sea cocaína, amfetamina, metanfetamina, morfina, heroína, nicotina, etanol y MDMA (Aguilar y col., 2009; Y. Liu y col., 2008).

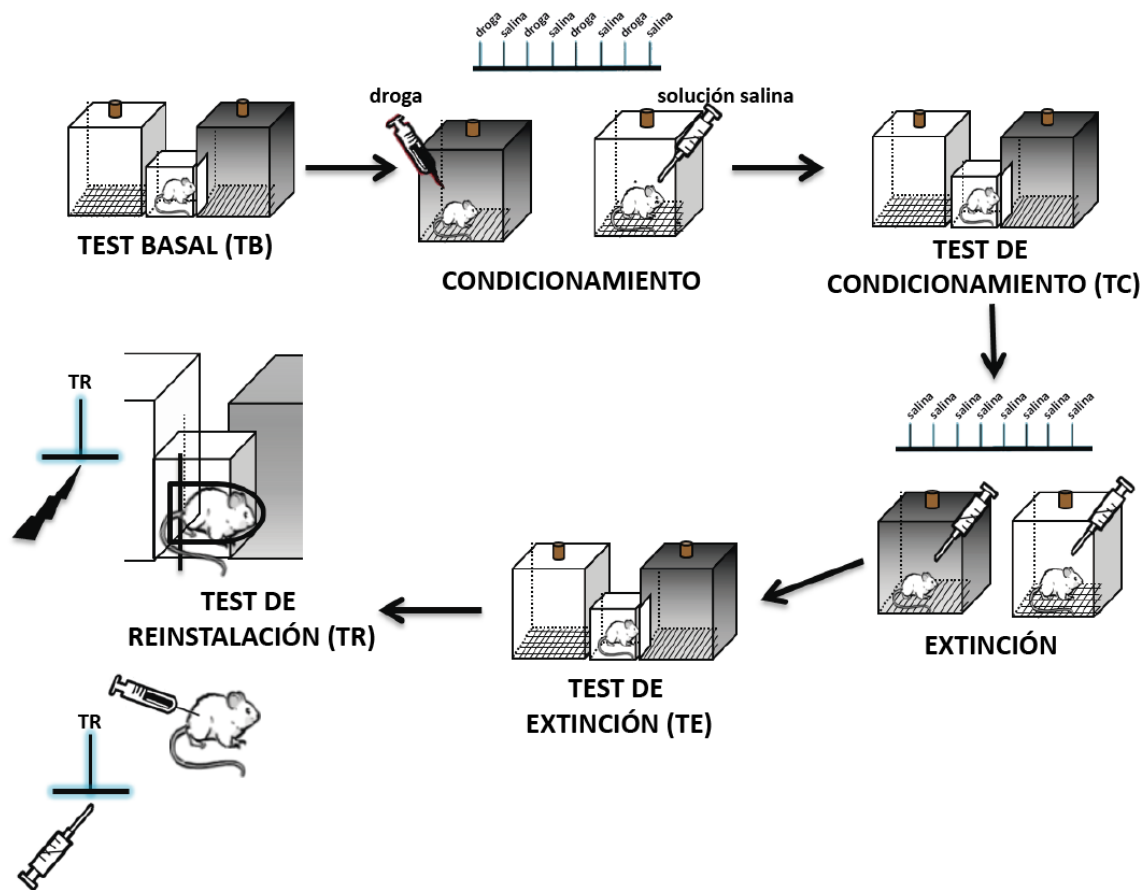


Figura 1. Esquema general del protocolo experimental de inducción, extinción y reinstalación de la Preferencia Condicionada a un Lugar (CPP, por sus siglas en inglés *Conditioned Place Preference*). Durante los test, los animales se mueven dentro de todo el aparato durante 15 min mientras se evalúa el tiempo de permanencia en cada compartimento. Durante las etapas de condicionamiento y extinción los animales son confinados en un determinado compartimento inmediatamente después de recibir la inyección de la sustancia que corresponda según el día. La reinstalación de la preferencia condicionada puede ser inducida por un estresor o por una dosis desafío de la droga, tal como se ejemplifica en la presente figura. Más detalles en el texto y en la sección de Materiales y Métodos.

El proceso de **extinción del CPP** consiste básicamente en generar otro aprendizaje en donde el aprendizaje original “desaparece” gradualmente de manera tal que la respuesta condicionada asociada pierde fuerza o se expresa con menor frecuencia (Todd y col., 2014). La extinción es un fenómeno comportamental clave en la reinstalación y viene siendo estudiado desde 1970 en el condicionamiento clásico (Bouton, 1988). Cabe destacar que, aunque al finalizar el proceso de extinción de un aprendizaje éste ya no se observe más, el aprendizaje original no se borra, sino que queda “retenido” en la memoria a largo plazo del cerebro. Esto último se evidencia justamente con el fenómeno de reinstalación y otros fenómenos relacionados, como la “recuperación espontánea” o el “*renewal*”. En este sentido, se sostiene que lo que perdura en el tiempo y queda en parte “preservado” es la asociación ‘estímulo condicionado-estímulo incondicionado’ establecida durante el condicionamiento.

En conjunto con lo mencionado más arriba, esto denota que la comprensión del proceso de la reinstalación y el sustrato neurobiológico subyacente está estrechamente relacionada con el estudio de los cambios neuronales a largo plazo que participan en los procesos de aprendizaje y memoria de respuestas dependientes del contexto.

El uso del **estrés por inmovilización** (*restraint stress*, en inglés) ha demostrado ser efectivo para inducir la reinstalación del CPP asociado a cocaína (Briand & Blendy, 2013; De Giovanni y col., 2016; Tung y col., 2016) y nicotina en ratas (Leao y col., 2009), y a morfina (Ribeiro Do Couto y col., 2006) y metanfetamina en ratones (Han y col., 2014). Una de las consideraciones que se debe tener en cuenta para este tipo de estresor es que el mismo debe ser aplicado en la misma habitación experimental en la cual se llevan a cabo todas las fases del protocolo de reinstalación del CPP. Esto surge de evidencias previas de nuestro laboratorio (De Giovanni y col., 2016) y de otros experimentos realizados bajo el paradigma de AA, en los cuales emplean estrés por un shock eléctrico en las patas (*footshock* en inglés) y en donde se demuestra que no hay reinstalación si el estrés es dado en un ambiente nuevo (Shalev y col., 2000). De manera similar, y como mencionamos más arriba, la re-exposición a claves discretas asociadas a la AA de cocaína también son necesarias para que ocurra la reinstalación luego del estrés (Shelton & Beardsley, 2005). Estos resultados avalan la idea de que las claves contextuales cumplen un rol crucial en la adicción, lo cual incrementa la validez aparente del paradigma de CPP para ser usado en modelos de reinstalación inducida por estrés. Otra consideración importante se relaciona con la intensidad del estrés, que en la inmovilización está dada por la duración de la misma. En la mayoría de los trabajos en los cuales se emplea este tipo de estresor la duración puede variar entre 15 min (Briand & Blendy, 2013; Sanchez y col., 2003) y 30 min (De Giovanni y col., 2016; Leao y col., 2009; Tung y col., 2016). Sin embargo, cabe destacar que una inmovilización de 15 min de duración no dispara la reinstalación del CPP bajo nuestras condiciones experimentales (De Giovanni y col., 2016). Esta particularidad demuestra la existencia de un umbral que al ser superado desencadena ciertos mecanismos conductuales que llevan a la expresión de la respuesta condicionada previamente extinguida.

Finalmente, cabe destacar que numerosos autores hacen hincapié en distinguir los procesos que son evaluados bajo los dos paradigmas conductuales más usados en los modelos de reinstalación. Por un lado, para el CPP se sugiere que es mejor referirse al término “recompensante” o “gratificante” cuando hablamos de las propiedades de las drogas que

pueden ser evaluadas bajo este paradigma. Con respecto a la AA, se sugiere que es más correcto decir que se mide el “reforzamiento”. Si bien hay un amplio debate en cuanto a esta distinción de conceptos, en el presente trabajo adherimos a la teoría de que en el CPP se evalúa los efectos recompensantes asociados a la droga y al contexto apareado.

NEUROBIOLOGÍA DE LA ADICCIÓN A COCAÍNA

El foco principal en la comprensión de los mecanismos neurobiológicos que subyacen a la adicción a cocaína está orientado al **sistema mesocorticolímbico** o *sistema de recompensa*. La **cocaína** pertenece a la familia de los psicoestimulantes o estimulantes psicomotores que actúan directamente sobre las terminales de neuronas dopaminérgicas aumentando la actividad electrofisiológica de determinadas áreas del sistema mesocorticolímbico (Hyman y col., 2006). Específicamente, la cocaína se une al transportador de dopamina (DAT) resultando en la inhibición de la recaptación de la dopamina del espacio extracelular y, por lo tanto, provocando el incremento de la cantidad y la vida media de ésta a nivel sináptico y extrasináptico ([Figura 2](#)). El aumento de los niveles de dopamina en el sistema mesocorticolímbico produce una amplificación casi inmediata de la señal a las neuronas postsinápticas (Di Chiara & Imperato, 1988). En condiciones normales, estos sitios de acción regulan, de manera directa o indirecta, la actividad de los circuitos neuronales implicados en la motivación y la recompensa en respuesta a estímulos esenciales para la supervivencia, como la comida, el sexo y las interacciones sociales (Hernandez & Hoebel, 1988; Melis & Argiolas, 1995; Pfaus, 1999; Robbins & Everitt, 1996). Por lo tanto, ante el consumo o administración de cocaína los efectos placenteros/euforizantes pueden durar mucho más que aquellos producidos por recompensas naturales y pueden ser mucho más intensos (Hyman y col., 2006).

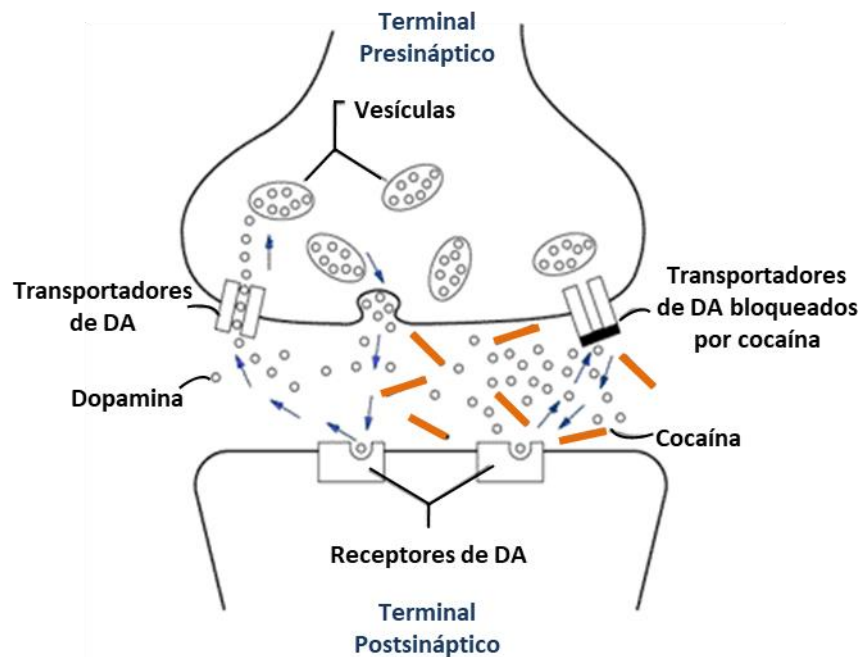


Figura 2. Mecanismo de acción de la cocaína responsable de producir sus efectos agudos.

Interesantemente, luego de varias exposiciones repetidas a cocaína, la activación de las neuronas dopaminérgicas puede darse ante la sola presentación de las claves ambientales previamente asociadas a la droga (Ghitza y col., 2003; Ito y col., 2002; Phillips y col., 2003; Weiss y col., 2000) y, de manera complementaria, la omisión o la disminución de la probabilidad de recibir la recompensa provoca una pausa transitoria en la actividad de estas neuronas (Schultz, 1998). En conclusión, el sistema dopaminérgico mesocorticolímbico participa no solamente en la codificación de los efectos gratificantes de la cocaína sino también en la predicción de disponibilidad de la misma (Schultz, 2016). Adicionalmente, cabe destacar que el sistema dopaminérgico no es el único afectado por el consumo repetido de cocaína, ya que otros sistemas de neurotransmisión, como el glutamatérgico y el GABAérgico, y sistemas de neuromodulación, como el opioide y el cannabinoide endógeno, también responden secundariamente al mecanismo de acción primario de esta droga y cumplen un rol clave en las distintas etapas del proceso adictivo (Kalivas, 2007; Kalivas y col., 2009; Mongi-Bragato y col., 2018; Olieri y col., 2013).

El efecto de la cocaína sobre el circuito de la motivación

Luego de exposiciones repetidas, la cocaína induce adaptaciones neuronales a largo plazo las cuales han sido correlacionadas con diversas consecuencias a nivel conductual tales

como la activación motora, y cambios en la percepción, en la expectativa de obtención de la recompensa y en la persistencia de las asociaciones establecidas entre estímulos contingentes (Breiter y col., 1997; Buchta & Riegel, 2015). Esta correlación se debe en parte a las funciones asociadas a las principales áreas afectadas del cerebro, más específicamente lo que se conoce como el ***circuito de la motivación***. Para una mejor comprensión, las áreas de este circuito pueden agruparse según sus características neuroanatómicas en dos subcircuitos, uno límbico y otro motor ([Figura 3](#)). Por un lado, la Amígdala, el área ventral de la Corteza Prefrontal (CPf ventral), el Área Tegmental Ventral (ATV), el Núcleo Accumbens Shell (NAc Shell) y el área ventromedial del Pálido Ventral integran lo que se denomina el subcircuito límbico ya que se encargan principalmente de procesar el significado motivacional y emocional de estímulos externos (LeDoux, 1993). Por otro lado, la subregión Core del Núcleo Accumbens (NAc Core), la Corteza Prefrontal dorsal (CPf dorsal) y el compartimento dorsolateral del Pálido Ventral están más relacionados con la función motora y el comportamiento dirigido ya que conectan con el sistema motor extrapiramidal a través de la Sustancia Nigra. Se debe tener en cuenta que ambos subcircuitos están funcional y topográficamente interconectados, de tal manera que permiten el flujo de información desde los núcleos límbicos hacia los sistemas motores (Kalivas y col., 1993). De esta manera, el circuito de la motivación se encargaría de percibir y procesar toda la información asociada a los efectos de actividades biológicamente relevantes, y a su vez también es responsable de permitir o bloquear la expresión de una respuesta conductual, estableciendo la intensidad y el umbral para la misma (Le Moal & Simon, 1991). La cocaína, al “usurpar” este circuito alterando los niveles extracelulares de los neurotransmisores y la actividad electrofisiológica de las áreas que lo componen, produce un desbalance en la información procesada y la acción motora ejecutada, llevando a comportamientos compulsivos y un deseo exacerbado por la droga, sobre todo después de un consumo crónico (Nestler, 2005).

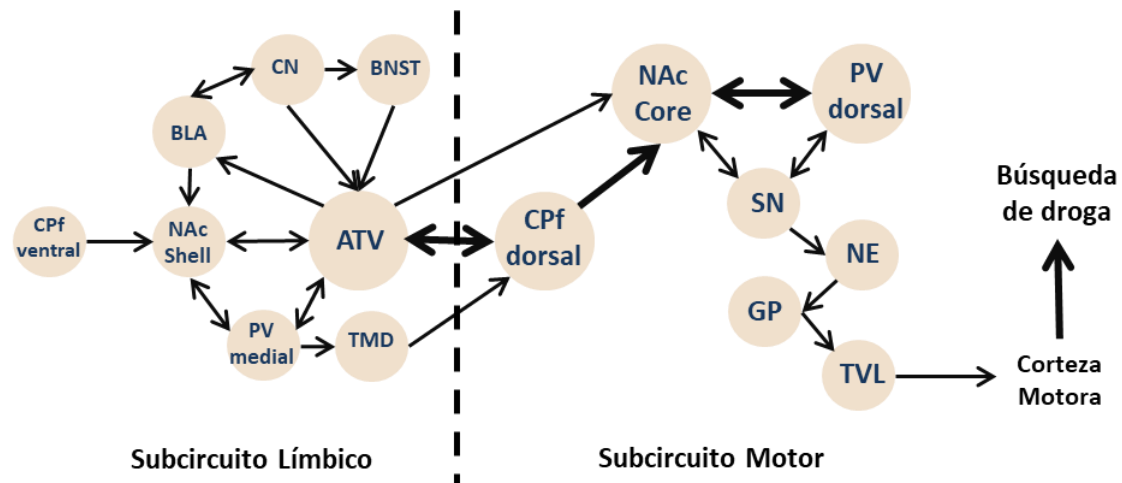


Figura 3. Circuito de la motivación. La figura muestra las interconexiones entre los núcleos de los sub-circuitos límbico y motor que están implicados en la producción del comportamiento dirigido. El sub-circuito límbico está constituido por el Área Tegmental Ventral (ATV), la Corteza Pre-Frontal (CPf) ventral, el Pálido Ventral (PV) medial, el Tálamo Mediodorsal (TMD), la Amígdala Basolateral (BLA) y la Amígdala Extendida Central (CEA) formada por el Núcleo Accumbens (NAc) Shell, el Núcleo Central de la Amígdala (CN) y los Núcleos del Lecho de la Estría Terminal en su porción dorsolateral (BNST). Los núcleos del sistema límbico no están conectados con el sistema motor, para ello el NAc ha sido planteado como la interfase entre el estímulo emocional y la conducta motora. El sistema mesocortical motor incluye proyecciones desde ATV hacia la CPf dorsal, el PV dorsolateral y el NAc Core, en conexión recíproca con el sistema motor extrapiramidal a través de la Sustancia Negra (SN). Este circuito es crítico para el comportamiento de búsqueda de droga e influencia a la corteza motora vía Neostriado (NE), Globo Pálido (GP) y Tálamo Ventrolateral (TVL). Las cabezas de las flechas indican la dirección de las proyecciones y las flechas bidireccionales indican conexiones recíprocas. Los círculos más grandes y sus flechas se consideran los núcleos críticos para el comportamiento de búsqueda de una droga. *Adaptado de McFarland y Kalivas (2001).*

La desregulación de la actividad de las diferentes áreas del circuito de la motivación debido al consumo de drogas de abuso se relaciona principalmente con los cambios a largo plazo que inducen las mismas a nivel de receptores, segundos mensajeros y transportadores de varios sistemas de neurotransmisión y neuromodulación, y que hasta el momento son muy difíciles de revertir (Chen y col., 2010). Por ejemplo, algunas de las adaptaciones neuronales luego del consumo crónico de cocaína, tanto en modelos animales como en humanos, se dan a nivel de receptores ionotrópicos y metabotrópicos glutamatérgicos en NAc y ATV (Hemby y col., 2005; L. Lu, Grimm, y col., 2003; Smaga y col., 2019) como así también a nivel del transporte, síntesis y receptores de dopamina en CPF (Grimm y col., 2002; McIntosh y col., 2013; Volkow y col., 1993). Se ha demostrado que estos cambios duraderos inducidos por la cocaína alteran de manera crónica el equilibrio funcional del circuito de la motivación y explican en gran medida los fenómenos de sensibilización conductual y reinstalación, incluso después de un período de abstinencia (Chen y col., 2010; Churchill y col., 1999; Hyman y col., 2006; Kalivas y col., 2005; Robinson & Berridge, 2000). En este sentido, y teniendo en cuenta

el concepto de adicción desde una perspectiva neurobiológica, resulta muy interesante el estudio de los mecanismos celulares, moleculares y neuroquímicos que ocurren en las principales áreas del circuito de la motivación y que subyacen a los distintos procesos de aprendizaje y a las respuestas maladaptativas asociadas a cada una de las etapas del proceso adictivo (Korpi y col., 2015).

Como ya ha sido mencionado, las vías dopaminérgicas controlan varios aspectos del reforzamiento, tales como la motivación (Salamone & Correa, 2002), la saliencia incentiva (Berridge & Robinson, 1998) y la predicción del error o predicción de la disponibilidad de la droga (Schultz, 1998). Sin embargo, la experiencia inducida por un estímulo gratificante (sensación hedónica) no es estrictamente dependiente de dopamina, es decir, la dopamina es necesaria pero no suficiente. Interesantemente, numerosos estudios han comprobado que la administración aguda de cocaína también aumenta los niveles de glutamato en NAc, CPf y ATV (ver revisión: D'Souza, 2015). El **glutamato** (ácido L-glutámico) es considerado el mayor mediador excitatorio en el SNC de mamíferos y las modificaciones sobre su sistema tienen gran importancia en el mantenimiento de las adaptaciones neuronales, más específicamente en los procesos de plasticidad neuronal asociados al aprendizaje y la memoria (Kelley, 2004; Wolf y col., 2004). En este sentido, mientras que la adquisición de las asociaciones relacionadas a una droga depende de la convergencia entre la liberación de dopamina y glutamato, específicamente es el glutamato de NAc el que adquiere mayor relevancia en la persistencia y expresión de conductas ya aprendidas relacionadas con la adicción, como la reinstalación (Kalivas y col., 2009; Scofield y col., 2016). De hecho, se conoce que la plasticidad sináptica inducida en NAc depende principalmente de glutamato y no dopamina (Pennartz y col., 1993) y que la neurotransmisión glutamatérgica modula la liberación de dopamina (Jedema & Moghaddam, 1994; Wu y col., 1993), estando ambos eventos relacionados con la hiperlocomoción y con el comportamiento de búsqueda de droga (Pulvirenti y col., 1991; Scofield y col., 2016). En conclusión, la transmisión glutamatérgica en el NAc ha sido involucrada en el proceso de aprendizaje asociativo, la sensibilización comportamental y el mantenimiento de memorias relacionadas a las drogas por su rol principal en los mecanismos de plasticidad sináptica.

El rol de Núcleo Accumbens en el comportamiento de búsqueda de cocaína

El **NAC**, el principal núcleo del estriado ventral, recibió especial atención luego de que Herrick (Herrick, 1926) reportara que estaba involucrado en la locomoción y la alimentación. Más tarde, Mogenson y sus col. (1980) plantearon que el NAC constituía “la interfase entre lo límbico y lo motor”, otorgándole un rol clave en la ejecución de comportamientos dirigidos. A partir de esta concepción, numerosos trabajos profundizaron en el rol del NAC en los comportamientos relacionados con la motivación y su relación anatomo-funcional con otras áreas cerebrales. Actualmente, se sigue sosteniendo que el NAC tiene un papel central en la integración de los aferentes límbicos y corticales ya que en él convergen la mayoría de los circuitos glutamatérgicos y dopaminérgicos (Groenewegen y col., 1996). Es por este motivo que el NAC ocupa un lugar importante en el estudio de los procesos de recompensa, búsqueda de droga y reforzamiento (Floresco, 2015).

Las neuronas espinosas medianas GABAérgicas (MSNs), que constituyen aproximadamente el 90-95% del total de neuronas del NAC de rata y el 70% del NAC de primates (el resto son interneuronas GABAérgicas y colinérgicas) (Meredith, 1999), residen en dos subregiones anatómica y fisiológicamente diferentes, el Core y el Shell (Heimer y col., 1997; Zahm, 1999). Estas dos poblaciones de neuronas tienen diferentes proyecciones aferentes y eferentes ([Figura 4](#)) y juegan roles distintos en la generación de conductas relacionadas con la recompensa, lo cual fue corroborado por estudios anatómicos, histológicos, neuroquímicos, electrofisiológicos y comportamentales. En relación a esto, el **NAC Shell** ha sido incluido en la Amígdala Extendida Central junto con el Núcleo Central de la Amígdala y el Núcleo Ventral del Lecho de la Estría Terminal (BNSTv) (de Olmos & Heimer, 1999) y estaría involucrado en la regulación de la motivación y el reforzamiento (Di Chiara, 2002). Por otro lado, el **NAC Core** estaría más relacionado con el estriado, tanto anatómica como funcionalmente, y por consiguiente estaría involucrado en la integración sensorio-motora de la conducta y en la ejecución de la conducta dirigida hacia un objetivo (Floresco, 2015). De esta manera, podría decirse que las propiedades emotivas o motivacionales de los reforzadores estarían codificadas en el Shell, mientras que las propiedades motoras podrían estar codificadas en el Core, teniendo el Shell un rol preponderante durante el desarrollo de la adicción, mientras que el Core mediaría la ejecución más a largo plazo de las conductas relacionadas con el mantenimiento de la adicción y la recaída (Di Chiara, 2002; Floresco, 2015;

Ito & Hayden, 2011; Meredith y col., 2008; Scofield y col., 2016). En este mismo sentido, se sugiere que el NAc Shell parece estar más involucrado en la ejecución de comportamientos predeterminados en relación a estímulos incondicionados, mientras que la activación del NAc Core está implicada en la respuesta motora ante la presentación de estímulos ambientales con valor motivacional (Hollander & Carelli, 2007; Meredith y col., 2008). Finalmente, cabe destacar que estas subregiones no son independientes entre sí ya que forman parte de un circuito en el cual fluye la información desde el NAc Shell al NAc Core pasando por otras áreas (Meredith y col., 2008). Si bien existen algunos estudios que no reportan diferencias sutiles entre las funciones de ambas subregiones, ciertos roles específicos pueden ser revelados al emplear ensayos comportamentales más sofisticados, monitoreo de la actividad neuronal en tiempo real o manipulaciones de circuitos específicos (ver revisión: Klawonn & Malenka, 2018).

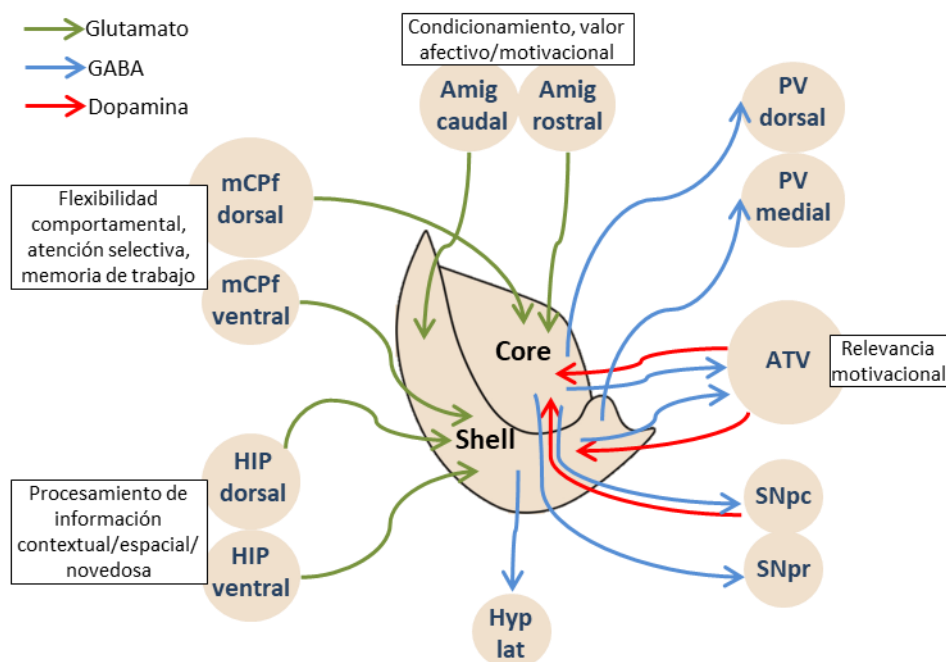


Figura 4. Proyecciones aferentes y eferentes del Core y el Shell del Núcleo Accumbens. mCPf= Corteza Pre-Frontal medial, HIP= Hipocampo, Amig= Amígdala, PV= Pálido Ventral, ATV= Área Tegmental Ventral, SNpc= Substancia Nigra pars compacta, SNpr= Substancia Nigra pars reticulata, Hyp lat= Hipotálamo lateral. Para mayor simplificación fueron omitidas algunas proyecciones, como así también las conexiones entre áreas distintas al NAc. En recuadros se resume el tipo de información que procesan las principales áreas cerebrales que envían proyecciones al NAc. *Adaptado de Groenewegen y Trimble (2007) y Floresco (2015).*

Las aferencias excitatorias glutamatérgicas que llegan al NAc Core provienen principalmente de la Amígdala Basolateral (BLA), Hipocampo Ventral y CPf dorsomedial (Britt y col., 2012) e interactúan con las proyecciones dopaminérgicas provenientes de ATV, como

así también con otras proyecciones del Tálamo, Hipocampo Dorsal y Corteza Insular (Scofield y col., 2016) (Figura 4). Estas regiones procesan distintos tipos de información y su activación específica puede llevar a distintos resultados comportamentales al interactuar con las neuronas del NAc Core (Goto & Grace, 2008; Sesack & Grace, 2010). La interacción entre la CPf dorsomedial y el NAc influye en comportamientos que requieren atención, memoria de trabajo y contingencia entre contextos (Cools y col., 2007; Christakou y col., 2004; Floresco y col., 1999). La vía del Hipocampo dorsal al NAc es esencial para la orientación espacial durante la ejecución de comportamientos dirigidos, para discernir entre estímulos novedosos o asociados a un contexto y para la codificación de la dinámica temporal de la toma de decisiones (Mannella y col., 2013). La vía BLA-NAc juega un rol muy importante en las respuestas condicionadas de tipo emocional y en formar asociaciones entre estímulos que predicen consecuencias gratificantes o aversivas (Floresco, 2015). Por otro lado, las proyecciones dopaminérgicas que llegan de ATV siempre responden uniformemente (activándose) tanto a estímulos gratificantes como aversivos (Carlezon & Thomas, 2009). En conclusión, las proyecciones que llegan al NAc Core proveen información sobre el contexto externo y sobre estados emocionales y fisiológicos internos, y es en esta área en donde se integran todas las señales, se interpreta la valencia o significado de los estímulos, se asigna una representación interna a cada uno y se seleccionan las acciones resultantes en sinergia con la CPf. El NAc Shell también contribuye a esta selección de comportamientos según la relevancia de los estímulos, pero lo hace de manera más bien complementaria al rol preponderante del NAc Core, facilitando la selección de varios estímulos relacionados y la potenciación del valor asignado (Mannella y col., 2013).

Para comprender de qué manera el NAc cumple su función de integración y selección de conductas opuestas (acercamiento/evitación) parece necesario profundizar en la naturaleza de los microcircuitos establecidos en el área, en función de la especificidad de las conexiones entre sus neuronas aferentes y eferentes (desde dónde vienen y hacia dónde van). Como se mencionó más arriba, el NAc está conformado principalmente por las **MSNs GABAérgicas**. Al igual que el resto del estriado, dichas neuronas pueden subdividirse en dos tipos según sus propiedades intrínsecas y por las diferentes áreas a las que proyectan (X. Y. Lu y col., 1998; MacAskill y col., 2012). Típicamente pueden distinguirse MSNs que expresan receptores dopaminérgicos tipo D₂ (receptores acoplados a proteína G inhibitoria, G_{i/o}), junto

con sustancia P y dinorfina; y, por otro lado, las MSNs que expresan preferentemente receptores dopaminérgicos tipo D₁ (receptores acoplados a proteína G estimuladora, G_s) y encefalina (Gerfen y col., 1990). En general, estudios que usaron diferentes herramientas genéticas y farmacológicas para manipular tipos específicos de células, llegaron a la conclusión de que las MSNs-D₁ estriatales regulan positivamente el comportamiento de búsqueda de psicoestimulantes (lo promueven), y las MSNs-D₂ lo hacen de manera “negativa” (lo inhiben) (Bertran-Gonzalez y col., 2008; Bock y col., 2013; Calipari y col., 2016; Hikida y col., 2010; Lobo y col., 2010; K. Park y col., 2013). En este sentido, se ha planteado que esta diferencia puede estar correlacionada con las diferentes áreas con las que contactan sus axones. Si bien las vías que constituyen ambos grupos de MSNs convergen en el complejo ATV/Sustancia Nigra *pars reticulata*, el cual a su vez envía proyecciones GABAérgicas al Tálamo mediodorsal y la Corteza Motora, las MSNs-D₁ conforman una “vía directa” hacia la Sustancia Nigra y las MSNs-D₂ una vía “indirecta” que pasa primero por el Pálido Ventral y el Núcleo Subtalámico (Gerfen & Surmeier, 2011; Surmeier y col., 2007). De esta manera, este modelo simplificado indica que la activación de la vía “directa” desinhibe en última instancia al tálamo por eso promueve la búsqueda de droga, al contrario de la vía “indirecta” que inhibe el tálamo y por lo tanto la conducta. Cabe destacar que algunos estudios demuestran que este modelo resulta parcialmente incorrecto para el NAc, ya que el NAc Core envía proyecciones mixtas de MSNs-D₁ y MSNs-D₂ al Pálido Ventral, y algunas neuronas del Pálido Ventral inervan directamente al tálamo (Kupchik y col., 2015; Kupchik & Kalivas, 2017; X. Y. Lu y col., 1998; Robertson & Jian, 1995). Por su lado, el NAc Shell proyecta ambos tipos de MSNs hacia el Pálido Ventral y la vía continúa hacia ATV. De esta manera se puede decir que las vías “directa e indirecta” del NAc no están determinadas en su totalidad por el tipo de MSNs que las conforman (Kupchik & Kalivas, 2017)(ver representación en la [Figura 5](#)). Sin embargo, resultan interesantes las diferentes funciones conductuales atribuidas a las MSNs-D₁ y las MSNs-D₂ del NAc que hacen sinapsis en el Pálido Ventral (Creed y col., 2016; Heinsbroek y col., 2017). De hecho, a los distintos tipos de MSNs se les ha atribuido roles específicos en distintos comportamientos relacionados con la adicción (ver revisiones: Hikida y col., 2016; Lobo & Nestler, 2011; Zinsmaier y col., 2021). Por ejemplo, en los trabajos de Hikida y col. (2010; 2013) se llega a la conclusión de que las MSNs-D₁ resultan críticas para distinguir entre estímulos asociados y no asociados con una recompensa, y que las MSNs-D₂ resultan claves para la formación rápida

de memorias que permiten evitar estímulos aversivos. Por otro lado, varios trabajos revelan que las proyecciones aferentes que llegan desde BLA, Hipocampo y CPf interactúan diferencialmente con los distintos tipos de MSNs (Scofield y col., 2016). Por ejemplo, las MSNs-D₁ reciben señales excitatorias principalmente desde Amígdala Basolateral y las MSNs-D₂ preferentemente desde CPf (Deroche y col., 2020). Además, las propiedades sinápticas de las distintas proyecciones que llegan al NAc van variando según la etapa del proceso adictivo (Barrientos y col., 2018). Finalmente, vale la pena mencionar que la actividad de las MSNs no está determinada solamente por las proyecciones glutamatérgicas que llegan al NAc sino también por otras células que componen el NAc, como los astrocitos, las interneuronas colinérgicas y GABAérgicas, la microglia y los aferentes dopaminérgicos ([Figura 5](#)) (Scofield y col., 2016). En resumen, todos los datos presentados en este párrafo indican que hay cierta especificidad en los subcircuitos y las conexiones sinápticas que se conforman en el NAc y que el balance dinámico entre entre las conexiones aferentes y eferentes es lo que determina el tipo de conducta expresada.

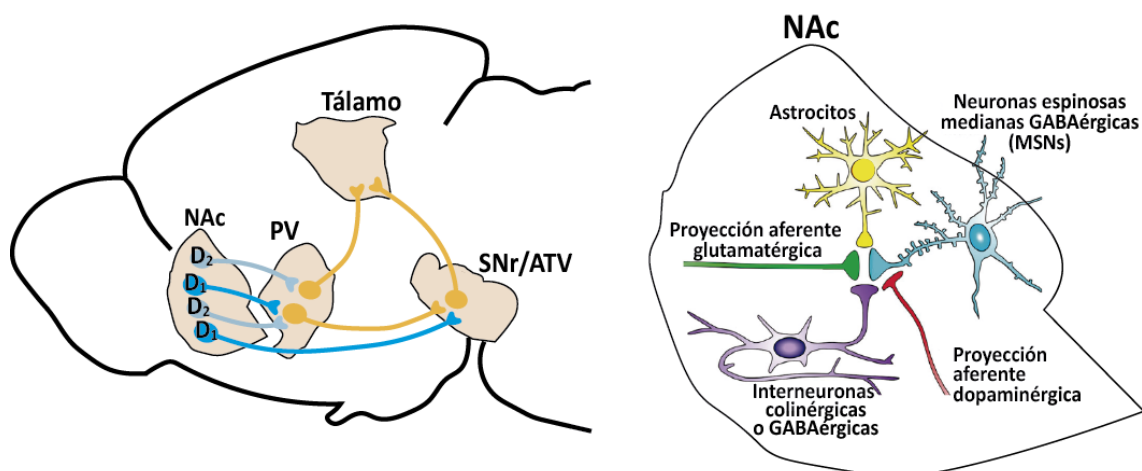


Figura 5. Panel izquierdo. Resumen esquemático de la conectividad de las MSNs-D₁ (celeste oscuro) y las MSNs-D₂ (celeste claro) del Núcleo Accumbens (NAc), basado en el modelo propuesto por Kupchik y Kalivas (2017) en referencia a la conceptualización clásica de las vías “directa” e “indirecta” que conectan al NAc con áreas encargadas del control motor. Más detalles en el texto. Todas las células ilustradas son de tipo GABAérgicas. PV=Pálido Ventral. SNr= Sustancia Nigra pars reticulata. ATV= Área Tegmental Ventral. **Panel derecho.** Esquema general de algunas de las células que componen el NAc y que regulan la actividad y la plasticidad sináptica de las MSNs. *Adaptado de Scofield y col. (2016).*

Según un modelo propuesto por Carlezon y Thomas (2009), ante circunstancias normales, las MSNs GABAérgicas que componen el NAc inhiben tónicamente los procesos relacionados con la recompensa y mantienen el balance entre las proyecciones excitatorias e inhibitorias que llegan y actúan sobre sus receptores glutamatérgicos y dopaminérgicos

ubicados en las dendritas. Se ha propuesto que el comportamiento dirigido está regulado por la formación y la activación de “ensambles” específicos entre neuronas individuales de NAc, aferentes y eferentes, que a su vez están influidos por diferentes mecanismos de plasticidad neuronal, es decir de regulación de la fuerza de la transmisión sináptica (Goto & Grace, 2008). Particularmente, para esta selección de subcircuitos neuronales son importantes las neuroadaptaciones duraderas que dependen no solamente de los receptores postsinápticos dopaminérgicos D₁ y D₂, sino también de los receptores glutamatérgicos ionotrópicos y metabotrópicos que también se expresan en las MSNs. De esta manera, estas neuronas son activadas por las proyecciones glutamatérgicas que llegan al NAc y, al mismo tiempo, las conexiones sinápticas de los microcircuitos específicos que se forman pueden ser reforzadas mediante diferentes mecanismos de plasticidad dependientes de la experiencia (Kelley, 2004; Sesack & Grace, 2010). Si bien es difícil demostrar directamente una correlación entre plasticidad sináptica y comportamiento, la evidencia neuroquímica y farmacológica demuestra que, por ejemplo, las proyecciones glutamatérgicas de CPf que llegan al NAc adquieren preponderancia a medida que el comportamiento de búsqueda de cocaína va siendo aprendido, y esto puede ser explicado por los diferentes tipos de neuroadaptaciones inducidas por la droga (Kalivas & Volkow, 2011; Wolf y col., 2004). Es por todo esto que resulta interesante estudiar cómo operan ciertos mecanismos celulares y moleculares en la selección y en la plasticidad diferencial de estos circuitos.

La cocaína, luego de un consumo crónico, produce cambios estructurales y funcionales en las sinapsis excitatorias de las MSNs de NAc al alterar la homeostasis de glutamato y “secuestrar o usurpar” los mecanismos de plasticidad. Algunos de los mecanismos que podemos mencionar como ejemplo son: disminución de los niveles extracelulares de glutamato por desregulación en la expresión y funcionamiento de transportadores glutamatérgicos (Kalivas, 2009), cambios en la densidad y morfología de las espinas dendríticas de las MSNs (Russo y col., 2010), cambios en la expresión en superficie de los receptores N-metil-D-Aspartato (NMDA) y α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazole ácido propiónico (AMPA) (Wolf & Ferrario, 2010) y cambios en la excitabilidad intrínseca de las MSNs por alteración de canales iónicos (X. T. Hu, 2007). De esta manera, la cocaína crónica altera los mecanismos celulares y moleculares que subyacen a los distintos tipos de plasticidad sináptica característicos de NAc, como la potenciación y la depresión a largo plazo (LTP y LTD

respectivamente) (Luscher & Malenka, 2011). En realidad, lo que se propone es que la cocaína induce **metaplasticidad** en NAc (Kalivas & O'Brien, 2008), es decir adaptaciones en las propiedades electrofisiológicas o en los umbrales o las reglas para inducir otros tipos de plasticidad y otros eventos sinápticos subsecuentes. Es de destacar la evidencia que sugiere que esta metaplasticidad influye en subsecuentes comportamientos relacionados con la droga, como la sensibilización conductual y la reinstalación.

En conjunto, las neuroadaptaciones homeostáticas y sinápticas inducidas por una droga a nivel del sistema glutamatérgico de NAc no solo refuerzan los comportamientos aprendidos y las asociaciones con claves externas, sino que también incrementan el umbral de plasticidad para otros estímulos ambientales no asociados con la droga. De esta manera, se sugiere que el resultado conductual de las neuroadaptaciones en NAc inducidas por cocaína consiste, en términos generales, en una transición desde comportamientos “más declarativos” a comportamientos adaptativos “más automáticos” que se dan sin mucha influencia de la conciencia (hábitos), lo cual implica una pérdida de control en la toma de decisiones pudiendo desencadenar la recaída luego de un período de abstinencia (Everitt y col., 2001; Floresco, 2015). Por último, se debe tener en cuenta que la complejidad de las adaptaciones neuronales en el NAc depende del régimen de consumo de la cocaína, el tiempo de abstinencia, el tipo de célula, su localización (NAc Core vs. NAc Shell) y las interacciones específicas con otras células, o una combinación de todos estos factores (Zinsmaier y col., 2021).

Neurobiología de la reinstalación de la búsqueda de cocaína inducida por estrés

A partir del uso del *footshock* como estresor en varios modelos conductuales, incluidos los de reinstalación, se estableció que varias áreas del sistema mesocorticolímbico se activan por el estrés, como por ejemplo los núcleos que componen la Amígdala Extendida Central, la CPf, el ATV, el Estriado y el NAc (Deutch y col., 1991; Kreek & Koob, 1998). Los principales sistemas de neurotransmisión que responden a la exposición aguda a un estresor en estas áreas son el de dopamina, el de glutamato y el de noradrenalina (Baik, 2020; Popoli y col., 2011; Vermetten & Bremner, 2002). Además, otros sistemas con una función más moduladora, como el de las hormonas del estrés o el de los cannabinoides endógenos, también forman parte de los mecanismos que se activan ante un estímulo estresante (Herman y col., 2016; Volkow y col., 2017). Los núcleos de la Amígdala Extendida Central, que se sabe

que subyacen el procesamiento del significado emocional y conductual de estresores (de Olmos & Heimer, 1999), proyectan hacia ATV neuronas que contienen a una de las principales hormonas del estrés, el factor liberador de corticotrofina (CRF) (Rodaros y col., 2007). El aumento de liberación de CRF en ATV, inducido por el estrés, cumple la función de coordinar la transmisión glutamatérgica y dopaminérgica en esta área (Mantsch y col., 2014; Wise & Morales, 2010). A su vez, se ha reportado que los estímulos estresantes también incrementan la dopamina y el glutamato en la CPf y en el NAc (Deutch & Roth, 1990; Gresch y col., 1994; Imperato y col., 1992; Kalivas & Duffy, 1995; Moghaddam, 1993). Interesantemente, varios de estos mecanismos parecen activarse sólo en animales con una historia previa con cocaína (B. Wang y col., 2005; Wise & Morales, 2010). Por lo tanto, quedan establecidos dos aspectos importantes: primero, que el estrés y la cocaína comparten sustratos neurobiológicos a través de los cuales el estrés puede influir en los comportamientos relacionados a la droga; y segundo, que la neuroplasticidad inducida por el consumo repetido de cocaína desregula la respuesta neurobiológica y comportamental al estrés.

Las principales hipótesis que intentan explicar el rol de estrés en la reinstalación se basan en las similitudes y diferencias que existen, a nivel neurobiológico, en comparación con la reinstalación inducida por otros estímulos, como una dosis desafío de la droga y claves asociadas al consumo de la misma (Mantsch y col., 2016). En este sentido, estudios previos reportan que la reinstalación inducida por claves recae en las proyecciones dopaminérgicas desde ATV hacia BLA, que sucesivamente proyecta hacia la CPf (J. McLaughlin & See, 2003); mientras que la reinstalación inducida por cocaína parece estar mediada por conexiones entre ATV y CPf (McFarland & Kalivas, 2001). A diferencia de estos dos tipos de reinstalación, la reinstalación inducida por estrés involucra al circuito de la Amígdala Extendida Central, que subsecuentemente activa a la CPf dorsomedial vía ATV (ver [Figura 6](#)) (McFarland y col., 2004). Varios estudios que emplearon diferentes métodos como inactivación reversible con tetrodotoxina o agonistas GABAérgicos y antagonistas de receptores dopaminérgicos, también establecieron que la Corteza Orbitofrontal y el Pálido Ventral, como así también el NAc Core y el NAc Shell, cumplen un rol importante en la reinstalación inducida por estrés bajo diferentes paradigmas (Capriles y col., 2003; McFarland y col., 2004; Sanchez y col., 2003; Xi y col., 2004). Además, cabe destacar la importancia de CRF, particularmente en ATV, BNST y el Núcleo Central de la Amígdala, para la reinstalación de la búsqueda de cocaína inducida

por *footshock* (Erb y col., 2001; Shalev y col., 2010; Vranjkovic y col., 2014; B. Wang y col., 2005). Cabe destacar que la inactivación de BLA y de hipocampo no tuvo efectos en la reinstalación inducida por estrés pero no se descarta su contribución (Mantsch y col., 2016). Otros procesos relacionados con las hormonas del estrés también están implicados en este modelo de reinstalación, como la plasticidad neuronal dependiente de glucocorticoides y la regulación en la producción de cannabinoides endógenos (Mantsch y col., 2014; Volkow y col., 2017). En resumen, la principal hipótesis para explicar la reinstalación sería que el estrés modula la transmisión sináptica de las principales áreas del circuito de la motivación. Actualmente, la investigación neurofarmacológica está haciendo foco en la interacción entre los sistemas de neurotransmisión y los de neuromodulación (como el cannabinoide endógeno y el opioide) para entender la contribución del estrés en la regulación de conductas relacionadas con las drogas.

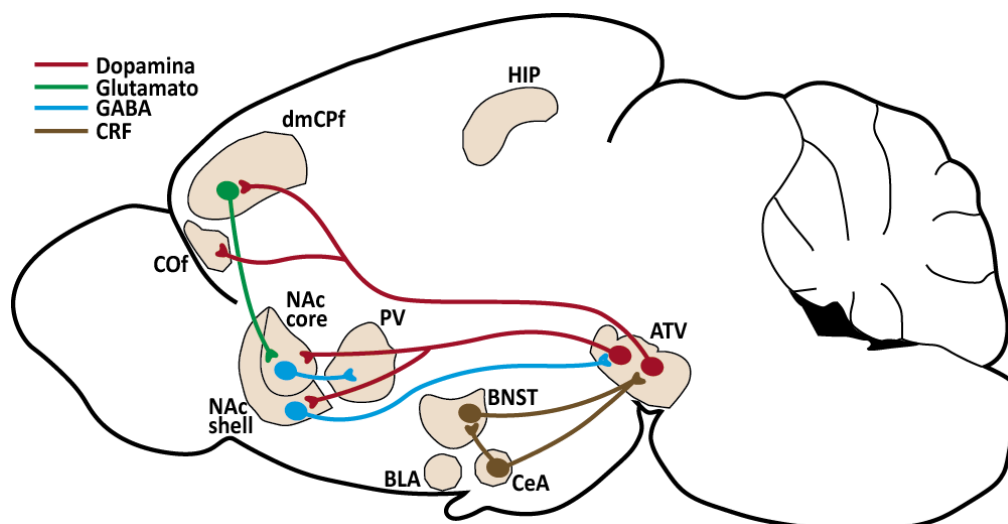


Figura 6. Circuito involucrado en la reinstalación inducida por estrés. Representación esquemática de las principales áreas cerebrales, proyecciones neuronales y sistemas de neurotransmisión involucrados en la reinstalación a la búsqueda de cocaína inducida por un estresor, bajo los paradigmas de autoadministración y de CPP en roedores. ATV= Área Tegmental Ventral, dmCPf= Corteza Prefrontal dorsomedial, NAc Core= Núcleo Accumbens Core, NAc Shell= Núcleo Accumbens Shell, PV= Pálido Ventral, COF= Corteza Orbitofrontal, CeA= Núcleo Central de la Amígdala, BNST= Núcleos del Lecho de la Estría Terminal, BLA= Amígdala Basolateral, HIP= hipocampo. Más detalles en el texto. *Adaptado de Mantsch y col. (2016).*

Interesantemente, en los últimos años se ha establecido que los distintos tipos de estímulos que pueden desencadenar la reinstalación de la búsqueda de cocaína (y de otras drogas) comparten una vía en común: las proyecciones glutamatérgicas que van desde CPf dorsomedial hacia NAc Core (Kalivas, 2009). Específicamente, se ha visto que la inhibición farmacológica de la liberación de glutamato en NAc Core, la estimulación de auto-receptores inhibitorios o el bloqueo de los receptores AMPA producen la supresión de la reinstalación

inducida por una dosis desafío de cocaína (Baker y col., 2003; Cornish & Kalivas, 2000; McFarland & Kalivas, 2001; McFarland y col., 2003; W. K. Park y col., 2002; Peters & Kalivas, 2006; Suto y col., 2004). Trabajos que emplearon la técnica de microdiálisis para coleccionar neurotransmisores desde el fluido extracelular reportan un aumento de la concentración de glutamato, pero no de dopamina, en NAc Core en asociación a la reinstalación de búsqueda de cocaína o heroína, pero no de un reforzador natural, inducida por la exposición a claves asociadas a la droga (LaLumiere & Kalivas, 2008; McFarland y col., 2004; McFarland y col., 2003). Además, se ha visto en algunos trabajos que la actividad neuronal de la CPf dorsomedial y de NAc Core, pero no Shell, es requerida para la reinstalación (Di Ciano y col., 2008; Fuchs y col., 2007; Fuchs y col., 2004; McFarland y col., 2003). Otros estudios que emplearon métodos más modernos, como la optogenética que permite inhibir proyecciones específicas en el momento deseado, también reportan la importancia del circuito CPf-NAc Core en la reinstalación inducida por re-exposición a la cocaína o a claves previamente apareadas a la misma (Ma y col., 2014; Stefanik y col., 2016; Stefanik y col., 2013). Incluso, en un estudio similar también se reporta que la vía BLA-NAc Core participa de la reinstalación inducida por claves (Stefanik & Kalivas, 2013). Con respecto a la reinstalación inducida por estrés, el esquema del circuito involucrado es más bien especulativo ya que hasta la fecha no se reportan estudios que empleen métodos que inhiban vías específicas, pero si podemos encontrar evidencia neuroquímica y neurofarmacológica que demuestra que la transmisión glutamatérgica en CPf dorsomedial y NAc Core es crucial para este tipo de reinstalación (ver [Figura 6](#)). Por ejemplo, McFarland (2004) reporta que el incremento de glutamato, pero no de dopamina, en muestras de microdializado de NAc Core, pero no de NAc Shell, fue observado luego del *footshock* y, a su vez, este aumento fue bloqueado por inhibición de la CPf dorsomedial. En esta misma línea, bajo nuestro protocolo de CPP, resultados previos de nuestro laboratorio demuestran que la reinstalación inducida por un estrés de inmovilización fue bloqueada por el antagonismo de los receptores glutamatérgicos NMDA de NAc Core, pero no Shell (De Giovanni y col., 2016). En conclusión, todo parece indicar que la transmisión glutamatérgica en NAc Core constituye un blanco terapéutico efectivo para prevenir la recaída estudiada bajo diferentes paradigmas conductuales y ante diferentes estímulos desencadenantes de la misma (Kalivas & Volkow, 2011).

El desafío actual es encontrar herramientas terapéuticas efectivas que permitan minimizar el impacto de distintos tipos de estrés, en conjunto con la influencia de otros estímulos, sobre el consumo de distintos tipos de drogas de abuso y teniendo en cuenta la variabilidad entre individuos. Particularmente, resulta interesante encontrar estrategias farmacológicas que modulen la transmisión glutamatérgica por algún mecanismo que no sea directamente el agonismo o el antagonismo de receptores glutamatérgicos. Es por este motivo que se proponen estrategias que regulen más bien la homeostasis de glutamato en NAc particularmente, con el objetivo de prevenir una estimulación excesiva de los receptores glutamatérgicos de las MSNs durante la reinstalación.

Desregulación de la homeostasis de glutamato en Núcleo Accumbens y reinstalación de la búsqueda de cocaína

La **homeostasis glutamatérgica** involucra la modulación de los niveles de glutamato en el espacio extracelular, ya sea sináptico o perisináptico, mediante el balance entre sus mecanismos de liberación y de eliminación o recaptación ([Figura 7](#)). De esta manera, dentro del grupo de proteínas involucradas en el mantenimiento de un equilibrio dinámico de glutamato entre el espacio intracelular y el extracelular podemos incluir a la enzima glutaminasa encargada de su síntesis a partir de glutamina, al transportador vesicular (VGLUT) implicado en el empaquetamiento de glutamato en vesículas presinápticas (Takamori, 2006), al transportador glial que intercambia una molécula de cistina extracelular por una de glutamato intracelular, más conocido como intercambiador cistina/glutamato o Xc-, y a los transportadores de aminoácidos excitatorios (EAAT) presentes en astrocitos, como el EAAT2/GLT-1 que recapta el glutamato (Danbolt, 2001; Rothstein y col., 1994). La co-regulación de estos dos últimos tipos de transportadores extraneuronales (Xc- y GLT-1), junto con la liberación sináptica de glutamato, constituyen la fuente principal de glutamato extracelular (Danbolt, 2001). Los receptores metabotrópicos de glutamato (mGluRs, acoplados a proteína G estimuladora o inhibitoria) también juegan un papel fundamental en la homeostasis glutamatérgica. Existen 8 tipos diferentes de mGluRs y se pueden agrupar en tres grupos diferentes según su estructura, homología en la secuencia genética, propiedades farmacológicas y transducción de señales (Conn & Pin, 1997; Ferraguti & Shigemoto, 2006). El Grupo I está compuesto por los receptores mGluR-1 y mGluR-5, su principal efector es la enzima fosfolipasa C (PLC) y de este modo aumentan la producción intracelular de segundos

mensajeros como el inositol trifosfato (IP₃) y el diacilglicerol (DAG). En general estos receptores se expresan en la neurona postsináptica y su activación prolonga la excitabilidad neuronal mediante la activación de los receptores ionotrópicos o una repolarización lenta debido al aumento de calcio intracelular (Ca²⁺) y disminución de la conductancia de los canales de potasio (K⁺). El Grupo II se compone de los receptores mGluR-2 y mGluR-3, y el Grupo III se compone de los receptores mGluR-4, mGluR-6, mGluR-7 y mGluR-8. Ambos grupos se encuentran acoplados a proteínas G inhibitoria y son activados por glutamato no sináptico. De esta manera, estos receptores funcionan como auto-receptores inhibitorios ya que al suprimir la actividad de la enzima adenilato ciclasa y la formación de adenosín monofosfato cíclico (AMPc), al aumentar la conductancia de los canales de K⁺ y al bloquear los canales de Ca²⁺ dependientes de voltaje, inhiben finalmente la liberación de glutamato desde la neurona presináptica. Cabe destacar que los mecanismos de transmisión/plasticidad sináptica y de homeostasis ejercen un control recíproco entre sí, ya que al mismo tiempo que los receptores ionotrópicos y los metabotrópicos pueden regular la transmisión y liberación de glutamato, los mecanismos de control de los niveles extracelulares de glutamato (transportadores) controlan el acceso de glutamato a dichos receptores.

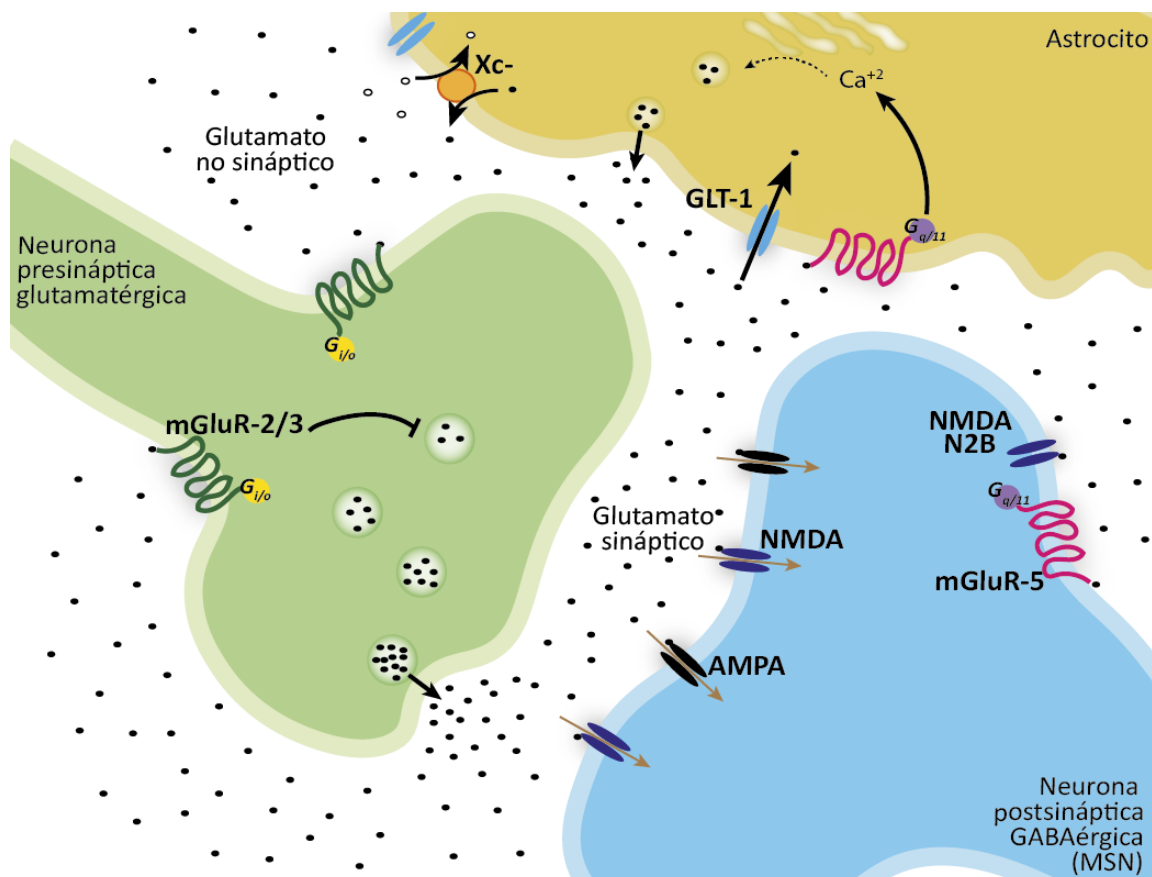


Figura 7. Homeostasis de glutamato en NAc. La liberación presináptica de glutamato es regulada negativamente por el receptor metabotrópico mGluR-2/3, acoplado a proteína G inhibitoria. La recaptación de glutamato, a través del transportador glial GLT-1, limita el acceso del glutamato sináptico al espacio perisináptico y a los receptores metabotrópicos (mGluR-2/3 y mGluR-5). También se ve limitado el acceso del glutamato no sináptico (liberado a través de mecanismos vesiculares o no vesiculares como el intercambiador de cistina/glutamato, Xc-) al espacio sináptico y a los receptores ionotrópicos. De esta manera, el glutamato extracelular, ya sea de origen sináptico o no sináptico, puede modular la plasticidad sináptica y la transmisión excitatoria en las sinapsis de las MSNs. El receptor metabotrópico mGluR-5 neuronal y el receptor ionotrópico NMDA que contiene la subunidad N2B, ubicados en la neurona postsináptica, median los procesos de plasticidad sináptica en las MSNs del NAc. El receptor metabotrópico mGluR-5 astroglial media la liberación de glutamato desde astrocitos al aumentar la concentración de Ca^{+2} intracelular. Las flechas sólidas negras representan la dirección de liberación de glutamato. Las flechas sólidas claras representan la dirección de flujo de cationes a través de los receptores ionotrópicos (AMPA y NMDA). *Adaptado de Kalivas (2009) y Scofield y col. (2016).*

La principal hipótesis que se propone para explicar la importancia de glutamato de NAc Core en la recaída al consumo de cocaína se relaciona con la desregulación de la homeostasis de glutamato que sucede luego de la exposición crónica a la droga y de la abstinencia (Kalivas, 2009). Como fue mencionado anteriormente, la cocaína es capaz de inducir neuroadaptaciones homeostáticas que persisten en el tiempo y causan un cambio en la línea basal para la ocurrencia de otros eventos celulares o electrofisiológicos. Por ejemplo, numerosos trabajos reportan que luego de la administración crónica de cocaína (contingente y no contingente) y de un período de extinción y abstinencia, se encuentran disminuidos los niveles basales de glutamato extrasináptico en NAc (Bell y col., 2000; Hotsenpiller y col., 2001; Pierce y col., 1996) debido a una desregulación en la actividad del transportador glial Xc- (Baker y col., 2003; Madayag y col., 2007; Moussawi y col., 2011) o a una disminución en la expresión del transportador GLT-1 (Fischer-Smith y col., 2012; Knackstedt y col., 2010; Trantham-Davidson y col., 2012). Esta disminución progresiva del glutamato basal tiene como resultado la posterior potenciación de la señal postsináptica sobre las MSNs y de la probabilidad de liberación presináptica de glutamato ante la administración de una dosis de cocaína en la reinstalación, probablemente por una reducción en el tono inhibitorio del autorreceptor glutamatérgico mGluR-2/3 ubicado en la perisinapsis (Moran y col., 2005; Moussawi y col., 2011; Xi y col., 2006). Interesantemente, tanto la reinstalación como los eventos celulares relacionados con una alteración de la homeostasis glutamatérgica fueron revertidos al reestablecer la función de los transportadores y, por consiguiente, los niveles de glutamato extracelular (Baker y col., 2003; Kau y col., 2008; Kupchik y col., 2012; Mahler y col., 2014; Moran y col., 2005; Moussawi y col., 2011).

La desregulación de la homeostasis glutamatérgica inducida por la cocaína puede derivar en un “**desborde**” de glutamato (conocido como *spillover* en inglés) en las sinapsis

excitatorias de NAc ante la presentación de un estímulo que induce liberación sináptica de glutamato durante la reinstalación (Mulholland y col., 2016). Este desborde de glutamato está controlado en parte por los receptores presinápticos mGluR-2/3, los cuales modulan negativamente la probabilidad de liberación de glutamato (Anwyl, 2009), de manera que el agonismo de los mGluR-2/3 en NAc Core bloquea (Peters & Kalivas, 2006), y el antagonismo potencia (Moussawi y col., 2011) la reinstalación a la búsqueda de cocaína. Por otro lado, existen evidencias que indican que el *spillover* en NAc impacta sobre la activación de los receptores metabotrópicos mGluR-5 (Smith y col., 2017) y sobre los receptores ionotrópicos NMDA extrasinápticos (Moussawi y col., 2009). En experimentos realizados *in vivo* y *ex vivo*, las consecuencias de la desregulación de la homeostasis glutamatérgica y del *spillover* transitorio de glutamato en NAc se reflejan en una subsecuente alteración de la potenciación sináptica. Por ejemplo, se ha visto que en animales en abstinencia, la reinstalación a la búsqueda de cocaína, heroína y nicotina se da en paralelo a una marcada potenciación sináptica transitoria en las MSNs de NAc Core (Gipson, Kupchik, y col., 2013; Gipson, Reissner, y col., 2013; H. W. Shen y col., 2014; Stankeviciute y col., 2014). Esta potenciación parece estar relacionada con la activación de los receptores mGluR-5 y NMDA que contiene la subunidad N2B, ya que su activación produce el incremento de la concentración de Ca^{+2} intracelular en la postsinapsis (Anwyl, 2009; Gnegy, 2000; Yashiro & Philpot, 2008), y el uso de antagonistas de estos receptores bloquea la reinstalación a la búsqueda de distintas drogas de abuso (Bespalov y col., 2005; Gass y col., 2009; Gipson, Reissner, y col., 2013; Kumaresan y col., 2009; Ma y col., 2007; Schroeder y col., 2008; H. Shen y col., 2011; H. W. Shen y col., 2014; X. Wang y col., 2013). Incluso, la reinstalación a la AA de cocaína inducida por estrés (*footshock*) pudo ser inhibida por la administración de 3-2-Metil-4-thiazolil etinil piridina (MTEP), un antagonista específico de los mGluR-5 (Martin-Fardon & Weiss, 2012). Resulta interesante que la activación de los receptores mGluR-5 no sólo tiene efectos a nivel postsináptico como los que acabamos de mencionar, sino también a nivel presináptico como el bloqueo de la liberación de glutamato. Este efecto ha sido atribuido a la capacidad de los mGluR-5 de inducir la producción de cannabinoides endógenos que actúan como mensajeros retrógrados influyendo en la probabilidad de liberación de glutamato desde la neurona presináptica (Centonze y col., 2007; Li y col., 2018; Robbe y col., 2002). De esta manera, se establece que existe una estrecha relación entre la homeostasis glutamatérgica, el sistema de

neuromodulación endocannabinoide y la transmisión excitatoria inducida por un estímulo, como una droga o el estrés (Volkow y col., 2017).

Monitoreo *in vivo* de los niveles de glutamato extracelular

Una de las técnicas que ha permitido recabar mucha información acerca de los cambios en los niveles de glutamato en el compartimento extracelular y acerca de la modulación de la homeostasis glutamatérgica en el cerebro es la **microdiálisis *in vivo***. Esta técnica, usada desde los años 90' (Westerink & Justice Jr, 1991), es una herramienta útil para monitorear localmente los niveles de neurotransmisores mediante la recolección directa de muestras de fluido extracelular en animales vivos y en libre movimiento, para luego separar y cuantificar las moléculas mediante cromatografía líquida acoplada a un sistema de detección específico y sensible (Parent y col., 2001; Torregrossa & Kalivas, 2008).

Muchos de los trabajos citados en referencia a la homeostasis de glutamato utilizaron la técnica de microdiálisis *in vivo*, o alguna de sus variantes, para demostrar que luego de la administración crónica de cocaína (contingente y no contingente) y de un período de extinción y abstinencia, se encuentran disminuidos los niveles basales de glutamato en NAc (Baker y col., 2003; Baker y col., 2002; Bell y col., 2000; Hotsenpiller y col., 2001; Li y col., 2018; McFarland y col., 2003; Miguens y col., 2008; Pierce y col., 1996; Xi y col., 2006). Se entiende por **niveles basales de glutamato extracelular** a la concentración en equilibrio determinada en ausencia de estímulos discretos disparadores de la liberación presináptica de glutamato por despolarización. El "glutamato basal" proviene de diversas fuentes, tales como la neurona o las células gliales, y existen diversos mecanismos que lo modulan, tales como la liberación vesicular espontánea o la liberación a través de transportadores específicos. A su vez, el "glutamato basal" también está regulado por la actividad de recaptadores astrogliales y receptores metabotrópicos presinápticos y astrogliales, es decir por todos aquellos mecanismos que regulan la homeostasis de glutamato. El método de **No Net Flux** es una variante de la técnica de microdiálisis *in vivo* que consiste en administrar dosis crecientes de concentraciones conocidas de glutamato a través de la *probe* de microdiálisis a los fines de determinar la concentración absoluta de glutamato en el medio extracelular según el punto de equilibrio o punto cero de flujo neto entre glutamato endógeno y glutamato exógeno (Chefer y col., 2009). Los niveles basales de glutamato extracelular también pueden ser

inferidos a partir de las muestras recolectadas en condiciones basales, es decir, mientras los animales permanecen en una caja de experimentación antes de la aplicación de algún tratamiento o estímulo en particular (Baker y col., 2003; Baker y col., 2002; Hotsenpiller y col., 2001; Li y col., 2018; McFarland y col., 2003; Miguens y col., 2008; Xi y col., 2006).

Como ya se mencionó, la técnica de microdiálisis *in vivo* también permite detectar cambios de carácter transitorio en los niveles de glutamato extracelular de un área cerebral determinada, en respuesta a un estímulo particular que active las vías aferentes que llegan a dicha área. Estos cambios normalmente se reportan en valores porcentuales con respecto a los valores determinados inmediatamente antes del estímulo para el mismo animal, es decir con respecto a una línea basal establecida. Por ejemplo, en uno de los trabajos de referencia para esta tesis (McFarland y col., 2004) se toman muestras de microdiálisis mientras el animal permanece dentro de la caja de conducta operante antes y durante el test de reinstalación inducida por una sesión de *footshock*, y se observa un aumento del glutamato extracelular en NAc Core luego de la aplicación del estresor.

Si bien se ha discutido acerca del origen del glutamato que se recolecta en los microdializados (si es de origen sináptico o no sináptico, neuronal o glial) (Timmerman & Westerink, 1997), numerosos trabajos reportan que la presentación de estímulos que disparan la búsqueda de droga producen un aumento de glutamato extracelular en NAc que es detectado en las muestras de microdiálisis y que tiene un origen típicamente neuronal debido a que se inhibe al bloquear los canales de Na^+ o de Ca^{+2} o al inactivar las áreas que envían proyecciones hacia el NAc (Bell y col., 2000; Hotsenpiller y col., 2001; McFarland y col., 2004; Moghaddam, 1993; Pierce y col., 1996). En otras áreas, como ATV y la CPf, el estrés también puede producir aumento de la liberación presináptica de glutamato durante la reinstalación, en niveles perfectamente detectables mediante la técnica de microdiálisis (P. Liu y col., 2017; Qi y col., 2009; B. Wang y col., 2005).

Los resultados arrojados por el análisis neuroquímico de las muestras de microdiálisis *in vivo* acompañan a las conclusiones alcanzadas en estudios de neurofarmacología, electrofisiología y optogenética que sustentan la idea de que la liberación de glutamato en NAc Core es necesaria y se correlaciona con la conducta de búsqueda de droga.

EL SISTEMA ENDOCANNABINOIDE

El sistema cannabinoide endógeno o sistema endocannabinoide (SEC) constituye un sistema de comunicación intercelular filogenéticamente antiguo, distribuyéndose a lo largo de diferentes especies de vertebrados e invertebrados. Este sistema de señalización, que consiste en receptores, ligandos endógenos y las proteínas encargadas de su síntesis, degradación y recaptación, se empezó a conocer con más precisión desde el año 1988 con la identificación, localización y clonación de los receptores cannabinoides tipo 1 (CB₁Rs) (Devane y col., 1988; Herkenham y col., 1990; Matsuda y col., 1990). Este importante descubrimiento surgió principalmente de la pregunta “¿por qué nuestro cerebro reacciona ante el consumo de *Cannabis sativa* L.?” con lo cual, gracias a la previa identificación del principal componente psicoactivo de esta planta, el (-)- Δ^9 -tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC) (Gaoni & Mechoulam, 1964; Mechoulam y col., 1970), fue posible el desarrollo de múltiples métodos que permitieron ampliar significativamente nuestro conocimiento acerca de los efectos de *Cannabis sativa*, pero sobre todo del importante rol del SEC en los mamíferos.

Existen evidencias, a nivel preclínico y clínico, que relacionan el SEC con diversos desórdenes del SNC, entre ellos la adicción a las drogas (Skaper & Di Marzo, 2012; Sloan y col., 2017). Incluso, varios estudios muestran concordancia entre las acciones neurofarmacológicas de los cannabinoides y los psicoestimulantes, proveyendo evidencia de que los endocannabinoides podrían jugar un rol importante en la adicción a cocaína.

Receptores Cannabinoides

Hasta el momento, se han clonado dos tipos de receptores cannabinoides, los tipo 1 y los tipo 2 (CB₁R y CB₂R) (Matsuda y col., 1990; Munro y col., 1993). Los CB₁Rs son considerados como los principales receptores neuronales del SEC, mientras que los CB₂Rs están localizados preferentemente en los tejidos periféricos, en especial en el bazo y en aquellas células asociadas al sistema inmunológico (Klein y col., 2003). Sin embargo, este concepto un poco simplificado ha ido cambiando a lo largo de los últimos años y actualmente encontramos evidencias de que la activación de los CB₂Rs también tiene efectos centrales, en la regulación de la emesis, en la respuesta anti-neuroinflamatoria y en los efectos gratificantes de la cocaína (Rom & Persidsky, 2013; Van Sickle y col., 2005; Xi y col., 2011), y que los CB₁Rs también están

presentes en la periferia y cumplen importantes funciones fisiológicas y fisiopatológicas (Kunos y col., 2009).

Particularmente los CB₁Rs, constituyen los receptores ligados a proteína Gi/Go más abundantes y más extensamente distribuidos del cerebro de roedores y humanos (Herkenham y col., 1991; Tsou y col., 1998; Westlake y col., 1994) y su activación es la que da lugar a los efectos típicos conocidos tras el consumo de *Cannabis sp.* Los CB₁Rs se expresan en áreas del SNC que contribuyen al control del movimiento (núcleos basales y cerebelo), cognición y memoria (hipocampo y corteza), procesamiento de emociones y respuestas motivacionales (amígdala, NAc, corteza olfatoria), percepción dolorosa (sustancia gris central, asta dorsal de la médula espinal), e integración neuroendócrina (núcleos paraventricular, arcuato, supraóptico y ventro-medial) (Herkenham y col., 1991; S. S. Hu & Mackie, 2015; Mailleux & Vanderhaeghen, 1992; Matsuda y col., 1993). De esta manera, los CB₁Rs han sido involucrados en un amplio espectro de condiciones fisiológicas y patológicas, incluidos también los procesos inflamatorios, psiquiátricos y del desarrollo del cerebro (Katona & Freund, 2012; Lutz y col., 2015; Mechoulam & Parker, 2013). A nivel celular, se sabe que los CB₁Rs se expresan en las principales células del SNC, es decir en neuronas, astrocitos, oligodendrocitos y microglia (Araujo y col., 2019; Ilyasov y col., 2018; Navarrete & Araque, 2008). Los tipos de neuronas en las que los CB₁Rs se expresan pueden ser aquellas que liberan glutamato, GABA, noradrenalina, acetilcolina, CRF, dopamina, serotonina, opioides y colecistoquinina (Alger, 2002; Kano y col., 2009). El nivel de expresión de los CB₁Rs puede variar según la región del cerebro y según el tipo celular. Sin embargo, una expresión abundante de este receptor no indica necesariamente una mayor contribución en algún proceso fisiológico particular (Lutz, 2020). Con respecto a la localización subcelular, se sabe que los CB₁Rs se expresan principalmente en la membrana presináptica, aunque también se encuentran en axones, cuerpos celulares y dendritas (Matyas y col., 2006; Tsou y col., 1998), viéndose implicados directa o indirectamente en la liberación de neurotransmisores y otros neuromoduladores (Castillo y col., 2012). Algunos estudios electrofisiológicos sugieren que los CB₁Rs pueden estar presente en la postsinapsis, aunque más bien a nivel intracelular (Busquets-García y col., 2018). En este sentido, se ha reportado que gran parte de los CB₁Rs intracelulares se encuentran en endosomas/lisosomas debido a que estos receptores se sintetizan en el soma y son transportados hasta su ubicación final (Rozenfeld, 2011), además de que su actividad

está altamente regulada por un proceso continuo de internalización y transporte retrógrado (Hsieh y col., 1999; Leterrier y col., 2004). Por otro lado, los CB₁Rs también están presentes en la membrana externa de las mitocondrias de neuronas y astrocitos (pueden encontrarse en la bibliografía como *mt-CB₁ receptors*), en donde median procesos como la respiración celular, la producción de energía, el metabolismo de glucosa y la producción de lactato (Benard y col., 2012; Jimenez-Blasco y col., 2020). En la [Figura 8](#) se esquematiza la localización celular y subcelular de los CB₁Rs.

Los CB₁Rs cumplen su rol modulador sobre la neurotransmisión a través de la inhibición de la adenilato ciclasa, la activación de proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPKs), la disminución de las corrientes de Ca⁺² y la modulación de varios conductores de K⁺ (ver revisiones: Castillo y col., 2012; Freund y col., 2003; Kano, 2014; Ohno-Shosaku & Kano, 2014). Esta cascada de señalización desencadenada por la unión de ligandos específicos cannabinoides, principalmente a nivel presináptico, sería la responsable de la inhibición de la liberación de neurotransmisores sobre el terminal neuronal. De esta manera, la activación de los CB₁Rs protege al sistema nervioso de la sobre-activación o la sobre-inhibición provocada por los neurotransmisores. Más específicamente, ante la activación de los CB₁Rs la proteína G asociada se desacopla e interactúa con los canales iónicos, llevando a la inhibición transitoria de los canales de Ca⁺² (principalmente de tipo N y Q/P) y a la activación de canales de K⁺ rectificadores de entrada acoplados a proteína G (por interacción directa con las subunidades βγ). En consecuencia, se suprime la exocitosis de vesículas presinápticas, por lo cual se señala que los CB₁Rs modulan la liberación de neurotransmisores (GABA y glutamato principalmente). Las acciones más lentas de los CB₁Rs se deben a la inhibición de la actividad de la adenilato ciclasa, la consecuente reducción de la conversión de adenosín trifosfato (ATP) en AMPc y la inhibición de proteinquinasa A (PKA) (Turu & Hunyady, 2010). Todo esto conduce a una disminución en la concentración de mensajeros intracelulares que participan en la transcripción de genes y diversas funciones sinápticas. Los CB₁Rs que se expresan en astrocitos están acoplados a proteína Gq/11 estimuladora y su activación conduce a la estimulación de la fosfolipasa C (PLC), producción de inositol trifosfato (IP₃), aumento de liberación de Ca⁺² intracelular y posterior liberación de glutamato (Navarrete & Araque, 2008; Navarrete y col., 2014). En la [Figura 8](#) se esquematizan los eventos subcelulares que ocurren ante la activación de los CB₁Rs.

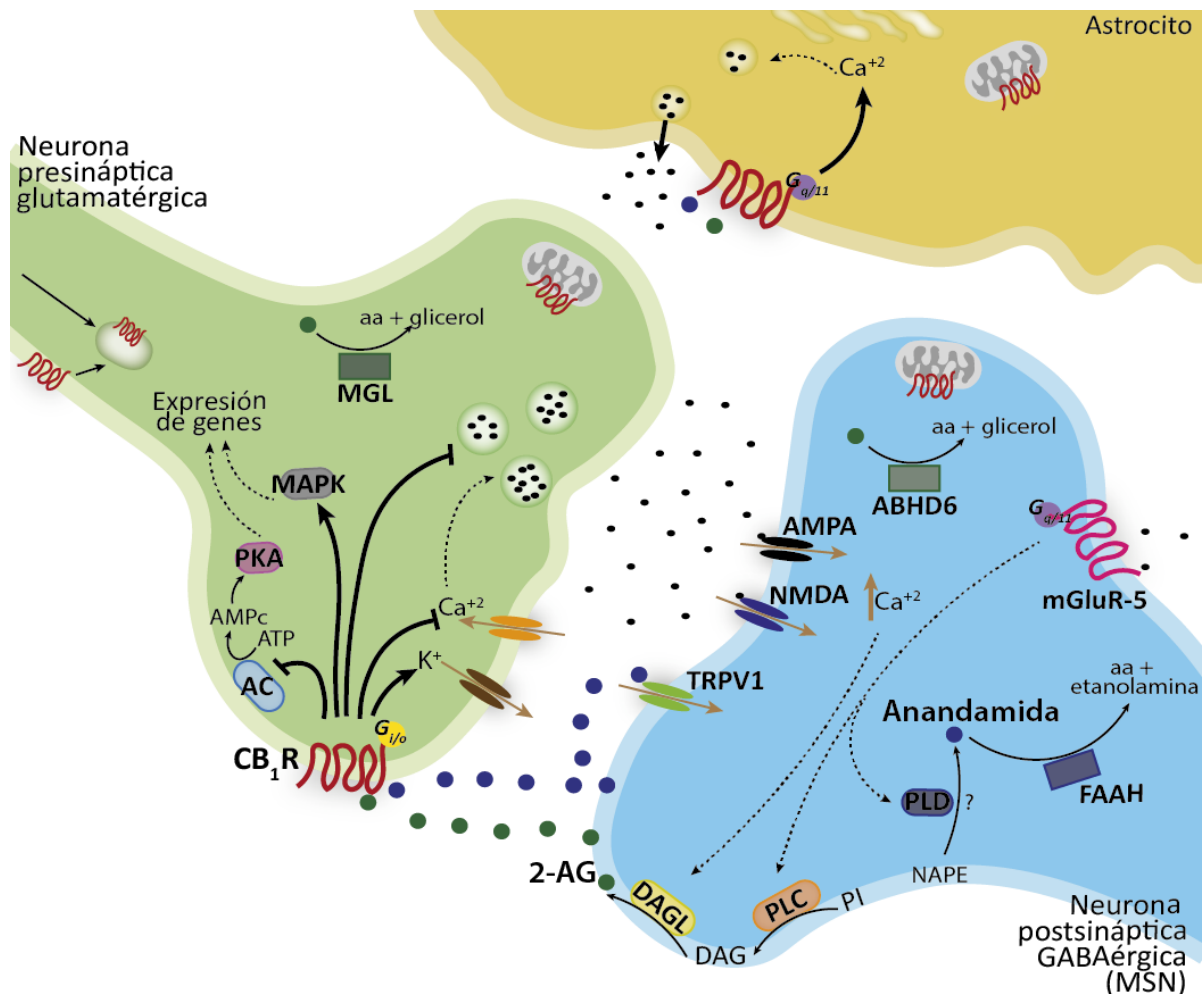


Figura 8. Representación esquemática de la localización celular y subcelular de los CB₁R y su mecanismo de acción en una sinapsis glutamatérgica. En esta figura también se incluyen los mecanismos de producción y degradación de endocannabinoides. Abreviaturas y más detalles en el texto. *Adaptado de Moreira y col. (2015), Kano y col. (2014) y Busquets-García y col. (2018).*

Cabe destacar que gran parte de las publicaciones en relación al mecanismo de acción de los CB₁R han utilizado aplicaciones exógenas y relativamente duraderas de altas concentraciones de agonistas. Muchos otros trabajos sugieren que los mecanismos *in vivo* son mucho más complejos y varían de una sinapsis a otra, e incluso dentro de la misma terminal se pueden reclutar varias vías de transducción de señal después de la activación de los CB₁R (Chevalyere y col., 2006).

De manera interesante, existen otros receptores que interactúan con cannabinoides endógenos y exógenos. Por ejemplo, el receptor vanilloide de potencial transitorio tipo 1 (TRPV-1) (Ross, 2003; Smart y col., 2000). Este receptor es un canal no selectivo de cationes, con una mayor permeabilidad al Ca²⁺, que se encuentra a nivel pre y post-sináptico, y co-localiza con los CB₁R en varias áreas del cerebro, incluido el NAc (Cristino y col., 2006;

Pertwee y col., 2010). Al activarse por endocannabinoides pueden facilitar la liberación presináptica de glutamato (Marinelli y col., 2003; Musella y col., 2009) y a nivel postsináptico pueden participar en diferentes procesos de plasticidad sináptica y en la inhibición de la síntesis de endocannabinoides (Chavez y col., 2010; Gibson y col., 2008). Otro ejemplo importante de receptores activados por cannabinoides es el GPR55, un receptor acoplado a proteína $G_{\alpha 13}$ cuya activación eleva los niveles intracelulares de Ca^{+2} mediante vías celulares un poco diferentes a las involucradas en la señalización de los CB_1Rs (Lauckner y col., 2008). El estudio de los GPR55 ha crecido en los últimos años y ya es considerado como parte del SEC (Ryberg y col., 2007). Algunos de los roles asignados a este receptor han sido el crecimiento axonal, el dolor, la inflamación y comportamientos tipo ansiedad (Cherif y col., 2015; Shi y col., 2017; Staton y col., 2008). Finalmente, cabe destacar que hay evidencia nueva de que los cannabinoides pueden interactuar con ciertos canales controlados por ligandos o algunos receptores nucleares (Pertwee y col., 2010), aunque aún falta mucho por investigar acerca de su relevancia en ciertos procesos celulares y fisiológicos del SNC.

Cannabinoides Endógenos

Posteriormente a la identificación de los receptores cannabinoides se descubrieron los ligandos endógenos para los mismos, conocidos como endocannabinoides. Los más estudiados hasta la fecha han sido la N-araquidonil-etanolamida (anandamida) y el 2-araquidonil-glicerol (2-AG), los cuales son responsables de la señalización retrógrada y la neuromodulación endocannabinoide sobre el circuito de la motivación, y sobre diversas áreas involucradas en la memoria, la cognición, la percepción del dolor y el control del movimiento (Lopez-Moreno y col., 2008; Mechoulam & Parker, 2013; Mizuno & Matsuda, 2021; Woodhams y col., 2017).

Los cannabinoides endógenos son sintetizados a demanda en neuronas y astrocitos actuando como mensajeros retrógrados, es decir, se liberan desde la membrana postsináptica para activar los receptores CB_1 localizados presinápticamente. Una vez ocurrida su liberación, los endocannabinoides son rápidamente desactivados mediante recaptación celular y metabolización, principalmente por hidrólisis enzimática intracelular (Alger, 2002; Castillo y col., 2012; Kano y col., 2009; Ohno-Shosaku y col., 2012). Como las vías de síntesis y de degradación son diferentes para los principales endocannabinoides, a continuación

describiremos de forma separada y con más detalle estos procesos metabólicos. En la [Figura 8](#) se esquematizan los procesos de producción y degradación de los endocannabinoides.

El primer endocannabinoide que se descubrió fue la anandamida, que se aisló de tejido cerebral en 1992 (Devane y col., 1992). A lo largo de estos años se ha demostrado que esta molécula actúa como un neurotransmisor cerebral típico involucrado en la regulación de las respuestas al estrés y el dolor, pero aún no están muy claros los mecanismos moleculares exactos encargados de su metabolismo. Por un lado, se propone que la enzima fosfolipasa D produce anandamida en un solo paso a partir del precursor N-acilfosfatidil-etanolamina (NAPE), que por su parte se produce a partir del fosfolípido fosfatidilcolina. Otra posible vía de síntesis involucra a una fosfolipasa de tipo A/B, la enzima glicerofosfodiesterasa 1 (GDE1) y varios pasos a partir del precursor diacil-NAPE (Okamoto y col., 2009). Sin embargo, es posible que existan otras vías. Con respecto a la degradación de anandamida, existe un consenso general de que su acción es finalizada por degradación catalítica mediada por la amida hidrolasa de ácido graso (FAAH), pero parecería que otras proteínas aún no identificadas también están involucradas en este proceso (Basavarajappa, 2007). La FAAH se expresa mayormente a nivel postsináptico (Egertova y col., 2003) mientras que las enzimas de síntesis de la anandamida están más asociadas a los axones. No está claro si esto indica que la anandamida actúa de manera anterógrada o que en realidad actúa más comúnmente como endovanilloide, por su rol como agonista del receptor (TRPV1) de ubicación postsináptica (Sharkey y col., 2007).

Con respecto al 2-AG, fue identificado por primera vez como el endocannabinoide más abundante del cerebro en 1995 (Mechoulam y col., 1995; Sugiura y col., 1995) y sus mecanismos de síntesis están mejor establecidos en comparación con la anandamida. Hasta la fecha, se sabe que existen tres tipos de mecanismos o condiciones que inducen su producción y liberación, los cuales pueden ser: el aumento de la concentración de Ca^{+2} , la activación de receptores acoplados a proteína Gq/11 (asociadas a la enzima PLC), y una combinación de estos dos mecanismos (Kano, 2014; Ohno-Shosaku y col., 2012). En el primer caso, como consecuencia del incremento de Ca^{+2} (por la activación de canales dependientes de voltaje inducida por la despolarización de la neurona postsináptica) se produce el mensajero diacilglicerol (DAG) y luego se convierte en 2-AG mediante la enzima diacilglicerol lipasa A (DAGLa) de ubicación postsináptica y concentrada principalmente en las espinas

dendríticas (Katona y col., 2006; Ohno-Shosaku y col., 2012). En el segundo caso, los receptores acoplados a proteína Gq/11 involucrados pueden ser los receptores metabotrópicos de glutamato del grupo I (mGluR-1 y mGluR-5), los receptores muscarínicos de acetilcolina M1 o M3, los receptores de serotonina de tipo 5-HT₂, el receptor activado por proteína PAR1 o los receptores de orexina, oxitocina y colecistoquinina. Cuando se activan estos receptores, sin necesidad del incremento postsináptico de Ca⁺², el diacilglicerol (DAG) se produce a partir del fosfatidilinositol bifosfato (PI) por la enzima fosfolipasa C y luego se convierte en 2-AG mediante la DAGLa. En el tercer caso, se da una combinación entre un pequeño aumento de Ca⁺² y la activación débil de algún receptor acoplado a proteína Gq/11, en donde ambos procesos pueden estar por debajo del umbral para desencadenar la liberación de endocannabinoides. La terminación de la señal retrógrada de 2-AG depende en un 80% de la degradación por la enzima monoacilglicerol lipasa (MGL), de expresión muy heterogénea (Basavarajappa, 2007), y el porcentaje restante de otras enzimas como la α/β -hidrolasa (ABHD6) (Marrs y col., 2010). Adicionalmente, se plantea la existencia de “2-AG signalosomas” en donde los componentes que participan en la síntesis y degradación de este endocannabinoide se encuentran ensamblados en un complejo multi-proteína, que permite que actúe como mensajero retrógrado en las sinapsis excitatorias del cerebro (Katona & Freund, 2012). De hecho, aunque originalmente se pensó que el 2-AG no se almacena en las neuronas, sino que se sintetiza a demanda tras la estimulación, se ha planteado un modelo alternativo que sugiere que el 2-AG está preformado por DAGLa, agrupándose dentro de las células y liberándose tras la estimulación (Ohno-Shosaku & Kano, 2014).

Por su naturaleza lipídica el 2-AG y la anandamida pueden difundir a través de la membrana. Sin embargo, algunos trabajos sugieren que esta difusión puede estar acelerada por ciertos transportadores (aún no aislados) que funcionan de manera bi-direccional permitiendo la liberación de los endocannabinoides y también su ingreso para ser degradados (Beltramo y col., 1997; Glaser y col., 2005; Hillard y col., 1997).

En los últimos años, dentro de la familia de endocannabinoides se ha incluido a un grupo de ligandos peptídicos, llamados pepcanos, y a otras moléculas lipídicas, como la lipoxina y la pregnenolona, que actúan como potenciadores alostéricos o inhibidores específicos de señal de los CB₁Rs (Morales y col., 2016). Sin embargo, aún queda mucho por explorar acerca de sus funciones celulares y consecuencias neurofisiológicas o comportamentales.

Los receptores cannabinoides CB₁ y el comportamiento de búsqueda de droga

El principal componente psicoactivo del cannabis, el Δ^9 -THC, tiene poderosas propiedades de recompensa y reforzamiento en humanos (Hart y col., 2005). Actualmente se sabe que estos efectos están mediados principalmente por los CB₁Rs, siendo el Δ^9 -THC un agonista parcial de estos receptores (Justinova, Goldberg, y col., 2005). Llamativamente, el estudio de las propiedades de recompensa y reforzamiento del Δ^9 -THC y otros cannabinoides sintéticos en modelos animales presenta un panorama complejo (ver revisión: Panlilio & Justinova, 2018; Vlachou & Panagis, 2014). Aunque varios estudios demostraron que el Δ^9 -THC intravenoso no era autoadministrado por ratas o monos Rhesus pero sí por monos ardilla (Harris y col., 1974; Justinova y col., 2003; Lefever y col., 2014; Tanda y col., 2000; van Ree y col., 1978), otros trabajos reportan que los roedores sí se autoadministran cannabinoides sintéticos (como WIN 55,212-2 y JWH-18) (De Luca y col., 2015; Fattore y col., 2001; Lefever y col., 2014; Martellotta y col., 1998) o endocannabinoides (como el 2-AG y la anandamida) (De Luca y col., 2014; Justinova, Solinas, y col., 2005), o que los animales se autoadministran Δ^9 -THC si éste es infundido directamente en ATV o en NAc (Zangen y col., 2006). Usando el paradigma del CPP, se informa que Δ^9 -THC u otros agonistas de los CB₁Rs pueden inducir CPP, CPA o ningún efecto (Braida y col., 2001; Chaperon y col., 1998; Cheer y col., 2000; Lepore y col., 1995; Mallet & Beninger, 1998; Scherma y col., 2008; Valjent & Maldonado, 2000). Todas estas discrepancias han sido ampliamente discutidas y se ha llegado a la conclusión de que estos compuestos producen efectos bifásicos que dependen de factores farmacocinéticos y experimentales (Panagis y col., 2014; Solinas y col., 2007; Vlachou & Panagis, 2014). En varios de estos trabajos citados se logró revertir los efectos de los cannabinoides mediante el tratamiento conjunto con antagonistas de los CB₁Rs. Todas estas observaciones llevaron a profundizar el estudio del rol de los CB₁Rs en la regulación de los aspectos motivacionales del comportamiento dirigido, ya sea para buscar alimento, distintos tipos de drogas de abuso, recompensas sociales y sexuales, o para evitar estímulos aversivos o de valencia negativa (Androvicova y col., 2017; Jager & Witkamp, 2014; Panagis y col., 2014).

Con respecto al rol del SEC en los mecanismos que subyacen a la adicción de otras drogas de abuso diferentes a la marihuana, ha sido demostrado que los CB₁Rs participan en los efectos motivacionales y en la reinstalación de drogas como el alcohol, la nicotina y los opioides (ver revisiones: Lopez-Moreno y col., 2008; Parsons & Hurd, 2015; Solinas y col.,

2007). Con respecto a la participación del SEC en las propiedades motivacionales de la cocaína, se han encontrado resultados inconsistentes dado que algunos trabajos reportan que no existe una variación significativa en los niveles de endocannabinoides en el sistema mesocorticolímbico durante la expresión de la conducta de AA de cocaína (Caille y col., 2007) y que tampoco se ve afectado el desarrollo o la expresión del CPP a cocaína ni de la AA en ratones knock-out para los CB₁Rs (Cossu y col., 2001; M. Martin y col., 2000). Adicionalmente, el bloqueo de los CB₁Rs con antagonistas no interfirió con la adquisición de la AA de cocaína en ratones, ratas o monos (De Vries y col., 2001; Filip y col., 2006; Lesscher y col., 2005; Tanda y col., 2000). En contraste con estos trabajos, algunos estudios demuestran que el bloqueo de los CB₁Rs mediante el antagonista/agonista inverso, SR141716A o Rimonabant, fue capaz de: 1) inhibir la adquisición del CPP asociado a cocaína en ratones (Yu y col., 2011), 2) reducir la motivación por la AA de cocaína en ratones entrenados bajo un esquema de radio progresivo (Soria y col., 2005), 3) reducir la motivación por la AA de cocaína si se administra directamente en el NAc de ratas con una historia previa de exposición prolongada a la droga (Orio y col., 2009), y 4) suprimir la liberación de dopamina en NAc asociada a la búsqueda de cocaína (Cheer y col., 2007). Además, la administración no contingente de cocaína produce un leve pero significativo aumento de 2-AG en regiones límbicas incluido el NAc (Gonzalez y col., 2002) y luego de la extinción de la AA de cocaína se encuentran alterados los niveles de algunos endocannabinoides y de los CB₁Rs en el NAc (Adamczyk, Faron-Gorecka, y col., 2012; Bystrowska y col., 2014). A pesar de las discrepancias encontradas hasta la fecha, se afirma que los CB₁Rs tienen una influencia ‘modesta’ sobre el consumo de cocaína, ya que no cumplen un rol relevante en los efectos reforzantes primarios de esta droga, pero sí parecen estar involucrados en los efectos motivacionales (Parsons & Hurd, 2015; Solinas y col., 2007).

Los CB₁Rs estarían jugando un rol más importante en los procesos relacionados con cambios adaptativos a largo plazo inducidos por la cocaína, como la reinstalación (Fattore y col., 2007; Panagis y col., 2014; Wiskerke y col., 2008). La primera evidencia de la participación de los CB₁Rs en la reinstalación de búsqueda de droga, en animales que extinguieron la conducta de AA de cocaína, fue dada por De Vries y col. (2001), en cuyo estudio se demostró que SR141716A fue capaz de bloquear la reinstalación de la conducta de AA de cocaína inducida por una inyección desafío de cocaína y claves apareadas a la droga. Complementariamente, el agonista de los CB₁Rs, HU-210, generó una precipitada recaída de

la búsqueda de cocaína. Además, ha sido reportado que la administración sistémica y la microinfusión en NAc de AM251, un potente antagonista selectivo de los CB₁Rs (Lan y col., 1999), también es capaz de inhibir la reinstalación de la conducta de AA de cocaína inducida por una re-exposición a la misma (Xi y col., 2006).

El modelo planteado para entender el rol de los CB₁Rs en el comportamiento de búsqueda de droga hace foco en su capacidad para modular la actividad de las neuronas dopaminérgicas de ATV o de las MSNs del NAc al controlar la liberación de glutamato y GABA en las sinapsis con dichas neuronas. Por ejemplo, el bloqueo de los CB₁Rs en ATV reduce el comportamiento de búsqueda de droga y el incremento de 2-AG lo induce (Oleson y col., 2012). Normalmente, los endocannabinoides que se liberan desde las neuronas dopaminérgicas de ATV actúan de manera retrógrada sobre los CB₁Rs ubicados en las terminales glutamatérgicas y GABAérgicas que llegan desde el Pálido Ventral o NAc Shell, y controlan la liberación presináptica de GABA y glutamato (Lecca y col., 2012; Marinelli y col., 2007; Riegel & Lupica, 2004). Al bloquear localmente los CB₁Rs de las terminales GABAérgicas de ATV, incrementa el tono inhibitorio de GABA sobre las neuronas dopaminérgicas aferentes, se reduce el disparo de estas últimas y, por lo tanto, disminuye la liberación de dopamina en NAc (Alvarez-Jaimes y col., 2008). Por otro lado, el SEC puede modular la actividad de las proyecciones glutamatérgicas que llegan al NAc a través de los endocannabinoides que son liberados desde las MSNs y que interactúan de manera retrógrada con los CB₁Rs presentes en las terminales axónicas (Hoffman & Lupica, 2001; Robbe y col., 2001; Robbe y col., 2003). A su vez, la modulación de la transmisión sináptica de las proyecciones aferentes controla la probabilidad de disparo de las MSNs que proyectan a otras áreas motoras. En resumen, el SEC puede alterar el balance entre las aferencias glutamatérgicas, GABAérgicas y dopaminérgicas que regulan la actividad de las MSNs. El modelo propuesto sugiere que la producción de endocannabinoides y la activación de los CB₁Rs presentes en las terminales glutamatérgicas de NAc resulta en una reducción diferencial de la actividad de las MSNs-D₂ vs. MSNs-D₁, lo cual conduce más bien a la expresión de un comportamiento de acercamiento hacia un estímulo apetitivo (Parsons & Hurd, 2015). Los CB₁Rs al estar expresados también en las interneuronas del NAc, que interactúan directamente con las MSNs (Winters y col., 2012), ejercen una influencia importante en la sincronización de la actividad de las vías aferentes y eferentes.

Los receptores cannabinoides CB₁ y la reinstalación inducida por estrés

La participación de los CB₁Rs en la reinstalación inducida por la exposición a estresores ha recibido menos atención que la inducida por la droga o por claves, y los resultados resultan controversiales ya que algunos trabajos sugieren que la señalización endocannabinoide no estaría involucrada en la reinstalación de psicoestimulantes inducida por estrés (De Vries y col., 2001; Filip y col., 2006; Wiskerke y col., 2008). Sin embargo, otros estudios han demostrado que un pre-tratamiento con AM251 administrado por vía sistémica o localmente en ATV bloqueó la reinstalación del CPP a cocaína inducida por la exposición al estrés por nado forzado o a una inmovilización de 30 min (Tung y col., 2016; Vaughn y col., 2012). Las divergencias en los resultados pueden deberse al uso de diferentes especies, test para evaluar reinstalación, modelos de estrés y distintas drogas y dosis, lo cual implica que resulta necesario ampliar la evidencia respecto a la capacidad de los ligandos CB₁R para modificar la reinstalación de la preferencia condicionada a un lugar.

Existen numerosos indicios de que los CB₁Rs podrían ser un blanco interesante para prevenir la recaída inducida por estrés. Por un lado, está bien establecido que el SEC está involucrado en la modulación del estrés y la ansiedad. En particular, los CB₁Rs están implicados en la modulación de la secreción de glucocorticoides y CRF (en CPf, núcleos amigdalinos e hipocampo) y de la actividad del eje HHA (Barna y col., 2004; Cota, 2008; Hill & McEwen, 2010; Patel y col., 2004; Wade y col., 2006). Al mismo tiempo, existe abundante evidencia de que el estrés altera recíprocamente al SEC en múltiples regiones del circuito de la motivación (Gorzalka y col., 2008; Hill & McEwen, 2010; Hillard, 2014; Rademacher y col., 2008). Más específicamente, la exposición aguda o crónica al estrés altera la expresión de los CB₁Rs y la producción de 2-AG y anandamida, con participación de CRF o corticosterona según el área (la dirección de estos cambios también varía según el área) (Di y col., 2016; Hill & McEwen, 2010; Patel & Hillard, 2008; Rademacher y col., 2008). Incluso en estudios en humanos se ha demostrado una alteración en los niveles de CB₁R y anandamida en relación con eventos estresantes pasados (Neumeister y col., 2013), y un aumento rápido del 2-AG en circulación luego de estrés social (Hill y col., 2009). Por otro lado, cabe destacar otros dos puntos relevantes: 1) que el SEC juega un papel muy importante en los procesos de memoria y aprendizaje asociativo (Marsicano & Lafenetre, 2009), y 2) que la exposición crónica a cocaína induce neuroadaptaciones en el SEC (Parsons & Hurd, 2015). Todo esto sugiere que una

desregulación en la actividad del SEC, inducida por el consumo de cocaína, puede contribuir a aumentar la sensibilidad a memorias relacionadas con la droga, al estrés y a estados de ánimo negativo que impacten en la probabilidad de recaer (Volkow y col., 2017).

Los receptores cannabinoides CB₁, plasticidad sináptica y homeostasis de glutamato

Los endocannabinoides pueden generar cambios a corto y largo plazo en las sinapsis inhibitorias y excitatorias por medio de su acción retrógrada. Por un lado, en experimentos *in vitro* o *ex vivo* de electrofisiología, los endocannabinoides pueden generar lo que se denomina depresión a corto plazo inducida por endocannabinoides (ecb-STD, por sus siglas en ingles *short-term depression*), y por otro, depresión a largo plazo inducida por endocannabinoides (ecb-LTD, *long-term depression*) (Chevalleyre y col., 2006; Heifets & Castillo, 2009; Kano y col., 2009; Lovinger, 2008). Dentro de la ecb-STD podemos incluir a todos aquellos procesos que involucran la producción de endocannabinoides, ya sea por una despolarización de la neurona postsináptica o por ciertos patrones de estimulación presináptica, y que son capaces de causar una supresión sináptica de carácter transitorio. Específicamente, la liberación de 2-AG inducida por un aumento de Ca⁺² intracelular, que se da por la despolarización de la neurona postsináptica, puede dar lugar a dos tipos de ecb-STD que se conocen como DSI y DSE (supresión de la inhibición inducida por despolarización y supresión de la excitación inducida por despolarización) en sinapsis inhibitorias o excitatorias, respectivamente (Diana & Marty, 2004). Esto sucede porque la activación de los CB₁Rs por unos pocos segundos bloquea los canales de Ca⁺² dependientes de voltaje lo cual inhibe la liberación presináptica de glutamato o GABA (S. P. Brown, Brenowitz, y col., 2003; Kreitzer & Regehr, 2001; Ohno-Shosaku y col., 2001; Wilson & Nicoll, 2001). Como mencionamos anteriormente, los endocannabinoides también participan en lo que se conoce como “supresión de la neurotransmisión facilitada por receptores mGluR”, en donde el mecanismo de síntesis de 2-AG es independiente del aumento de Ca⁺² intracelular y puede desencadenarse por el *spillover* de glutamato que afecta a receptores metabotrópicos perisinápticos, permitiendo que 2-AG se libere y suprima la transmisión presináptica (Maejima y col., 2001). Estas serían las formas más fisiológicas de inducir ecb-STD, en donde la actividad sináptica marcada o el glutamato liberado de las terminales presinápticas excitatorias (en una cantidad suficiente para inducir la activación de mGluRs) lleva a la supresión de la liberación de glutamato o GABA a través de los mecanismos

descriptos. Como puede notarse, los mecanismos de plasticidad a corto plazo están mediados principalmente por 2-AG y persisten por un minuto o menos, y fueron observados en varias áreas relevantes para la adicción, como el ATV, la BLA, el Hipocampo, la Sustancia Nigra y la Corteza (Sidhpura & Parsons, 2011). La ecb-LTD a su vez, tiene las siguientes particularidades: 1) involucra a la adenilato ciclasa y la vía de AMPc/PKA, 2) involucra la activación de receptores postsinápticos glutamatergicos AMPA y mGluRs, 3) puede estar mediada tanto por 2-AG como por anandamida, 4) puede durar horas o semanas, 5) es particularmente importante en los procesos de memoria y aprendizaje, y 6) se ha podido inducir tanto en sinapsis inhibitorias como excitatorias de preparados *in vitro* de NAc, estriado, hipocampo, ATV, CPf y amígdala (Chevalleyre & Castillo, 2003; Chevalleyre y col., 2006; Gerdeman y col., 2002; Heifets & Castillo, 2009; Robbe y col., 2002; Sidhpura & Parsons, 2011). En resumen, las neuroadaptaciones dependientes de endocannabinoides son procesos muy complejos dependientes de la actividad y finamente regulados, en los cuales participan tanto la despolarización postsináptica como el *input* presináptico para modelar la fuerza de la transmisión sináptica. Todos estos tipos de plasticidad mediada por los CB₁Rs dan una idea de su relevancia en la persistencia de memorias relacionadas con las drogas.

Ciertas evidencias indican que los CB₁Rs ejercen una acción tónica sobre la liberación de los neurotransmisores, ya que su bloqueo incrementa la transmisión sináptica basal en distintas áreas (Castillo y col., 2012). Un trabajo sugiere que la activación de los CB₁Rs reduce la recaptación de glutamato al afectar la función de los transportadores (T. M. Brown, Brotchie, y col., 2003). Todo esto nos indica que una alteración en la expresión y función de los CB₁Rs podría tener consecuencias sobre los niveles extracelulares de glutamato, y que por lo tanto podría ser un factor clave en la modulación de la homeostasis de glutamato. En este sentido, se puede volver a mencionar dos hechos que podrían estar directa o indirectamente relacionados: 1) el tratamiento prolongado con cocaína altera significativamente el funcionamiento de varios mecanismos responsables de mantener la homeostasis de glutamato en NAc (Kalivas, 2009), y 2) luego de la extinción de la autoadministración de cocaína se encuentran alterados los niveles de endocannabinoides y CB₁Rs en el NAc (Adamczyk, Faron-Gorecka, y col., 2012; Bystrowska y col., 2014). Debido a que la mayoría de los trabajos que analizan la relación CB₁R-glutamato fueron realizados *in vitro* o *ex vivo*, resulta interesante explorar si la manipulación farmacológica de los CB₁Rs influye en la homeostasis

de glutamato en un modelo *in vivo* de ratas con una historia previa con cocaína. En línea con esto, al emplear la técnica de microdialisis *in vivo* para recolectar glutamato extracelular en NAc al mismo tiempo que se administra el antagonista de los CB₁Rs, SR141716A, de manera localizada, se ha reportado un aumento de los niveles basales de glutamato (Li y col., 2018).

Actualmente uno de los fármacos más prometedores para evitar la recaída, es la N-acetilcisteína, cuyo mecanismo de acción consiste en restaurar la función del intercambiador cistina/glutamato lo cual resulta en el aumento de la concentración extracelular de glutamato en NAc, el restablecimiento de la actividad de los receptores metabotrópicos presinápticos mGluR-2/3 y la disminución de la probabilidad de liberación de glutamato sináptico frente a una dosis aguda de cocaína (Kupchik y col., 2012; Moran y col., 2005; Moussawi y col., 2009). Recientemente, García-Keller y col. (2020) mostraron que un tratamiento con N-acetilcisteína también puede prevenir la reinstalación a la búsqueda de cocaína inducida por la exposición a un olor asociado a un estresor. Es importante destacar que la N-acetilcisteína es un fármaco con propiedades mucolíticas, anti-inflamatorias y antioxidantes, y que en estudios clínicos logró disminuir la reactividad a claves asociadas a cocaína en personas con una historia previa de consumo de esta droga (Duailibi y col., 2017; LaRowe y col., 2007; Nocito Echevarria y col., 2017). La ceftriaxona (antibiótico betalactámico) y el modafinilo (tratamiento de la narcolepsia), cuyos mecanismos de acción impactan sobre los niveles de glutamato extracelular de NAc, también fueron propuestos como tratamientos para prevenir la recaída al consumo de cocaína debido a los resultados favorables obtenidos en estudios clínicos (A. L. Anderson y col., 2009; Dackis y col., 2005; Hart y col., 2008; Roberts-Wolfe & Kalivas, 2015) y preclínicos (Knackstedt y col., 2010; LaCrosse y col., 2016; Mahler y col., 2014; Trantham-Davidson y col., 2012).

El interés por el desarrollo de cannabinoides sintéticos que actúen como agonistas o antagonistas selectivos se ha incrementado en los últimos años debido al rol de los receptores cannabinoides como moduladores de la actividad de varias áreas del cerebro. Conforme a esta idea, estudios genéticos en humanos sugieren que los polimorfismos encontrados en los genes que codifican para los CB₁Rs y para la enzima FAAH, responsable de la degradación de los endocannabinoides, están asociados con un patrón comportamental compulsivo de consumo de drogas (Comings y col., 1997; Sipe y col., 2002; Vasileiou y col., 2013). Los antagonistas de los CB₁Rs representan una nueva generación de compuestos para tratar una

gran variedad de procesos adictivos (Le Foll & Goldberg, 2005). En este sentido, se observó que el bloqueo de los CB₁Rs con el antagonista Rimonabant/SR141716A (comercializado por Sanofi Aventis como Acomplia®) provocaba la disminución del apetito y el consumo de comida, por lo cual había sido considerado para tratar la obesidad. También se lo empleó para tratar el tabaquismo ya que facilitaba la abstinencia y reducía el aumento de peso asociado a la misma (Cleland y col., 2004; Fagerstrom & Balfour, 2006). Aunque este fármaco se utilizó en Europa hasta el año 2008, la Food and Drug Administration (FDA) de Estados Unidos se negó a aprobar al Rimonabant para el tratamiento del tabaquismo y el sobrepeso debido a que podría tener efectos secundarios relacionados con la ansiedad y el estado de ánimo (Christensen y col., 2007). Conjuntamente se discontinuó con las pruebas clínicas (fase III) de Tarabant (MK-0364) y Otenabant (CP-945,598) para el tratamiento de la obesidad, y con las pruebas de Surinabant (SR147778) para el tratamiento del tabaquismo, debido a su relación costo/beneficio (An y col., 2020). Al menos para el tratamiento de la obesidad, nuevas pruebas clínicas se están realizando para probar la eficacia de nuevos ligandos dirigidos a CB₁Rs ubicados en la periferia (hígado, páncreas endócrino, adipocitos y células musculares). Para el caso de afecciones del SNC, varias pruebas preclínicas sugieren que los antagonistas neutros pueden ser más efectivos y seguros (Janero & Makriyannis, 2009). A pesar de que ningún antagonista/agonista inverso selectivo para los CB₁Rs se encuentra actualmente en la etapa de pruebas clínicas, los mismos siguen siendo muy usados para entender el rol de los CB₁Rs en diferentes desórdenes y se cree que el estudio de sus propiedades particulares (acción farmacológica y propiedades farmacocinéticas) representa un camino prometedor en la medicina traslacional.

En resumen, las evidencias expuestas soportan la hipótesis de que el NAc Core tiene un rol crucial en la regulación del comportamiento asociado con la recaída. En su revisión, Kalivas (2009) propone que el bloqueo de la transmisión glutamatérgica entre CPf dorsomedial y NAc Core interrumpe el procesamiento de la información en el circuito cortico-estriado-talámico, disminuyendo la habilidad de los adictos para regular los comportamientos relacionados con la búsqueda de droga. Una mayor comprensión de los factores que contribuyen a la precipitación de la recaída y de cuáles son los mecanismos neurobiológicos que subyacen a su influencia sobre el comportamiento de búsqueda de droga contribuye al desarrollo de estrategias terapéuticas para el tratamiento de la adicción a cocaína, en particular bajo las

experiencias estresantes de la vida las cuales son inevitables e incontrolables para cualquier persona.

En síntesis, considerando que: 1) la exposición a un estresor produce cambios en la transmisión glutamatérgica y en el sistema endocannabinoide en las áreas claves del circuito de la motivación, 2) la reincidencia a la búsqueda de droga es disminuida por manipulación farmacológica de los CB₁Rs y por el restablecimiento de la homeostasis glutamatérgica en NAc, y que 3) actualmente no se cuenta con estudios *in vivo* que analicen la interacción CB₁R-glutamato en NAc en un modelo de reinstalación inducida por estrés, en el presente trabajo de tesis se ha examinado cómo los niveles de glutamato en NAc son modificados por la exposición aguda a un estresor y por la exposición a un contexto motivacionalmente relevante, de manera tal que se induce una facilitación de la reinstalación a la búsqueda de cocaína y cómo los receptores cannabinoides CB₁ participan en la modulación de este fenómeno.



HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS

Los receptores cannabinoides CB₁ (CB₁Rs) localizados en el Núcleo Accumbens (NAc) Core, pero no en NAc Shell, participan en la reinstalación de la conducta de preferencia condicionada (CPP) a cocaína inducida por la exposición a estrés por inmovilización, a través de su efecto modulador sobre la homeostasis de glutamato en dicha área cerebral. Específicamente, la activación de los CB₁Rs potencia los efectos del estrés para inducir la reinstalación de la conducta de CPP a través de la facilitación de la liberación de glutamato *in vivo* en NAc Core, mientras que el antagonismo de los CB₁Rs evita la reinstalación al suprimir el aumento de glutamato extracelular inducido por estrés.

Nuestra hipótesis está respaldada por las siguientes evidencias: 1) los diferentes estímulos desencadenantes de la reinstalación reclutan circuitos neuronales distintos para mediar la conducta de búsqueda pero todos convergen en una vía final común que involucra a las proyecciones glutamatérgicas que van desde la Corteza Prefrontal (CPf) al NAc Core (Knackstedt y col., 2010; McFarland y col., 2004; McFarland y col., 2003; Stefanik y col., 2016; Stefanik y col., 2013); 2) una desregulación de la homeostasis de glutamato en NAc Core ha sido identificada luego de la administración repetida de cocaína (Baker y col., 2003; Bell y col., 2000; Hotsenpiller y col., 2001) o la aplicación de un estresor (Garcia-Keller y col., 2013) y la reinstalación a la búsqueda de cocaína puede ser revertida al reestablecer la homeostasis de glutamato en dicha área (Kalivas, 2009; Knackstedt y col., 2010; Kupchik y col., 2012; Moran y col., 2005; Moussawi y col., 2011; Zhang y col., 2021); 3) existe una densidad relativamente alta de CB₁Rs en las terminales glutamatérgicas de NAc (Herkenham y col., 1991; Katona y col., 2006; Mackie, 2005; Pickel y col., 2004); 4) la activación de los CB₁Rs modula la liberación de glutamato en NAc (Hoffman & Lupica, 2001; Robbe y col., 2001; Robbe y col., 2003); 5) la administración sistémica del antagonista de los CB₁Rs AM251 suprime el aumento de glutamato extracelular en NAc inducido por una dosis desafío de cocaína (Xi y col., 2006); 6) tanto la administración sistémica de AM251 como la infusión local en NAc de otro antagonista de los CB₁Rs producen un aumento en los niveles basales de glutamato en NAc (Li y col., 2018; Xi y col., 2006); 7) tanto el sistema de neurotransmisión

glutamatérgica como el sistema endocannabinoide median el proceso de evocación de la información aprendida relacionada con la droga (De Vries & Schoffelmeer, 2005); y 8) resultados previos de nuestro laboratorio demuestran que los receptores glutamatérgicos NMDA en NAc Core, y no Shell, participan de la reinstalación de la preferencia condicionada inducida por estrés (De Giovanni y col., 2016). Toda esta evidencia sugiere que los receptores cannabinoides CB₁ tendrían una estrecha relación funcional con el sistema glutamatérgico en NAc Core para mediar el comportamiento de búsqueda de droga bajo nuestro protocolo experimental. Nuestro modelo de reinstalación del CPP inducida por estrés representa una plataforma interesante para evaluar el rol de los CB₁Rs en la modulación *in vivo* de los niveles de glutamato extracelular al mismo tiempo que son influenciados por estímulos externos, como el estrés y el contexto, en ausencia de los efectos de la droga.

OBJETIVO GENERAL

En la presente tesis doctoral se planteó como **objetivo general** evaluar farmacológicamente la participación de los CB₁Rs, administrando un antagonista o un agonista de tales receptores directamente en NAc Core o en NAc Shell, en la reinstalación de la preferencia condicionada a cocaína inducida por la exposición aguda a estrés por inmovilización y la influencia de dicha manipulación farmacológica sobre los niveles extracelulares de glutamato en las áreas mencionadas, determinados a partir de muestras colectadas a través de la técnica de microdiálisis *in vivo*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

I. Determinar la influencia de la administración de AM251, un antagonista de los receptores CB₁, o de ACEA, un agonista CB₁, en NAc Core o en NAc Shell, en la reinstalación de la preferencia condicionada a cocaína inducida por estrés.

Evidencias previas de nuestro laboratorio (De Giovanni y col., 2016) demuestran que una sesión de 30, pero no de 15, min de estrés por inmovilización es capaz de inducir la reinstalación de la preferencia condicionada a cocaína que previamente fue extinguida. Con la utilización de este modelo y de la técnica de microinyección

localizada, previa implantación de cánulas guía mediante cirugía estereotáxica, también se demostró en nuestro laboratorio que cuando un antagonista de los receptores glutamatérgicos NMDA fue directamente administrado en NAc Core, pero no cuando fue administrado en NAc Shell, la reinstalación del CPP luego del estrés fue bloqueada (De Giovanni y col., 2016). Mediante este mismo protocolo y de la misma manera, también fue demostrada la participación de los receptores mGluR-5 y mGluR-2/3 de NAc Core (Tesis De Giovanni, 2016). Con respecto a las evidencias previas que demuestran que el antagonista/agonista inverso específico de los CB₁Rs, AM251 (Lan y col., 1999), puede bloquear la reinstalación a la búsqueda de cocaína inducida por estrés, encontramos dos estudios cuyos modelos también están adaptados al paradigma de CPP (Tung y col., 2016; Vaughn y col., 2012). Ninguno de estos estudios evalúa específicamente el rol del NAc. El único trabajo que realiza una microinyección de AM251 en NAc es el de Xi y col. (2006), en el cual se muestra que la reinstalación a la AA de cocaína, inducida por la inyección de una dosis desafío de la droga, es bloqueada luego de la administración del antagonista. Sin embargo, en este último trabajo no se hace una distinción entre las dos subregiones del NAc. De esta manera, hasta la fecha ningún trabajo ha reportado la participación diferencial de los CB₁Rs en las subregiones Core y Shell del NAc en la reinstalación a la búsqueda de cocaína inducida por estrés.

Teniendo en cuenta los antecedentes de nuestro y otros laboratorios, en el presente trabajo se evaluarán los efectos de la microinyección local (bilateral, 0,5 µl por hemisferio) de AM251 en NAc Core o en NAc Shell, administrada unos min antes de exponer a los animales a una sesión de 30 min de estrés por inmovilización para evaluar inmediatamente después la reinstalación de la conducta de preferencia condicionada a cocaína durante un test.

De manera complementaria y para evaluar el efecto conductual resultante luego de la activación de los CB₁Rs, se evaluarán los efectos de la microinyección local (bilateral, 0,5 µl por hemisferio) de ACEA, un agonista específico de los CB₁Rs, administrada en NAc Core o en NAc Shell unos min antes de exponer a los animales a una sesión de 15 min de estrés por inmovilización la cual no induce reinstalación *per se* del CPP (De Giovanni y col., 2016) y que se hipotetiza que puede ser potenciada por ACEA.

El uso del agonista ACEA se limita y resulta efectivo como antidepresivo, neuroprotector y para estudiar procesos neuroinflamatorios y de memoria a largo plazo, entre otros, sin evidencias acumuladas en el área de investigación de comportamientos adictivos (An y col., 2020). El ACEA posee gran afinidad y especificidad por los CB₁Rs (es uno de los agonistas más potentes) (Hillard y col., 1999), sin embargo para descartar una posible acción sobre otros receptores, como los CB₂R o los TRPV-1, se diseñó un experimento de doble microinyección (o co-infusión) de los ligandos cannabinoides, AM251 y ACEA, para evaluar que los efectos conductuales observados se dan específicamente por la acción de los CB₁Rs.

II. Determinar “*in vivo*” los cambios en los niveles de glutamato extracelular de NAc Core en relación a la conducta de preferencia condicionada por el contexto asociado a cocaína, evaluada bajo nuestro protocolo de reinstalación inducida por estrés.

Con la idea de explorar los cambios en los niveles de glutamato extracelular en respuesta al tratamiento farmacológico con los ligandos para CB₁R, surgió primero la necesidad de explorar si la conducta de CPP tenía un correlato con los cambios detectables en el análisis neuroquímico de las muestras recolectadas mediante microdiálisis. Para este objetivo de la tesis, se desarrolló un modelo de monitoreo *in vivo* de los niveles de glutamato extracelular de NAc Core en las distintas fases del protocolo de reinstalación de la preferencia condicionada a cocaína, a fin de determinar una posible correlación entre la expresión de la preferencia por el contexto asociado a la droga y el aumento de los niveles de glutamato extracelular medidos ante la re-exposición a ese contexto, como así también una correlación entre la falta de aumento de glutamato y la ausencia de preferencia condicionada.

Previamente en nuestro laboratorio, la técnica de microdiálisis *in vivo* permitió detectar cambios en la liberación de glutamato en NAc Core, pero no en NAc Shell, tres semanas después de la exposición aguda al estrés por inmovilización y en respuesta a una inyección de cocaína (García-Keller y col., 2013). Sin embargo, hasta el momento no se contaba con datos del efecto inmediato de la exposición al estresor y en respuesta a la re-exposición a un contexto previamente asociado a la droga. En la presente tesis se diseñó un experimento en el cual se evaluó si, en animales que extinguieron

previamente el CPP asociado a cocaína, el estrés por inmovilización induce cambios en los niveles de glutamato extracelular de NAc Core medidos dentro del aparato de CPP inmediatamente después de la aplicación del estresor, en una instancia que equivale a la inducción de la reinstalación. También se evaluó si estos cambios dependen de las distintas duraciones del estrés por inmovilización y del contexto del CPP al que los animales son re-expuestos luego del estresor. En resumen, todos estos experimentos fueron propuestos para conocer si los cambios en el glutamato extracelular de NAc Core, detectados mediante nuestro protocolo de análisis neuroquímico de muestras obtenidas mediante microdiálisis *in vivo*, ocurren en paralelo a los efectos conductuales disparados por el estrés y la re-exposición a las claves contextuales asociadas a la droga.

III. Determinar la influencia de la microinfusión de AM251 y de ACEA sobre los niveles de glutamato extracelular de NAc Core luego de una sesión de estrés por inmovilización y re-exposición al contexto asociado a cocaína, en animales que extinguieron la preferencia condicionada a la droga.

Los experimentos correspondientes a este objetivo consistieron en evaluar los cambios en los niveles de glutamato extracelular en NAc Core luego de la manipulación farmacológica local con el antagonista/agonista inverso (AM251) o con el agonista (ACEA) de los CB₁Rs, en el modelo de reinstalación de la conducta de preferencia condicionada inducida por estrés. Mediante el uso de una cánula guía adosada a la *probe* de microdiálisis se replicaron las condiciones de microinyección local aplicadas en los experimentos del Objetivo Específico 1, permitiendo el conocimiento preciso de la dosis administrada en el área cerebral de estudio.

IV. Determinar la influencia de la activación de los receptores CB1 sobre los niveles basales de glutamato extracelular de NAc Core, en animales que extinguieron la preferencia condicionada a la droga.

La evidencia demuestra que la administración crónica de cocaína disminuye los niveles “basales” de glutamato en NAc (por disminución de la liberación no vesicular de glutamato) y que la normalización (aumento) de estos niveles previene la reinstalación inducida por cocaína, probablemente por influencia sobre la transmisión glutamatérgica inducida por la droga (Kalivas, 2009; Knackstedt y col., 2010; Kupchik y col., 2012; Moran

y col., 2005; Moussawi y col., 2011; Zhang y col., 2021). En el presente trabajo se evaluó el efecto de la activación de los CB₁Rs sobre los niveles “basales” de glutamato de NAc Core, mediante un experimento de infusión local de dosis crecientes del agonista de los CB₁Rs por microdiálisis reversa y en ausencia de estímulos asociados a la droga o de estrés.



MATERIALES Y MÉTODOS

GENERALIDADES METODOLÓGICAS

Animales

Los animales utilizados en el presente trabajo fueron ratas macho de la cepa Wistar de aproximadamente 220-340 g (2 meses \pm 1 semana de edad al inicio de los experimentos). Los animales fueron criados y provistos por el bioterio perteneciente al Instituto de Farmacología Experimental de Córdoba (IFEC-CONICET) y al Departamento de Farmacología de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Nacional de Córdoba (Córdoba, Argentina), cuyas instalaciones tienen certificación sanitaria aprobada (CÓD. ÚLTIMA CERTIFICACIÓN MR64AL 03/05/2013) y están adheridas al Sistema Nacional de Bioterios (RESOL-2019-5-APN-SECACT#MECCYT). Los animales fueron alojados en grupos de 2 a 4 individuos en cajas estándar de laboratorio (30 cm de ancho, 45 cm de largo y 20 cm de altura) rellenas con viruta autoclavada, con libre acceso al agua y alimento balanceado (específico para rata o ratón, marca "Gepsa", Argentina), y ubicadas en una habitación con temperatura ($22^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$) y humedad estables, bajo un ciclo luz/oscuridad de 12 h (las luces se encienden a las 7:00 h y se apagan a las 19:00 h). Todos los procedimientos experimentales se realizaron durante el ciclo de luz (preferentemente entre las 10:00 y las 16:00 h).

Todos los procedimientos experimentales se llevaron a cabo de acuerdo con el *National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* y fueron aprobados por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de animales de Laboratorio de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Nacional de Córdoba (CICUAL FCQ-UNC, Res. 1228/2018, Res. 680/2015, Res. 787/2020).

Drogas

Se utilizó clorhidrato de cocaína (Laboratorio Verardo, Capital Federal) disuelto en solución salina 0,9% NaCl (10 mg/ml) y administrada en una dosis de 10 mg/kg por vía intraperitoneal (i.p.) en cada una de las sesiones de condicionamiento (Mueller & Stewart, 2000).

Los ligandos administrados localmente en NAc Core o Shell para evaluar la participación de los CB₁Rs en la conducta de reinstalación inducida por estrés fueron:

por un lado, AM251, antagonista CB1Rs [1-(2,4-Dichlorophenyl)-5-(4-iodophenyl)-4-methyl-N-1-piperidinyl-1H-pyrazole-3-carboxamide, peso molecular 555,24], Ascent Scientific Ltd. (Bristol, Reino Unido) , usado en dos dosis (2,5 o 5 nmol/0,5 µl/lado) según un trabajo previo de (Xi y col., 2006). También se empleó ACEA, agonista CB1Rs [Arachidonyl-2'-chloroethylamide hydrate, peso molecular 365,98], Ascent Scientific Ltd. (Bristol, Reino Unido), administrado en dos dosis 0,001 o 0,01 fmol/0,5 µl/lado según el estudio de (Clarke y col., 2008). La preparación del AM251 consistió en una primera dilución en DMSO puro (50 y 100 mM, según la dosis final a administrar) y luego una dilución en solución fisiológica estéril en una proporción 1:9 (dilución final del DMSO: 10%). El ligando ACEA fue diluido directamente en DMSO al 0,1% de solución fisiológica estéril.

Histología

Al finalizar cada uno de los experimentos los animales fueron sacrificados, mediante decapitación con guillotina, para remover sus cerebros y colocarlos en una solución fijadora de paraformaldehído al 4% en buffer fosfato 0.1M hasta su posterior disección. Se realizaron cortes en secciones coronales de 60 µm a nivel del NAc utilizando un crióstato (CM1510-S, Leica), que luego fueron montados en portaobjetos recubiertos de gelatina y teñidos con el colorante Cresyl Violeta. Mediante el uso de una lupa estereoscópica binocular (4X) y un atlas estereotáxico (Paxinos & Watson, 2007), se registraron las ubicaciones de las microinfusiones de los ligandos para CB₁R y de las membranas de microdiálisis en NAc Core y Shell. Además, se examinaron posibles daños en el área de infusión. En el caso de registrar la colocación incorrecta de las cánulas guía de microinyecciones o de las *probes* de microdiálisis, o de registrar un daño mecánico excesivo en el sitio objetivo debido a la hemorragia causada durante la cirugía, los animales fueron excluidos del posterior análisis de datos.

Algunas microfotografías representativas obtenidas a partir del análisis histológico pueden apreciar en las Figuras [2B](#), [2C](#) y [5](#) de esta sección. Con el objetivo de mostrar las localizaciones aproximadas de los sitios de infusión y de las membranas de microdiálisis se confeccionaron esquemas ilustrativos a partir del registro individual de tales ubicaciones. Estos esquemas se muestran en la sección Resultados, junto con sus

respectivos datos comportamentales o neuroquímicos.

MODELO EXPERIMENTAL

Aparato de preferencia condicionada a un lugar

La prueba de CPP se realizó en un aparato conformado por dos cajas de acrílico rectangulares con tapa (25 cm x 33 cm x 37 cm) y conectadas por un corredor central (22 cm x 11 cm x 19 cm), tal como se aprecia en la [Figura 1](#). Las características de este tipo de aparato, “no sesgado” o *unbiased*, tiene la finalidad de lograr que los compartimentos (o contextos) sean diferenciables entre sí y, al mismo tiempo, que se equipare la preferencia basal o innata que los animales puedan llegar a tener por los mismos. Para lograr esto, los compartimentos del aparato poseen claves contextuales (táctiles y visuales principalmente) que son equivalentes en función a la preferencia basal que exhiben los animales durante la etapa previa al condicionamiento. Uno de los compartimentos principales tiene paredes pintadas de negro y piso de barras de acero inoxidable, el otro compartimento tiene paredes pintadas de blanco y piso plástico cuadriculado. El corredor central es transparente con piso liso de acrílico y separado de los dos contextos por puertas removibles tipo guillotina. A su vez, el aparato se encuentra conectado a un sistema de sensores (3 pares enfrentados en cada caja principal y 1 par enfrentado en el corredor central) que permiten registrar los tiempos de permanencia en cada uno de los contextos mediante una interfase y el software informático CPP v.1.2 (L.I.A.D.E., Argentina). Este sistema, brinda otras medidas adicionales, tales como el número de entradas y la actividad locomotora en cada contexto durante todas las fases de la prueba.

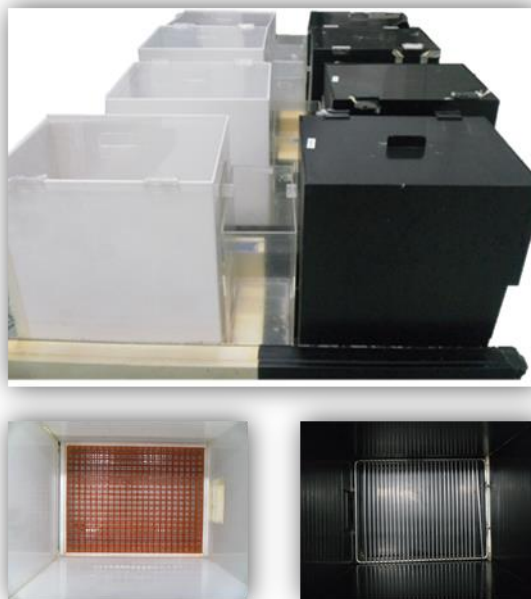


Figura 1. Vista externa y vista superior del aparato de prueba de preferencia condicionada a un lugar (CPP). En la imagen pueden verse los cuatro aparatos de CPP usados en la presente tesis, los cuales están ubicados en una habitación experimental del bioterio. Puede apreciarse el interior de los compartimentos principales y cómo se encuentran conectados en la base al sistema de sensores láser. El corredor central (transparente) sirve de paso para que los animales se trasladen entre los compartimentos principales.

La habitación en la que se halla el aparato utilizado para realizar la prueba de CPP se mantuvo con una iluminación tenue y constante. El grado de semi-oscuridad de la pieza ha sido fijado por experimentos piloto realizados previamente en el laboratorio con el objetivo de evitar que los animales muestren preferencia incondicionada a algunos de los contextos debido a la iluminación.

Procedimiento general de reinstalación de la preferencia condicionada a un lugar

El procedimiento general de la prueba de CPP llevada a cabo en esta tesis está basado en el protocolo puesto a punto para un trabajo previo de nuestro grupo de investigación (De Giovanni y col., 2016), con leves modificaciones según el experimento, y consistió en las siguientes fases, siempre en el mismo orden cronológico:

a. **“Handling”**: Durante los 3 días previos al comienzo de cada experimento, los animales fueron pesados y posteriormente manipulados para reducir la novedad y el estrés asociado con las manipulaciones experimentales y la administración de inyecciones. Para esto, las ratas fueron trasladadas a otra habitación, retiradas de sus

cajas, expuestas a *handling*, marcadas, y luego retornadas a sus cajas y a la habitación de alojamiento. Por otra parte, para habituar a los animales al ambiente en donde se realizaron las pruebas de CPP y reducir el estrés por el cambio de contexto, los mismos fueron trasladados en sus cajas-hogar a la habitación experimental al menos 30 min antes del comienzo de todas y cada una de las sesiones de las siguientes etapas.

b. **Test Basal (TB):** los animales fueron introducidos en el aparato, permitiendo el libre acceso a todos los compartimentos con las puertas tipo-guillotina abiertas, y se registró el tiempo de permanencia en cada uno de ellos durante 15 min (900 seg). Este test se realizó para evaluar si los animales muestran alguna preferencia incondicionada por alguno de los compartimentos principales (o contextos), lo cual se consideró como criterio de exclusión. Es decir, los animales que permanecieron más del 66% del tiempo total en alguno de los compartimentos principales fueron descartados. El tiempo total representa la sumatoria de tiempos de permanencia en los dos compartimentos principales. Cabe destacar que también fueron descartados aquellos animales que permanecieron más de 300 seg en el corredor central. Los animales que no fueron descartados se reagruparon para continuar con los experimentos.

c. **Condicionamiento:** En base a los datos registrados en el test basal se asignó individualmente a cada animal un compartimento principal (el blanco o el negro indistintamente) en el cual recibiría la inyección de cocaína durante la etapa de inducción de la preferencia condicionada a ese contexto. Dicho compartimento fue aquel en el que el animal pasó menos tiempo durante el test basal, es decir, el menos preferido. De esta manera, se intentó reducir la influencia de una posible preferencia incondicionada sobre los resultados. En la sección de Resultados nos referiremos a este compartimento como el “contexto apareado/asociado a cocaína”. Durante la etapa de condicionamiento el animal fue confinado durante 8 días de manera alternada en el compartimento asignado para el condicionamiento, inmediatamente después de ser administrado con 10 mg/kg de cocaína (abreviado como COC, días 1, 3, 5 y 7), y en el compartimento opuesto (contexto no apareado/asociado a cocaína), inmediatamente después de ser administrado con solución salina (abreviado como SAL, 1 ml/kg, días 2, 4, 6 y 8). El confinamiento se efectuó encerrando al animal durante 30 min en cada uno de los compartimentos según el día con las puertas tipo-guillotina cerradas.

La selección de la dosis de cocaína usada en esta etapa está basada en trabajos referentes en el procedimiento de CPP (Stewart & de Wit, 1987; Tzschentke, 2007) y en el trabajo previo de nuestro grupo de investigación (De Giovanni y col., 2016). Está demostrado que la dosis de 10mg/kg en roedores induce aumento de actividad locomotora, efectos gratificantes (evaluados mediante CPP) y no resulta letal para los animales (Tzschentke, 2007).

d. **Test de Condicionamiento (TC):** Al igual que en el test basal, se dejó que los animales recorrieran libremente todo el aparato durante 15 min para registrar nuevamente el tiempo que permanecen en cada uno de los contextos. La preferencia condicionada es definida como un incremento del tiempo en que el animal permanece en el compartimento apareado a la droga en comparación con el tiempo que permanece en ese mismo compartimento durante el test basal y en relación con el tiempo que permanece en el contexto asociado a salina durante el test de condicionamiento. Específicamente, el criterio de inclusión consistió en continuar los experimentos con aquellos animales que permanecieron más del 66% del tiempo total del test en el contexto apareado a cocaína.

e. **Extinción:** Con el objetivo de disminuir progresivamente la preferencia condicionada al sitio apareado con cocaína los animales fueron inyectados con salina (1 ml/kg), e inmediatamente confinados durante 30 min en cada uno de los compartimentos de manera alternada durante 8 días (usando un esquema similar a la etapa de condicionamiento). De acuerdo a experimentos realizados en el laboratorio (De Giovanni y col., 2016), este procedimiento por *apareamiento salino* resulta más efectivo para llevar a cabo el proceso de extinción (se alcanza una extinción más robusta y en menos tiempo/días), en relación al protocolo basado en dejar repetidamente que el animal explore todos los compartimentos del aparato de CPP (*test repetidos*). Estos resultados concuerdan con lo encontrado por los trabajos de (Itzhak & Anderson, 2012; Mueller & Stewart, 2000). Sólo para el caso de los experimentos conductuales en los cuales se requirió de la implantación de cánulas guía para la posterior microinyección de ligandos cannabinoides durante la reinstalación, la cirugía estereotáxica se llevó a cabo a la mitad de esta etapa, es decir al cuarto día de apareamiento salino. Una vez operados, se dejó que los animales se recuperen por al menos 48 hs antes de continuar

con los cuatro días restantes del protocolo de extinción.

f. **Test de extinción (TE):** Al día siguiente del último día de extinción se realizó un test durante 15 min para confirmar que los animales en estudio hayan extinguido la preferencia condicionada al contexto asociado a los efectos de cocaína. Como criterio de inclusión para este test se consideró que los animales no hayan registrado un tiempo de permanencia mayor al 66% del tiempo total en el contexto apareado a la droga, es decir que los animales hayan registrado una distribución uniforme en los tiempos de permanencia. Los animales descartados fueron aquellos que no mostraron una disminución estadísticamente significativa en la preferencia condicionada.

g. **Test de Reinstalación (TR):** El día posterior al test de extinción los animales fueron sometidos a un test de reinstalación, el cual consistió en evaluar la reaparición de la preferencia condicionada previamente extinguida luego de la aplicación de un estímulo disparador (una sesión de estrés por inmovilización en este caso). Más específicamente, el día de la reinstalación los animales fueron trasladados en sus cajas-hogar hasta la habitación experimental. Luego de 30 min de habituación (tal como se hizo en cada una de las sesiones de las etapas anteriores), se procedió con la microinyección local de ligandos para CB₁R (el antagonista, el agonista o la solución vehículo) en el área de interés (NAc Core o Shell), con el objetivo de evaluar los efectos de la manipulación farmacológica de los receptores CB₁ sobre la reinstalación. Unos 5 min después de finalizar las microinyecciones los animales fueron sometidos a una sesión de estrés por inmovilización (de 0, 15 o 30 min). Inmediatamente después de la sesión de exposición al estresor, los animales fueron evaluados en el test de reinstalación propiamente dicho, el cual se realizó de la misma manera que los demás test (libre acceso a todo el aparato de CPP durante 15 min). La reinstalación es definida como un incremento del tiempo en que el animal permanece en el compartimento apareado a cocaína, en comparación con el tiempo que permanece en este compartimento el día anterior, es decir, en el test de extinción.

El esquema del procedimiento general de reinstalación del CPP puede verse en la [Figura 1](#) de la sección Introducción y en la [Figura 1A](#) de la sección de Resultados. Los esquemas de las líneas de tiempo correspondientes a cada experimento se presentan en todas las figuras de la sección de resultados, incluyendo los detalles de las leves

modificaciones aplicadas a este procedimiento general. El diseño experimental de cada experimento se detalla en la sección de Resultados, de acuerdo a cada objetivo específico.

Los experimentos conductuales se analizaron teniendo en cuenta el índice de preferencia, reportado como la diferencia entre el tiempo de permanencia en el contexto asociado a cocaína y el tiempo de permanencia en el contexto asociado a solución salina [CONTEXTO COC – CONTEXTO SAL]. Estos datos se representan en columnas para cada test del procedimiento de CPP.

Los experimentos de microdiálisis *in vivo* para la recolección de muestras de dializado de líquido extracelular de NAc, y la respectiva cirugía estereotáxica para implantación de *probes* de diálisis, fueron llevados a cabo los días posteriores a cada test del presente protocolo de CPP.

Procedimiento de microinyección

Las microinyecciones de los ligandos para CB₁R, o sus correspondientes soluciones vehículo, fueron realizadas el día de reinstalación, 5 min antes de la aplicación del estrés por inmovilización y dentro de la habitación experimental. A modo de microinyector se empleó una aguja de calibre 30 G y de 16,7 mm de largo. La misma fue conectada a través de un catéter (tubo de polietileno PE-20) a una jeringa Hamilton de 10 µl y fue descendida a través de la cánula guía implantada. Mediante el uso de una bomba de infusión (Harvard Apparatus, Estados Unidos) se administró cada sustancia en estudio en un volumen de 0,50 µl en el NAc Core o Shell de cada hemisferio ([Figura 2](#)). La cánula de inyección se descendió 2 mm más allá de la terminación de la cánula guía para llegar exactamente al área de interés. El proceso de infusión se llevó a cabo durante 2 min. Durante el primer min, se llevó a cabo la infusión propiamente dicha, y en el min restante se dejó el microinyector en su lugar, con la bomba apagada, para permitir la correcta difusión de la droga antes de retirarlo. Cabe destacar que todos los animales se habituaron previamente al procedimiento de microinfusión durante los últimos dos días de la fase de extinción.

Para los experimentos en los cuales se combinó la técnica de microdiálisis *in vivo* con la microinfusión de ligandos, el proceso se realizó exactamente de la misma manera

que para los experimentos conductuales, a través de una cánula guía adosada a la *probe* de microdiálisis (el artefacto diseñado para la recolección de muestras e implantado directamente en cerebro, ver detalle de su confección manual [más adelante](#)).

En la [Figura 2A](#) se resaltan esquemáticamente las áreas cerebrales de interés en las cuales se llevaron a cabo las microinyecciones. En la sección Resultados se presentan las ubicaciones exactas de cada una de las microinfusiones según lo determinado mediante el posterior análisis de cortes de cerebro fijado de todos los animales bajo estudio. En las [Figuras 2B y 2C](#) se presentan fotografías representativas de los cortes coronales de cerebro analizados para evaluar las marcas de las cánulas guía y los sitios de inyección.

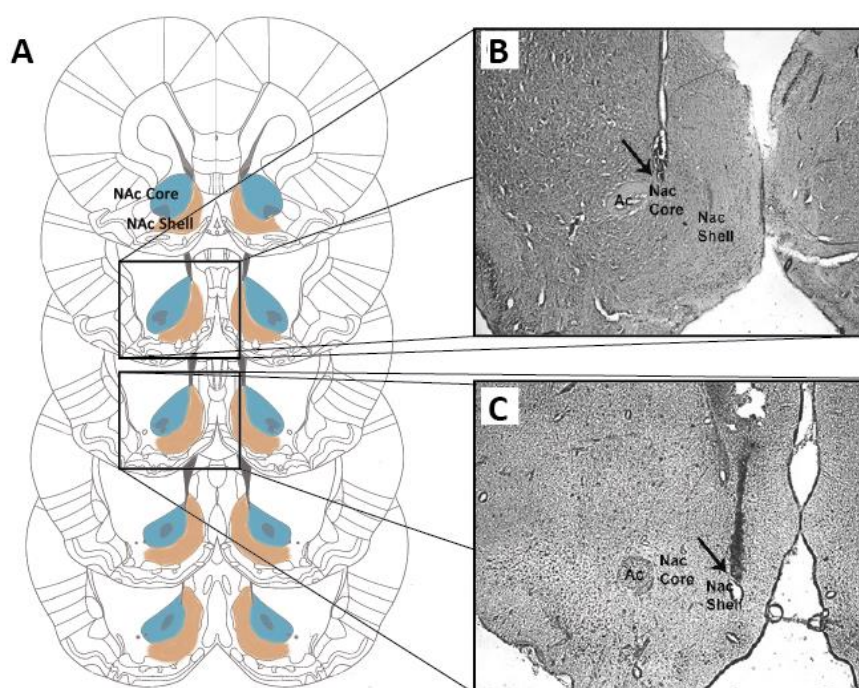


Figura 2. (A) Secciones coronales de cerebro de rata, adaptadas del atlas de Paxinos y Watson (2007), marcando con color las áreas de interés de esta tesis: Núcleo Accumbens Core (celeste) y Núcleo Accumbens Shell (naranja). (B y C) Fotomicrografías representativas que ejemplifican las marcas de las cánulas guía y los lugares de inyección (flechas) en el cerebro de diferentes ratas que recibieron una microinyección en NAc Core (B) o en NAc Shell (C). Ac=comisura anterior

Estrés por inmovilización

Para evaluar la conducta de reinstalación del CPP inducida por estrés, los animales fueron colocados dentro de un inmovilizador que a su vez fue posicionado en el corredor

central del aparato de CPP ([Figura 3](#)), previamente al test y posteriormente (5 min) a la infusión local de los correspondientes ligandos para CB₁R.

El inmovilizador consiste en un dispositivo de acrílico PLEXIGLAS® que permite que los animales puedan respirar normalmente, tener la cola libre y la cabeza con suficiente espacio como para que el implante de la cirugía no sea dañado. Este dispositivo tiene un fondo plano formando un semicilindro de 20 cm de largo, 6 cm de ancho y 5 cm de alto. Además, contiene varias ranuras para la circulación del aire y una compuerta de plástico extraíble para sujetar al animal en el dispositivo con la cola saliendo por la parte trasera. Los inmovilizadores que se emplearon para este protocolo son los mismos que se usaron previamente en trabajos de nuestro grupo de investigación (De Giovanni y col., 2016; Esparza y col., 2012; Garcia-Keller y col., 2016; Garcia-Keller y col., 2013; Pacchioni y col., 2007; Pacchioni y col., 2002). Para los experimentos de microdiálisis, con el objetivo de evitar daños en las partes externas de las *probes*, se modificó la mitad superior del dispositivo de manera tal que se pudo sujetar a los animales desde el lado dorsal para que permanezcan en el compartimento central, en lugar de introducirlos desde un extremo del cilindro.



Figura 3. Estrés por inmovilización empleado en la presente tesis. En esta figura se presentan fotografías del inmovilizador de acrílico y de la colocación del animal en su interior. También puede verse cómo se coloca al animal inmovilizado dentro del compartimento central del aparato de CPP. El animal permanece en esa ubicación durante un tiempo determinado (15 o 30 min) y luego se evalúa la reinstalación de la preferencia condicionada mediante un test. Más detalles en el texto.

El tiempo que los animales permanecieron dentro de los inmovilizadores fue diferente (15 ó 30 min) de acuerdo al ligando que se administró (ver diseño experimental). La elección de estas alternativas se basó en resultados previos del laboratorio, los cuales indican que una sesión de estrés por inmovilización de 15 min no induce reinstalación de la preferencia, a diferencia de los 30 o 60 min que sí lo hacen (De Giovanni y col., 2016). Por este motivo, en parte de texto se empleará el término “estrés sub-umbral” en referencia a la inmovilización de 15 min de duración. Los animales del grupo control “sin estrés” permanecieron durante la misma cantidad de tiempo en sus cajas-hogar en la habitación experimental de CPP. Inmediatamente después de finalizar la sesión de estrés, todos los animales fueron evaluados individualmente en el test de reinstalación o, en el caso de los experimentos de microdiálisis *in vivo*, fueron re-expuestos a alguno de los compartimentos del aparato de CPP para la recolección de muestras.

Análisis estadístico de los datos comportamentales

Para el análisis de los datos conductuales se utilizaron los software estadísticos Prism v8 (GraphPad, Estados Unidos) y STATISTICA v7.0 (StatSoft, Estados Unidos). La capacidad de los ligandos administrados y/o la aplicación del estresor para inducir reinstalación fueron determinadas por la diferencia entre los índices de preferencia determinados durante el test de reinstalación (TR) y el test de extinción (TE). También se hicieron comparaciones entre los efectos de las diferentes dosis de los ligandos administrados y/o las distintas duraciones de exposición a la inmovilización en la reinstalación. En las figuras también se reportan los datos de los test basal (TB) y de condicionamiento (TC) con el fin de evidenciar que no existen diferencias previas en el grado de condicionamiento entre los grupos analizados. La significancia estadística fue determinada por un ANOVA de tres vías con los test como muestras repetidas. Los factores considerados fueron los siguientes: estrés (estrés de 15 o 30 min/no estrés), tratamiento (AM251/vehículo o ACEA/vehículo, en distintas dosis) y test (TB vs.TC, TC vs.TE y TE vs.RT). Las comparaciones múltiples *post hoc* se realizaron usando el test de Bonferroni. Cuando sólo se compararon dos grupos, la significación estadística se determinó mediante la prueba *t* de Student apareada con una distribución de dos colas.

El nivel de significancia considerado para todos los análisis estadísticos fue de $p < 0,05$. Todos los tamaños de los grupos, las pruebas específicas aplicadas, los efectos estadísticos y la significación estadística de cada experimento se informan en las leyendas de las figuras y en el texto de la sección Resultados.

CIRUGÍAS

Cirugía para implantación de cánulas guía

Para llevar a cabo la microinfusión de los ligandos para CB₁R en NAc se realizó una cirugía para implantación de cánulas guía en el cerebro, a través de las cuales se insertaron microinyectores el día del experimento correspondiente. Las cánulas guía fueron elaboradas con agujas de acero inoxidable, de calibre 22 G y de 14,7 mm de largo. Para la implantación de las mismas, los animales fueron anestesiados administrando vía i.p. Clorhidrato de Ketamina junto con Xylazina (55 mg/kg y 11 mg/kg, respectivamente, Kensol, Laboratories Holliday, Buenos Aires, Argentina) y luego se colocaron en un estereotáxico (Stoelting Co, Estados Unidos; [Figura 4](#)). La barra dental incisiva se ubicó a 3,3 mm por debajo de la línea interaural. El cráneo fue expuesto mediante una incisión en el cuero cabelludo y se realizaron los orificios necesarios para implantar las cánulas guía de manera bilateral. Las mismas fueron descendidas y ubicadas a 2 mm por encima del área de interés, de manera tal que se permita que la sustancia a administrar posteriormente, mediante el microinyector, difunda homogéneamente en el área sin interrupción del metal de la cánula guía, y también se evita que el daño que genera esta última no afecte al área de interés. De esta manera, las coordenadas consideradas desde el cráneo y respecto de Bregma fueron, según Paxinos y Watson (2007), para NAc Core: AP +1,3 mm, L. $\pm 1,5$ mm, V. -4,3 mm, y para NAc Shell: AP +1,3 mm, L. $\pm 0,8$ mm, V. -4,4 mm. Las cánulas fueron fijadas al cráneo mediante la instalación de dos tornillos metálicos cerca de las cánulas y la aplicación de cemento acrílico (Subiton, Argentina). Una vez terminada la cirugía, los animales recibieron una dosis de antibiótico (0,2 ml/300 g de peso corporal del animal, por vía subcutánea) que contenía Penicilina G Sódica + Penicilina Benzatínica + Estreptomina (Laboratorios Nort, Argentina), con el objetivo de reducir al mínimo las infecciones.

La cirugía se llevó a cabo al cuarto día de la etapa de extinción, se dejó que los animales se recuperen durante al menos 48 h, y luego se continuó con el protocolo. Durante el periodo de recuperación se monitoreó la presencia de signos de infección y dolor en los animales, como así también el peso y la ingesta de agua y comida. Además, el día posterior a la cirugía los animales recibieron una microdosis del analgésico xilazina (7 mg/kg por vía intramuscular). De esta manera se garantizó una buena recuperación, necesaria para que los animales sigan siendo manipulados por al menos una semana más hasta la finalización de los experimentos. Los animales que mostraron signos de dolor y sufrimiento o síntomas físicos de malestar y estrés, como pérdida de peso, diarrea, anorexia, letargia, etc., fueron sacrificados.



Figura 4. Estereotáxico Stoelting. Este aparato permite inmovilizar al animal anestesiado y registrar las coordenadas necesarias para ubicar puntos de referencia en el cráneo y para alcanzar con exactitud las áreas cerebrales de interés mediante la correcta implantación de cánulas. Más detalles en el texto.

Cirugía para implantación de *probes* de microdiálisis

El procedimiento de cirugía estereotáxica para implantación de cánulas o *probes* de microdiálisis fue muy similar al descrito para la implantación de cánulas guía. A diferencia de estas últimas, la *probe* de microdiálisis se colocó de manera unilateral en cada animal (hemisferio derecho en la mayoría de los casos) y solamente en NAc Core. Las coordenadas de posicionamiento en el aparato estereotáxico fueron, con respecto de Bregma y según Paxinos y Watson (2007): AP +1,3 mm, L. $\pm 1,5$ mm, V. -7,8 mm. De esta manera, el área activa de intercambio de la membrana de diálisis que poseen las

probes (ver descripción de las mismas en la [siguiente sección](#)) quedó posicionada a lo largo de toda el área de interés. Las *probes* también fueron fijadas al cráneo mediante la instalación de un tornillo metálico y la aplicación de cemento dental ionómero de vidrio (Meron, Voco Laboratories, Alemania) y cemento acrílico (Subiton, Argentina) para asegurar una mejor fijación. En la [Figura 5](#) se presenta una fotografía representativa de un corte coronal de cerebro analizado para evaluar la marca de la membrana de diálisis atravesando NAc Core.

A lo largo de toda la cirugía se hizo circular agua ultrapura Milli-Q® en cada una de las *probes* de microdiálisis mediante una jeringa Hamilton hermética para gases de 1 ml montada en una bomba de ultraperfusión (BASi, Estados Unidos). Este procedimiento permitió monitorear de manera constante el estado de las *probes* durante la inserción de las mismas en el cerebro, además de asegurar que la membrana de diálisis estuviera húmeda y no colapsara. Adicionalmente, al finalizar la cirugía se añadió unos tapones de plástico en los extremos externos de los metales de las *probes* para evitar que las mismas se taparan durante el período de recuperación del animal. Este período fue de 18 h, que es el adecuado para que la mayoría de los animales recupere correctamente el tono muscular, la movilidad y la capacidad para explorar el espacio. Este protocolo ha sido consistentemente utilizado en los trabajos que emplean la misma técnica, entre los que se incluyen los de nuestro grupo de investigación (Garcia-Keller y col., 2013; Pacchioni y col., 2007). Por otro lado, cabe destacar que luego de esta cirugía los animales fueron colocados en cajas individuales con paredes altas (25 cm de alto) y una tapa-reja con mayor altura diseñada para evitar que los animales se dañen las partes externas de la *probe*.

El momento en que se realizó esta cirugía depende de cada experimento y se detalla tanto en la sección de descripción de experimentos como en la sección de Resultados y en las figuras. A diferencia de la implantación de cánulas guía, la cirugía de implantación de *probes* se realizó el día previo a cada experimento de microdiálisis propiamente dicho.

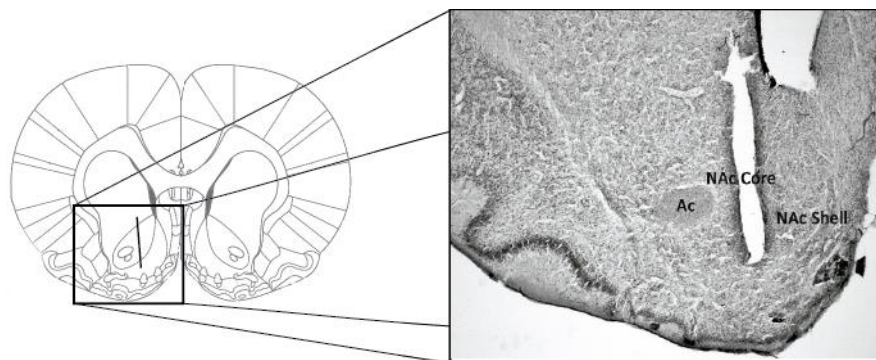


Figura 5. Sección coronal de cerebro de rata, adaptada del atlas de Paxinos y Watson (2007), junto con una fotomicrografía representativa que ejemplifica la marca de la membrana de microdiálisis atravesando NAc Core del cerebro de una rata. Ac=comisura anterior.

ESTUDIOS NEUROQUÍMICOS

Cánulas de microdiálisis (*probes*)

Dos tipos de *probes* fueron fabricadas de forma manual en el laboratorio ([Figura 6](#)). Las mismas fueron construidas rigurosamente bajo el diseño de Di Chiara (1993) con modificaciones menores (García-Keller y col., 2013). Para la construcción se utilizaron agujas de acero inoxidable de calibre 22 G y tubos capilares de sílica (diámetro interno 50 μm , diámetro externo 150 μm ; Polymicro Technologies, Phoenix, AZ, EE. UU.). Todas las partes de las *probes* fueron unidas con cemento epoxi. En cada *probe* puede distinguirse una parte externa, que queda a la vista una vez implantada en el cráneo del animal, y otra parte interna, que corresponde al material introducido en el cerebro (ver [Figura 6a y b](#)). La parte externa de cada *probe* está conformada por un conducto de entrada (*inlet*) y otro de salida (*outlet*), cada uno de ellos armados con una cánula de acero y un tubo capilar de sílica en su interior. La parte interna de la *probe* corresponde a la continuación de los tubos capilares de sílica de entrada y de salida, sin la cubierta de acero, que se juntan en el extremo distal mediante una membrana semipermeable que recubre a los dos capilares y que está sellada en la punta por un tapón de pegamento ([Figura 6c](#)). De esta manera, en cada *probe* queda establecido un circuito cerrado que permite el flujo unidireccional de una solución similar al líquido cefaloraquídeo, ingresando por el *inlet*, pasando por la membrana semipermeable que permite la entrada de sustancias a favor del gradiente de concentración desde el área cerebral de interés, y saliendo por el *outlet* para recolectar las muestras de dializado

conteniendo el neurotransmisor de interés ([Figura 6d](#)).

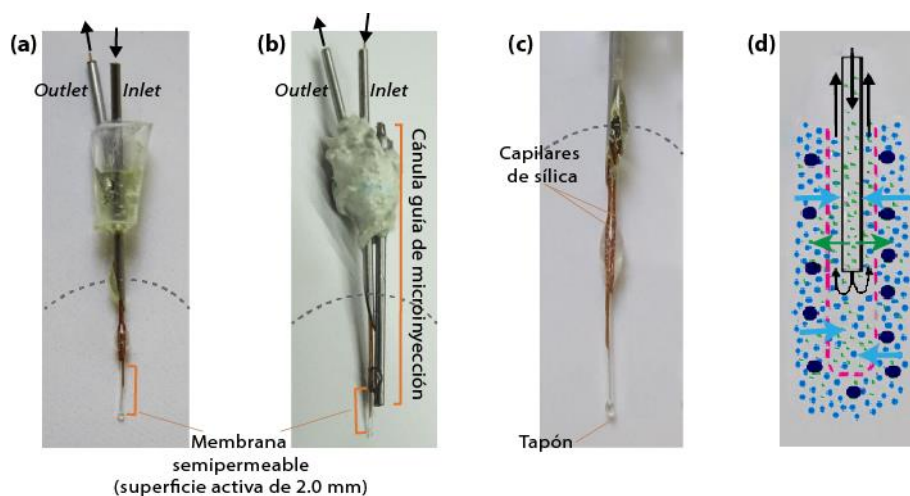


Figura 6. Fotografías de las *probes* de microdiálisis confeccionadas de forma manual en nuestro laboratorio. En el panel (a) se detallan las partes de una *probe* simple y en el panel (b) las partes de lo que llamamos una *probe* “dual” ya que contiene una cánula adosada que sirve de guía para realizar microinyecciones en el área cerebral de interés. La línea punteada gris representa el límite entre lo que queda por fuera (parte superior) y lo que queda por dentro (parte inferior) del cráneo del animal cuando las *probes* están implantadas. En el extremo distal inferior de las *probes* puede distinguirse la porción de membrana de microdiálisis en donde ocurre el pasaje de sustancias. En la fotografía del panel (c) se observa la membrana en detalle y en el panel (d) un esquema de lo que sucede alrededor de la superficie activa de intercambio, en donde ciertas sustancias ingresan (flechas celestes), y otras salen (flechas verdes), del interior de la membrana según el gradiente de concentración. Las flechas negras indican el sentido de circulación del buffer similar al líquido cefaloraquídeo que es impulsado mediante una bomba de flujo ultrabajo. Más detalles en el texto.

La membrana de diálisis (AN69HF, Hospal-Gambro, Meyzieu, France) fue colocada y sellada en el extremo distal interno de la *probe*, cubriendo los extremos de los capilares de entrada y de salida, tal como se aprecia en la [Figura 6c](#). La superficie activa de intercambio para NAc Core fue establecida en 2,0 mm de largo de membrana. La membrana consiste de un copolímero sintético de poliacrilonitrilo (PAN) y sulfonato metalil sódico, con un *cutoff* de 10 Kdalton lo cual permite el pasaje tanto de glutamato (peso molecular: 147,13) como del agonista CB1R, que se administró a través de la misma (ACEA, peso molecular: 365,98). Sus principales características son: diámetro interno de 240 μm , diámetro externo de 310 μm y tamaño promedio de poro 29 Å.

Una segunda versión de *probe*, denominada “*probe* dual de microdiálisis y microinyección” (*dual microinjection-microdialysis probe*) tiene exactamente las mismas características descritas para la versión “simple”, pero con una cánula guía de 20 mm de largo adosada al metal de *inlet*, tal como se aprecia en la [Figura 6b](#). A través de esa cánula guía se realizaron las microinfusiones de los ligandos para CB₁R de la misma

manera que los experimentos conductuales. Al momento de confeccionar esta versión de *probe*, es importante asegurarse que la ubicación de la cánula guía adosada permitiera que el microinyector alcanzara el área de interés junto con la membrana de diálisis para que el proceso de dializado y microinfusión de sustancias tuviera lugar en el mismo espacio extracelular.

Todas las *probes* fueron confeccionadas los dos días previos a su implantación en cerebro, controlando que las uniones entre todos los materiales estuvieran firmes, secas y sin filtraciones. Además, todas las *probes* fueron sometidas a una prueba de recuperación *in vitro* con el fin de verificar la eficacia y la eficiencia relativa del proceso de diálisis (ver detalle de este procedimiento [más adelante](#)).

Procedimiento general de microdiálisis *in vivo*

La microdiálisis *in vivo* es una técnica que permite recolectar muestras de fluido extracelular de un área cerebral de interés, en animales vivos y en libre movimiento (Torregrossa & Kalivas, 2008). A través del análisis neuroquímico de estas muestras es posible identificar la presencia de neurotransmisores (glutamato en este caso), y cuantificar su variación en el tiempo (en este caso, cada 15 min y durante el transcurso de varias horas). El procedimiento general de microdiálisis empleado en este trabajo ya fue publicado con anterioridad por nuestro grupo de investigación (García-Keller y col., 2013; Pacchioni y col., 2007), en consistencia con las recomendaciones de numerosos estudios que usan la misma técnica. Debido a su relativa simplicidad operacional, esta técnica nos permitió monitorear *in situ*, con los animales dentro de la habitación experimental los cambios en los niveles de glutamato de NAc en respuesta a determinados estímulos (exposición a estrés o a la mera exposición al aparato de CPP).

Técnicamente, el día posterior a la cirugía de implantación de la *probe* de microdiálisis, los animales recuperados fueron sacados de su caja cuidadosamente para conectar el extremo de entrada o *inlet* de la *probe* a una bomba de ultraperfusión (BASi, Estados Unidos), mediante tubos de diámetro interno muy pequeño (*tubings*; de Teflon FEP, diámetro interno 120 μm , diámetro externo 65 μm OD; BASi, Estados Unidos) y una jeringa Hamilton de 1 ml. De esta manera, mediante el empleo de la bomba se hizo circular una solución de composición similar al líquido cefalorraquídeo (buffer Ringer), a

través del sistema de tubos y la *probe*, a un flujo constante de 1,5 ul/min y a temperatura ambiente ($\pm 22^{\circ}\text{C}$). Esta velocidad ultrabaja de circulación del buffer permite que se establezca un equilibrio entre el líquido extracelular y la solución Ringer presente en el interior de la membrana. Bajo estas condiciones se lleva a cabo un proceso de difusión pasiva a través de la membrana de diálisis, a favor del gradiente de concentración, de manera tal que ingresan sustancias desde el espacio extracelular hacia el interior de la *probe* (ver [Figura 6d](#)). En el conducto de salida u *outlet* de la *probe* también se conectaron unos tubos para conducir el dializado a los tubos *eppendorff* en los cuales se colectaron las muestras.

La solución similar al líquido cefaloraquídeo (buffer Ringer) está compuesta por una serie de sales en las siguientes concentraciones: cloruro de sodio, 147,0 mM; cloruro de potasio, 4,0 mM y cloruro de calcio, 2,2 mM, todo disuelto en agua ultrapura Milli-Q®, de acuerdo a Pontieri y col. (1995).

Una vez verificado el correcto funcionamiento del circuito “tubos-*probe*-tubos”, los animales fueron trasladados a la habitación experimental, dentro su caja-hogar. Las muestras colectadas durante las primeras 2 h, mientras el animal permanecía dentro de su caja-hogar, fueron necesarias para establecer una línea de base de glutamato extracelular y para poder reportar el cambio relativo en los niveles según un “punto de partida”. Posteriormente, los animales fueron sometidos a los protocolos de microinfusión de ligandos y/o estrés/no estrés, según corresponda, para luego continuar recolectando las muestras de microdializado de la misma manera y durante 1 h, pero esta vez dentro de alguno de los compartimentos principales del aparato de CPP (ya sea el compartimento asociado a la droga o el opuesto, según el experimento). Una vez finalizado el procedimiento, el flujo de circulación fue detenido y los animales fueron regresados a su caja-hogar y a la sala de alojamiento. En resumen, se tomaron muestras durante 120 min en la caja-hogar, luego se aplicaron los correspondientes tratamientos de microinfusión de ligandos y de estrés y, una vez finalizados, los animales fueron inmediatamente transferidos al aparato de CPP para tomar muestras durante 60 min. En la [Figura 7](#) se muestra un esquema general de este protocolo. Todas las muestras se colectaron intercambiando cada 15 min los tubos *eppendorff* estériles rotulados que se iban cargando con el dializado y que se posicionaban en el extremo final del tubo

conectado al conducto de salida de cada *probe*.

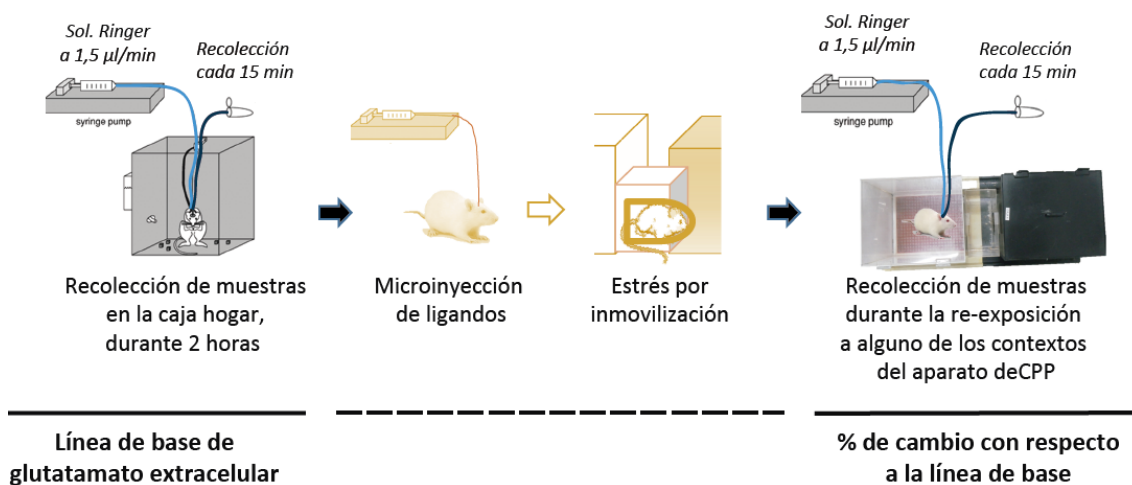


Figura 7. Representación del protocolo general de microdiálisis *in vivo* para coleccionar muestras de fluido extracelular en animales vivos y en libre movimiento expuestos a diferentes tratamientos farmacológicos y conductuales. Las primeras muestras son tomadas mientras el animal permanece en su caja-hogar, lo cual permite la determinación de una línea de base al calcular un promedio de las concentraciones de glutamato extracelular antes de recibir los tratamientos. Posteriormente los animales son sometidos a la microinfusión de ligandos y/o a una sesión de estrés por inmovilización de acuerdo al experimento. Finalizada la aplicación de estos tratamientos, los animales son transferidos al aparato de CPP para continuar con la recolección de muestras de dializado. En determinados experimentos los animales fueron directamente transferidos desde su caja-hogar al aparato de CPP, sin recibir ningún tipo de tratamiento. Más detalles en el texto.

Es importante mencionar que los tubos de microdiálisis fueron desconectados y reconectados a las *probes* antes y después de la aplicación de estrés por inmovilización, respectivamente. De la misma manera, los animales del grupo “no estrés” también fueron desconectados y reconectados del circuito de tubos durante el mismo período de tiempo que los animales “estrés”, pero permanecieron en sus cajas-hogar sin ningún tipo de manipulación hasta la transferencia a los compartimentos del aparato de CPP. La realización previa de pruebas piloto demostró que este procedimiento de desconexión-reconexión no afectó la eficacia de la diálisis.

Las muestras de dializado se coleccionaron cada 15 min en tubos *ependorff*, tal como se describió en el párrafo anterior. En algunos casos, las muestras fueron recogidas automáticamente en viales mantenidos en un colector de fracciones refrigerado a 4°C. En ambos casos, las muestras fueron almacenadas en un freezer a -80°C hasta su posterior análisis neuroquímico. En todos los casos, se intentó que los tubos tanto de entrada como de salida tuvieran siempre la misma longitud para garantizar que en el

volumen de todas las muestras, de todos los animales, se mantuviera la misma relación entre el tiempo de ocurrencia de un evento y la obtención de la muestra en el tubo *ependorff*.

Los cambios en los niveles de glutamato extracelular se calcularon como un porcentaje de la línea de base, la cual se establece para cada animal a partir de las muestras obtenidas cuando éste permanece en su caja-hogar durante las primeras 2 h (como mínimo) antes de recibir los tratamientos farmacológicos o conductuales. Durante ese periodo de tiempo inicial también se estabilizan las concentraciones alcanzadas dentro de la membrana de diálisis. La línea de base representa el 100% y se definió como la concentración promedio de las cuatro últimas muestras, antes de la exposición al tratamiento correspondiente y al contexto del CPP. Además, la línea de base se estableció cuando las muestras diferían en no más del 15% entre sí y los datos se descartaron del análisis estadístico si los sujetos no alcanzaban este criterio, es decir que el animal fue excluido del análisis si las concentraciones de glutamato no eran estables durante la determinación de la línea de base. El análisis *post hoc* se hizo comparando todas las muestras de la línea de base con la primera muestra recolectada dentro del aparato de CPP.

Microdiálisis reversa para la administración de ligandos

La técnica de microdiálisis reversa puede ser empleada para administrar una sustancia en el área de interés a partir de su adición en el líquido circulante (buffer Ringer en este caso) y su pasaje al medio extracelular a favor del gradiente de concentración a través de la membrana de la *probe* (Hocht y col., 2007) (ver [Figura 8](#)). En el presente trabajo, esta técnica se empleó para administrar dosis crecientes del agonista para CB₁R, ACEA, en NAc mientras los animales permanecían en su caja-hogar dentro de la habitación experimental, sin ningún contacto con las operadoras, ni con el aparato de CPP y ningún otro estímulo. De esta manera, fue posible obtener muestras conteniendo el glutamato en sus niveles extrasinápticos basales, no inducidos por estímulo, bajo condiciones de activación *in vivo* de los CB₁Rs. El uso de esta variante de la técnica de microdiálisis para evaluar los [niveles basales de glutamato](#) en respuesta a

la administración de dosis crecientes de un antagonista de CB₁R, SR141716A, ha sido reportado por Li y col. (2018).

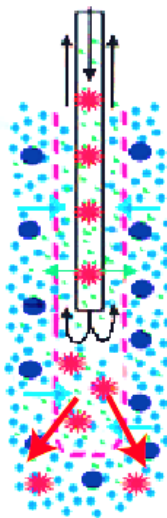


Figura 8. Representación del principio de la microdiálisis reversa. La *probe* insertada en el tejido es perfundida con la solución Ringer que contiene el compuesto exógeno a administrar (asteriscos rojos). La membrana semipermeable de la *probe* (línea punteada rosa) permite que el compuesto exógeno difunda a favor del gradiente de concentración (flechas rojas) hacia el espacio extracelular del tejido de interés. Simultáneamente, las sustancias endógenas presentes en el espacio extracelular ingresan a la membrana (flechas celestes) y de esta manera son colectadas en el dializado para su posterior análisis. Las flechas negras indican el sentido de circulación de la solución Ringer. Más detalles en el texto.

El procedimiento de recolección de muestras se llevó a cabo de forma muy similar a la descrita anteriormente para la microdiálisis “simple”. En primer lugar, se tomaron muestras durante 2 h para determinar la línea de base. Luego, sin desconectar el circuito, el agonista de CB₁R, disuelto en solución Ringer en una concentración de 10 nM, fue perfundido a través de la *probe* durante 1 h. Consecutivamente y de la misma manera, se administraron dos concentraciones adicionales de ACEA (100 y 1000 nM, soluciones preparadas el día del experimento). Por lo tanto, para cada animal mantenido en su caja-hogar se obtuvieron cuatro muestras (cada 15 min) por cada concentración de ACEA. De esta manera, el agonista de CB₁R fue administrado de manera continua en NAc Core y se analizaron las variaciones sucesivas en los niveles basales de glutamato extracelular en respuesta a la activación de los CB₁Rs. Las dosis administradas mediante este método fueron elegidas en base al trabajo de Cenni y col. (2006), consistente con el rango de concentraciones efectivas para modular la liberación de neurotransmisores *in vitro* (Kofalvi y col., 2005).

Identificación y cuantificación de glutamato

El contenido de glutamato de cada una de las muestras obtenidas con la técnica de microdiálisis *in vivo* se analizó mediante el uso del equipo ESA Coulochem III (Bedford, MA, Estados Unidos), en el cual los componentes de la muestra pueden ser separados mediante cromatografía líquida de alta performance (HPLC, por sus siglas en inglés) e identificados/cuantificados mediante detección electroquímica. La técnica analítica para cuantificar glutamato en el presente trabajo está basada en un estudio previo de nuestro laboratorio (Garcia-Keller y col., 2013), con leves modificaciones. El equipo ESA Coulochem III con inyección manual de la muestra permite emplear un método de derivatización pre-columna del 100% de las moléculas de glutamato para que sus derivados electroactivos puedan ser detectados. El empleo de este método tiene la ventaja de ser altamente sensible y reproducible al momento de identificar y cuantificar el glutamato.

La fase móvil estuvo compuesta de Na_2HPO_4 100 mM, 1,75% de acetonitrilo y 20% de metanol; el pH se ajustó a 6,67 con ácido fosfórico. Todos los solventes de grado HPLC se obtuvieron de Sintorgan S.A., Argentina. El agua ultrapura Milli-Q[®] utilizada para la preparación de la fase móvil se sometió a un tratamiento de purificación adicional (polishing), para reducir las corrientes de fondo del electrodo y proporcionar una mejor sensibilidad en la detección electroquímica. La fase móvil fue administrada por una bomba (Modelo 582, Solvent Delivery Model, ESA Chemsford, Estados Unidos) a un flujo de 0,6 ml/min a través de una columna analítica de fase inversa reversa C18 (Gemini N 3 μm ; 150 \times 4,6 mm; Phenomenex, Estados Unidos). La concentración de glutamato se determinó mediante derivatización previa a la columna con O-ftalaldehído y O- β -mercaptoetanol (OPA/BME) en buffer de tetraborato de sodio (0,1 M, pH 9,3), de manera similar a un trabajo previo de nuestro laboratorio (Garcia-Keller y col., 2013) y según el trabajo de Donzati & Yamamoto (1988). La solución derivatizante de trabajo fue preparada diariamente diluyendo 250 μl de la solución OPA/BME en 750 μl del buffer de tetraborato de sodio. Para el análisis, se mezclaron 7,5 μl de la solución de trabajo con 10 μl del dializado de la muestra. Luego de completarse los 2 min de reacción, se inyectó 10 μl de esta mezcla manualmente en el circuito de inyección de 20 μl del equipo. Luego de pasar por la columna cromatográfica, los derivados electroactivos de

glutamato son detectados coulombimétricamente en una celda electroquímica (ESA Modelo 5014B), la cual consta de tres electrodos: un electrodo de referencia (+650 mV), un electrodo analítico de oxidación (+150 mV) y un electrodo analítico de reducción (+550 mV), de acuerdo al método de Donzanti y Yamamoto (1988). El tiempo de retención y la altura de los picos de glutamato se analizaron utilizando el software de integración EZChrom Elite v4.0 (Agilent-Technologies, Estados Unidos). Los valores obtenidos para las muestras se compararon con los valores de una curva estándar externa, calculada midiendo diferentes concentraciones conocidas de glutamato (1,25, 2,5, 5, 10, 20 y 40 μM) preparadas en agua *polished* y metanol de grado HPLC (50:50, v/v).

Análisis estadístico de la cuantificación de glutamato

Las concentraciones de glutamato, determinadas mediante HPLC y detección electroquímica, fueron transformadas a valores porcentuales debido a la variabilidad entre las mediciones y entre las cantidades absolutas recolectadas por las *probes*. Estos valores de glutamato extracelular representan el porcentaje de cambio con respecto a una línea de base (determinada para cada animal) que representa el 100% y que se calculó mediante el promedio de las últimas cuatro muestras recolectadas antes de la aplicación de los tratamientos y la exposición al aparato de CPP. En las figuras que muestran el curso temporal de los cambios de glutamato extracelular, los valores son expresados como porcentaje \pm error estándar de la media (S.E.M.) con respecto a la línea de base (% línea de base). En la [Tabla 1](#) los valores de glutamato medidos solamente durante la exposición al aparato de CPP se expresan como área bajo la curva (AUC) \pm S.E.M. Los valores absolutos de la línea de base (glutamato basal) mostrados en la [Tabla 2](#) son expresados en pmol/muestra \pm S.E.M.

Los criterios utilizados para incluir los datos en el análisis estadístico fueron: que los animales presenten niveles detectables de glutamato y que las muestras de la línea basal sean estables, es decir que las muestras no difieran entre sí en más de un 15%. También se consideró la correcta posición de las membranas de diálisis en NAc Core, determinada por el análisis histológico de los cerebros fijados.

Para el análisis estadístico de los efectos principales se realizó un ANOVA de una,

dos o tres vías con muestras repetidas en el tiempo, según el experimento. Para las comparaciones múltiples entre grupos se utilizó el test *post hoc* de Bonferroni. Los factores bajo consideración fueron: tratamiento (AM251/vehículo o ACEA/vehículo) y estrés (estrés de 15 o 30 min/no estrés). Teniendo en cuenta que la microdiálisis permite el estudio temporal de los cambios en los niveles de glutamato, el factor considerado como muestras repetidas es el “tiempo” el cual está representado por el avance en la toma de muestras a lo largo del experimento (cada 15 min). En los experimentos en los cuales se analizó si el aumento de glutamato era dependiente del contexto, los factores fueron: contexto (apareado/no apareado a cocaína) y el tiempo.

Los análisis estadísticos se realizaron mediante el software Prism 8 (GraphPad, Estados Unidos). La significación estadística de los datos de microdiálisis fue de $p < 0,05$. Los tamaños de muestra de todos los grupos, las pruebas estadísticas específicas aplicadas, los efectos estadísticos y la significación estadística de cada experimento se informan en las leyendas de las figuras y en el texto de la sección Resultados.

Ensayo de recuperación *in vitro*

Todas las *probes* de microdiálisis fueron sometidas a una prueba de recuperación *in vitro* con el fin de verificar la eficacia y la eficiencia relativa del proceso de diálisis a través de la membrana semipermeable (de Lange, 2013). Para ello se calculó el porcentaje de glutamato extracelular recolectado en el interior de la membrana de diálisis con respecto a una concentración conocida de glutamato en un medio externo. Cada ensayo se fue realizado previamente y el mismo día de la cirugía estereotáxica de implantación de la *probe*. En términos generales, cada ensayo consistió en sumergir la porción “interna” de la *probe* (donde está ubicada la membrana de diálisis) en un tubo *ependorff* con solución Ringer que contenía D-glutamato en una concentración de 40 μM (Sigma Aldrich, Estados Unidos) a temperatura ambiente (± 22 °C). Se conectó la *probe* a los tubos de microdiálisis (BASi, Estados Unidos) de manera tal que a través del conducto de entrada o *inlet* de la *probe* se ingresó solución Ringer y por el *outlet* se colectó el dializado en viales. Al igual que lo descrito para la microdiálisis *in vivo*, la solución Ringer fue impulsada a una velocidad de 1,5 $\mu\text{l} / \text{min}$ con el uso de una jeringa Hamilton de 1 ml en una bomba de ultraperfusión constante (BASi, Estados Unidos).

Después de un tiempo de equilibrio de 30 min, se recogieron dos muestras sucesivas cada 15 min. Inmediatamente después, se cuantificó el glutamato y se calculó el porcentaje de recuperación *in vitro*, comparando la concentración de la muestra con la concentración contenida en la solución en la cual se sumergió la *probe*. En promedio, el valor porcentual de recuperación *in vitro* para glutamato en nuestras *probes* fue de aproximadamente 10%, con valores que variaron entre el 5% y el 15%. Este procedimiento se realizó con todas y cada uno de las *probes* el mismo día (unas horas antes) que la implantación de las mismas mediante cirugía estereotáxica. La importancia de este ensayo recae en que aquellas *probes* que mostraron un porcentaje de recuperación inferior al 5% no fueron usadas, es decir que no fueron implantadas en los animales. Además, este ensayo permitió descartar con anticipación a aquellas *probes* que presentaban algún defecto de fabricación, como la falta de circulación de líquido o pérdidas, lo cual conducía a variaciones en el volumen final colectado.



RESULTADOS

A. Consideraciones metodológicas del modelo de reinstalación inducida por estrés bajo el paradigma de preferencia condicionada a un sitio asociado a cocaína.

1. Población de animales en estudio.

En primer lugar, es importante destacar que aproximadamente un 38-40% del total de animales empleados para el presente estudio no superaron los diferentes test del modelo conductual de CPP y debieron ser descartados por no cumplir con los criterios establecidos. Un porcentaje similar (36%) fue reportado en un trabajo previo de nuestro laboratorio (De Giovanni y col., 2016).

Durante el test basal (TB), o pre-condicionamiento como también se puede encontrar en la bibliografía, aproximadamente un 6% de los animales demostraron una preferencia incondicionada por alguno de los compartimentos del aparato de CPP o permanecieron más de 300 segundos en el corredor central, por lo cual debieron ser descartados.

Luego del test de condicionamiento (TC) fueron descartados aproximadamente un 30-40% de los animales que habían superado el test basal previo y que habían sido sometidos al protocolo de condicionamiento de 8 días. Como se ha mencionado en la sección Materiales y Métodos, los animales descartados en esta etapa fueron aquellos que no evidenciaron preferencia condicionada al contexto asociado a la inyección de cocaína según el criterio establecido, es decir aquellos animales que permanecieron menos del 66% del tiempo total del test dentro del compartimento asociado a la droga. A pesar de que muy pocos trabajos reportan la cantidad (relativa o absoluta) de animales excluidos en cada uno de los test del protocolo de CPP, nuestros valores se podrían asemejar a los obtenidos por otros laboratorios. Por ejemplo, en el trabajo de Brenhouse & Andersen (2008) se reporta que ratas adultas y adolescentes de la cepa Wistar adquieren el CPP de manera robusta cuando se usa una dosis de cocaína de 20 mg/kg, pero cuando se usa una dosis de 10 mg/kg de cocaína menos de la mitad de los animales adultos (3/8) y todos los animales adolescentes adquieren la preferencia condicionada por el contexto apareado a la droga. Es decir, el proceso de adquisición del CPP es variable, depende de la edad, de la dosis y probablemente de varias otras variables

experimentales. En la bibliografía no se encuentra ningún trabajo que analice sistemáticamente este fenómeno, pero de modo general se podría comparar con resultados epidemiológicos que indican que no todas las personas que experimentan con drogas desarrollan dependencia.

Luego de que los animales pasaran por la etapa de extinción de la preferencia condicionada, entre un 5 y 10% de los mismos no cumplieron con el criterio establecido para el test de extinción, es decir que pasaron más del 66% del tiempo total del test dentro del compartimento asociado a la droga. Este porcentaje bajo de animales descartados es consistente con las conclusiones de trabajos previos, incluido el nuestro, que sostienen que la aplicación del protocolo de extinción por apareamiento salino resulta efectivo para disminuir la preferencia condicionada al contexto asociado a cocaína (De Giovanni y col., 2016; Itzhak & Anderson, 2012; Mueller & Stewart, 2000). Por otro lado, cabe destacar que aproximadamente 1 de cada 10 animales no superó exitosamente la etapa de cirugía estereotáxica para implantación de las cánulas guía o de las *probes* de microdiálisis, ya sea por una falla cardíaca ante la administración de la anestesia, por una recuperación tardía o deficiente de su estado de salud general, o por algún incidente con el implante craneal.

En síntesis, un 60% de la cantidad inicial de animales fue finalmente evaluado en el test de reinstalación inducida por estrés bajo los distintos tratamientos experimentales designados.

En el caso de los experimentos de microdiálisis *in vivo* (Objetivos específicos 2, 3 y 4), los valores porcentuales de animales descartados por incumplir con los criterios de inclusión para cada uno de los test fueron los mismos y solo se usaron los animales que fueron superando cada una de las etapas.

2. Relación entre el tiempo de inmovilización y la reinstalación de la preferencia condicionada a un sitio asociado a cocaína.

En la [Figura 1A](#) se presenta, de manera esquemática y cronológica (en días), la línea del tiempo del [protocolo general](#) empleado en el presente trabajo para inducir la reinstalación inducida por estrés por inmovilización, en animales que previamente extinguieron el CPP asociado a cocaína. Esta línea del tiempo incluye el test de preferencia basal (TB), las fases de condicionamiento y extinción con sus test correspondientes (TC y TE), y el día de la reinstalación propiamente dicha en donde se aplicaron los distintos tratamientos a analizar, que en este caso son las diferentes duraciones de la sesión de estrés (0, 15 y 30 min) previa al test de reinstalación (TR). A los fines prácticos del análisis integrado planteado en esta sección, se omitió el proceso de microinyección y la etapa de cirugía estereotáxica (ver experimentos de la sección siguiente). Las bases comportamentales de nuestro protocolo de CPP ya han sido publicadas previamente (De Giovanni y col., 2016) y en la presente tesis se vuelve a presentar un análisis de los datos de conducta de la reinstalación del CPP en respuesta a las distintas intensidades de inmovilización utilizadas para nuestros objetivos.

Cabe destacar que de ahora en adelante nos referiremos a los compartimentos del CPP como “el contexto apareado a cocaína” y “el contexto no apareado a cocaína o apareado a solución salina” según la designación individual que se hizo previamente con cada animal durante la etapa de condicionamiento. Es decir, que el compartimento designado (negro o blanco indistintamente) para asociar con la inyección de cocaína durante el condicionamiento, sirve de referencia para evaluar los cambios en la preferencia (aumento o disminución) por dicho compartimento según se vaya avanzando con el protocolo de CPP. De hecho, para esta tesis el índice de preferencia se expresa como la diferencia entre el tiempo de permanencia en el contexto asociado a cocaína *menos* el tiempo de permanencia en el contexto asociado a solución salina [CONTEXTO COC – CONTEXTO SAL].

Como ya se describió en la sección correspondiente de Materiales y Métodos, el día de la reinstalación los animales fueron inmovilizados en un dispositivo de acrílico dentro del corredor central del aparato de CPP (15 o 30 min) o permanecieron en su

caja-hogar (grupo sin estrés). Inmediatamente después se realizó el TR propiamente dicho, permitiéndole a los animales el libre acceso a todo el aparato y midiendo el tiempo de permanencia en cada compartimento durante 15 min. En la [Figura 1B](#) se muestran los datos de comportamiento de todos los test de CPP correspondientes a los animales controles (que recibieron un tratamiento con solución vehículo) de los experimentos farmacológicos descritos más abajo (I al V).

Como puede observarse en el TR de la [Figura 1B](#), los animales estresados durante 30 min (E30) mostraron un marcado restablecimiento de la preferencia por el contexto previamente asociado a la droga, mientras que los animales expuestos sólo a 15 min de inmovilización (E15), o que no fueron estresados (NE), no evidenciaron tal aumento de la preferencia. El grupo E30 fue el único que en el TR permaneció más tiempo en el contexto asociado a cocaína que dentro del compartimento asociado a salina, en relación a los tiempos de permanencia registrados durante el TE previo. Un ANOVA de dos vías (test x duración del estrés) con los test (TE vs. TR) como muestras repetidas se aplicó a los datos de esta figura. El análisis estadístico arrojó un efecto significativo del test, $F_{(1, 47)} = 36,94$, $p < 0,0001$; de la duración del estrés, $F_{(2, 47)} = 21,64$, $p < 0,0001$; y de la interacción test x duración del estrés $F_{(2, 47)} = 31,07$, $p < 0,0001$. El test de comparaciones múltiples *post hoc* de Bonferroni reveló el aumento significativo del índice de preferencia del grupo E30 con respecto a los grupos NE y E15 durante el RT ($p < 0,0001$), y con respecto a los valores del mismo grupo, pero durante el TE ($p < 0,0001$). En conclusión, una sesión de estrés de 30 min, pero no de 15 min, indujo reinstalación de la preferencia condicionada a cocaína previamente extinguida. A partir de esta observación, la sesión de estrés por inmovilización de 15 min fue elegida al momento del diseño de los experimentos con el agonista CB₁R ACEA (Experimentos [III](#), [IV](#) y [V](#)) y denominada “estrés sub-umbral” a los fines prácticos de la descripción de los resultados. Dicha elección se basa en la hipótesis de que el efecto de un estrés sub-umbral puede ser potenciado por un tratamiento farmacológico que facilite algún mecanismo celular subyacente, en este caso la activación de los CB₁Rs.

En la [Figura 1B](#) también se presentan los datos de los test TB y TC. Tal como se observa en la figura y como demuestra el análisis estadístico, los animales de todos los grupos evidenciaron un aumento significativo de la preferencia por el contexto asociado

a la droga durante el TC con respecto a los valores obtenidos durante el TB previo. Esta adquisición del CPP fue uniforme para todos los grupos, sin diferencias significativas entre los mismos. El ANOVA de dos vías (test x duración del estrés) con los test (TB vs. TC) considerados como muestras repetidas reveló el efecto principal de este último factor solamente, $F_{(1, 47)} = 315,1$, $p < 0,0001$. El test *post hoc* reveló que los índices de preferencia de todos los grupos son significativamente diferentes a los medidos previamente en el TB ($p < 0,0001$), sin diferencias entre los grupos. En base a la bibliografía específica del método (Mueller & Stewart, 2000; Tzschentke, 2007), este aumento significativo en el tiempo de permanencia refleja la adquisición del aprendizaje y la expresión de la respuesta condicionada. De la misma manera, a partir de la [Figura 1B](#) podemos afirmar que la aplicación del protocolo de extinción por apareamiento salino redujo la preferencia condicionada al sitio previamente asociado con cocaína. Esta extinción del CPP queda evidenciada mediante la disminución significativa del índice de preferencia durante el TE con respecto a la preferencia determinada previamente durante el TC. Al aplicar un ANOVA de dos vías de muestras repetidas a los datos de los test TC y TE se evidencia el efecto significativo del test, $F_{(1, 47)} = 120,7$, $p < 0,0001$, y el test *post hoc* evidencia la diferencia significativa entre los índices de preferencia de ambos test ($p < 0,0001$), sin diferencias entre los grupos.

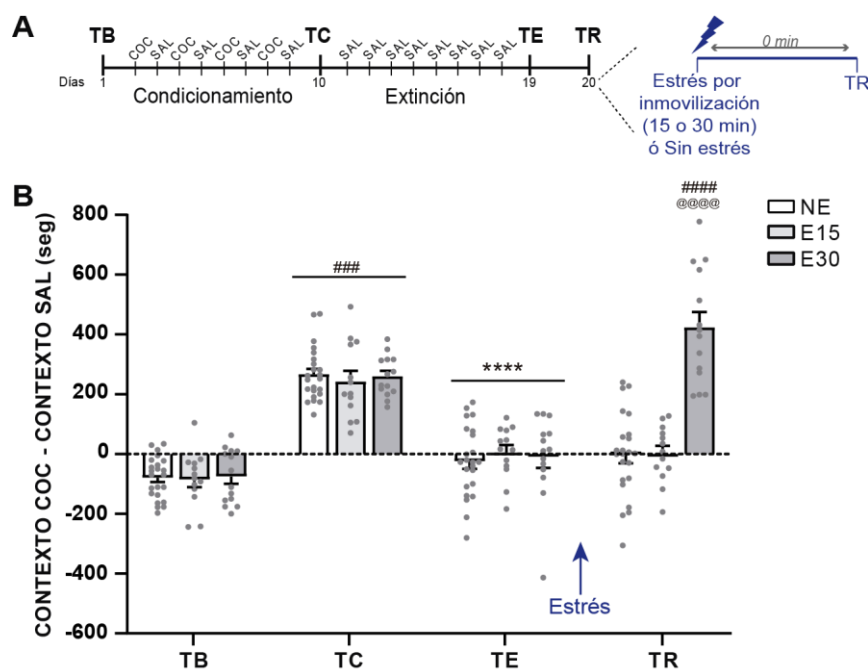


Figura 1. (A) Protocolo experimental. TB= Test Basal; COC= Inyección de cocaína 10mg/kg vía i.p., SAL= Inyección de solución salina vía i.p., TC= Test de Condicionamiento; TE= Test de Extinción; TR= Test de

Reinstalación inducida por estrés. Los procedimientos de estrés llevados a cabo el día de la reinstalación se describen en el texto. **(B) Índice de preferencia calculado para cada uno de los test del protocolo.** Contexto COC – Contexto SAL=Diferencia en el tiempo de permanencia entre el contexto asociado a la droga y el contexto asociado a salina. NE=Animales no sometidos a estrés en el TR. E30=Animales sometidos a una sesión de estrés por inmovilización de 30 min de duración en el TR. E15=Animales sometidos a una sesión de estrés por inmovilización de 15 min de duración en el TR. Los animales que fueron estresados durante 30 min muestran un marcado aumento del índice de preferencia durante el TR (####p<0,0001 en comparación con el mismo grupo durante el TE y @@@@p<0,0001 en comparación con los grupos NE y E15). Las barras con puntos representan la media \pm S.E.M., N=23 para el grupo NE, N=13 para el grupo E15, y N=14 para el grupo E30. Durante el TC, se evidencia que todos los grupos adquirieron previamente el CPP de manera uniforme, sin diferencias en el índice de preferencia entre ellos (###p<0,001 en comparación con el TB). Durante el TE, se evidencia que todos los grupos extinguieron el CPP de manera uniforme (****p<0,0001 en comparación con el TC).

B. RESULTADOS EN FUNCIÓN DE LOS OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Objetivo 1: Influencia de la administración local de ligandos para los CB₁Rs, en NAc Core o en NAc Shell, en la reinstalación de la preferencia condicionada a cocaína inducida por estrés

Experimento I. La administración local de AM251 en NAc Core previene la reinstalación de la conducta de preferencia condicionada a cocaína inducida por la exposición a un estrés por inmovilización de 30 min

Diseño Experimental

Con el objetivo de evaluar la participación de los CB₁Rs localizados en NAc Core en la reinstalación inducida por estrés, animales que previamente adquirieron y luego extinguieron la preferencia condicionada a un compartimento asociado a cocaína (ver línea del tiempo en la [Figura 2A](#)) fueron designados al azar en los siguientes seis tratamientos experimentales:

1. Microinfusión de vehículo, DMSO 10% + permanencia en su caja-hogar (VEH/NE).
2. Microinfusión de vehículo, DMSO 10% + sesión de estrés por inmovilización de 30 min (VEH/E30).
3. Microinfusión de AM251 en una dosis de 2,5 nmol /0,5 µl/lado + permanencia en su caja-hogar (AM251-2,5/NE).
4. Microinfusión de AM251 en una dosis de 2,5 nmol /0,5 µl/lado + sesión de estrés por inmovilización de 30 min (AM251-2,5/E30).
5. Microinfusión de AM251 en una dosis de 5 nmol /0,5 µl/lado + permanencia en su caja-hogar (AM251-5/NE).
6. Microinfusión de AM251 en una dosis de 5 nmol /0,5 µl/lado + sesión de estrés por inmovilización de 30 min (AM251-5/E30).

Tal como se presenta en la línea del tiempo de la [Figura 2A](#), la prueba de reinstalación (TR) se llevó a cabo el día posterior al test de extinción (TE). La microinfusión de AM251 en NAc Core (bilateral, 0,5 µl por hemisferio) se realizó tal como se describió en la [sección de Materiales y Métodos](#), 5 min antes de exponer a los

animales al estrés por inmovilización. Una vez finalizado el tiempo de exposición al estrés, los animales fueron liberados del inmovilizador (o retirados de su caja-hogar en el caso del grupo “sin estrés”) e inmediatamente se les dio acceso libre a todo el aparato de CPP durante 15 min para medir los tiempos de permanencia en cada compartimento.

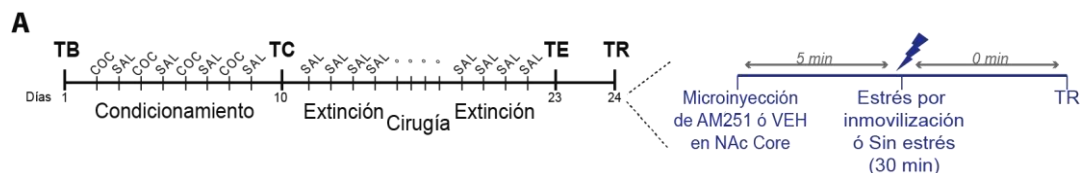


Figura 2. (A) Protocolo experimental. TB= Test Basal; COC= Inyección de cocaína 10 mg/kg vía i.p., SAL= Inyección de solución salina vía i.p., TC= Test de Condicionamiento; TE= Test de Extinción; TR= Test de Reinstalación inducida por estrés. La cirugía estereotáxica para implantación de cánulas guía se realizó a la mitad de la etapa de extinción. Los procedimientos de microinyección y estrés llevados a cabo el día de la reinstalación, como así también los detalles de cada grupo experimental, se describen en el texto.

Resultados

Como se observa en la [Figura 2B](#), se demostró que la microinyección local del antagonista de los CB₁Rs (AM251) en NAc Core, en su dosis más alta (5 nmol/0,5 µl/lado: AM251-5) e inmediatamente antes de la exposición a estrés por inmovilización de 30 min (E30), previno la reinstalación de la preferencia condicionada al contexto asociado con cocaína. Este efecto fue evidenciado por la falta de aumento en el tiempo de permanencia en el contexto asociado a cocaína si se lo compara con los datos del grupo de animales que recibió la microinyección de solución vehículo antes de la exposición al estrés (VEH/E30). Este último grupo fue el único que evidenció un aumento significativo en el índice de preferencia durante el TR con respecto a lo observado durante el TE del día previo (###p<0,001). Ninguno de los grupos que permanecieron en sus cajas-hogar (grupos “sin estrés”, NE) mostraron un aumento de la preferencia durante el TR con respecto a sus respectivos resultados durante el TE previo. Con respecto a los animales que recibieron la dosis más baja del antagonista AM251 (2,5 nmol/0,5µl/ lado) antes del estrés por inmovilización, se observó una tendencia no significativa a la reinstalación de la preferencia, es decir un aumento no significativo de la preferencia durante el TR con respecto al TE previo. Esto podría indicar que esta dosis de AM251 redujo la probabilidad de reinstalación luego del estrés, aunque se mantuvo una tendencia a la falta de efecto. Cabe destacar que los valores de preferencia de este grupo son similares (no hay diferencia estadística) a los obtenidos para el grupo que sí evidencia una robusta

reinstalación (el grupo VEH/E30). En conjunto con la tendencia a la reinstalación, se sugiere una falta de efecto supresor de la reinstalación por parte de la dosis más baja de AM251. En resumen, AM251 microinyectado directamente en NAc Core previene, de manera dosis-dependiente, la reinstalación del CPP inducida por estrés por inmovilización.

Los datos de la [Figura 2B](#) fueron analizados mediante un ANOVA de tres vías (test x tratamiento x estrés) con los test como muestras repetidas (TE vs.TR). La estadística reveló un efecto de la interacción entre el estrés y el tratamiento, $F_{(2,28)}=11,19$, $p<0,05$; de la interacción entre el tratamiento y el test, $F_{(2,28)}=8,58$, $p<0,05$; y de la interacción entre el estrés, el tratamiento y el test, $F_{(2,28)}=6,62$, $p<0,05$. Las comparaciones *post hoc* de Bonferroni indicaron que el índice de preferencia observado en el grupo VEH/E30 durante el TR fue diferente al observado para el mismo grupo durante el TE previo, $###p<0,001$, y diferente a los índices de preferencia observados durante el TR para los grupos VEH/NE, AM251-2,5/NE, AM251-5/NE y AM251-5/E30, $p<0,001$. El test de comparaciones múltiples también revela que el índice de preferencia negativo reportado para el grupo AM251-5/E30 durante el TR es diferente al de los grupos que recibieron la microinyección de VEH y AM251-2,5 y que no fueron estresados (NE), $p<0,05$. Por otro lado, no se observó una diferencia significativa entre los niveles de preferencia del grupo AM251-5/E30 durante el ET y el RT, ni tampoco con respecto al grupo AM251-5/NE durante el RT.

En la [Figura 2B](#) también se muestran los resultados del TB y el TC correspondientes a los mismos animales que fueron finalmente evaluados en el TR. Tal como se observa en la figura y como demuestra el análisis estadístico, todos los animales de todos los grupos evidenciaron un aumento significativo de la preferencia por el contexto asociado a la droga durante el TC con respecto a los valores obtenidos durante el TB previo. Esta adquisición del CPP fue uniforme para todos los grupos, sin diferencias significativas entre los mismos. El ANOVA de tres vías con los test (TB vs.TC) considerados como muestras repetidas reveló el efecto principal de este último factor solamente, $F_{(1,28)}=343,2$, $p<0,0001$. La extinción del CPP queda evidenciada mediante la disminución significativa del índice de preferencia durante el TE con respecto a la preferencia

determinada previamente durante el TC (ANOVA de tres vías con TC y TE como muestras repetidas, efecto significativo del test, $F_{(1, 28)} = 117,6$, $p < 0,0001$).

La [Figura 2C](#) muestran los valores de actividad locomotora, expresados como la suma de las “cuentas totales” medidas para ambos compartimentos durante el TR. Se puede observar que ningún grupo muestra una reducción o un incremento significativo de la actividad locomotora en el aparato de CPP. Esta observación está respaldada estadísticamente por un ANOVA de una sola vía, $F_{(5, 28)} = 1,52$, $p = 0,216$.

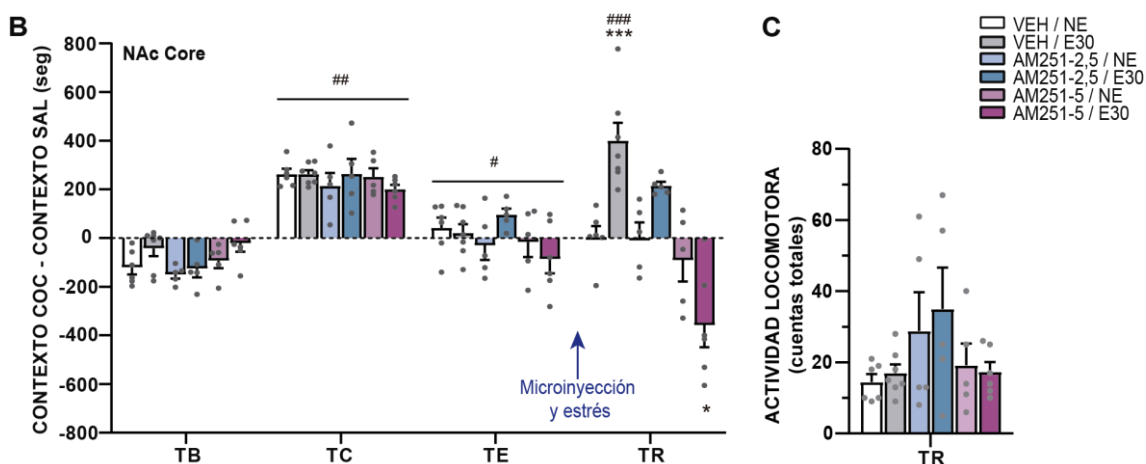


Figura 2. (B) Índice de preferencia calculado para cada uno de los test del protocolo. Contexto COC – Contexto SAL=Diferencia en el tiempo de permanencia entre el contexto asociado a la droga y el contexto asociado a salina. VEH= Solución vehículo, DMSO 10%. Dosis de AM251 microinyectadas en NAc Core previo al TR: 2,5 y 5 nmol/0,5µl/lado (AM251-2,5 y AM251-5). NE=Animales no sometidos a estrés en el TR. E30=Animales sometidos a una sesión de estrés por inmovilización de 30 min de duración en el TR. Los animales que fueron microinyectados con VEH en NAc Core 5 min antes de la exposición a estrés muestran un marcado aumento del índice de preferencia durante el TR (### $p < 0,001$ en comparación con el mismo grupo durante el TE y *** $p < 0,001$ en comparación con los grupos NE y el grupo AM251-5/E30 durante el TR). La microinyección de la dosis más alta de AM251 previene este efecto (* $p < 0,05$ en comparación con los grupos VEH y AM251-2,5 durante el TR). Las barras con puntos representan la media \pm S.E.M., $N=6$ para los grupos VEH/NE y AM251-5/E30, $N=5$ para los grupos AM251-2,5/NE, AM251-2,5/E30 y AM251-5/NS, y $N=7$ para el grupo VEH/E30. Durante el TC, se evidencia que todos los grupos adquirieron previamente el CPP de manera uniforme, sin diferencias en el índice de preferencia entre ellos (### $p < 0,001$ en comparación con el TB). Durante el TE, se evidencia que todos los grupos extinguieron el CPP de manera uniforme, sin diferencias en el índice de preferencia entre ellos (# $p < 0,05$ en comparación con el TC). **(C) Actividad Locomotora.** Cuentas totales de movimiento ambulatorio (media \pm S.E.M.) registradas durante el test de reinstalación. No se observaron diferencias significativas entre los grupos.

Localización de las microinfusiones

En la [Figura 2D](#) se representa la ubicación de los sitios de microinfusión de las distintas dosis de AM251 y de la solución vehículo en los animales que fueron incluidos en los análisis estadísticos de este experimento.

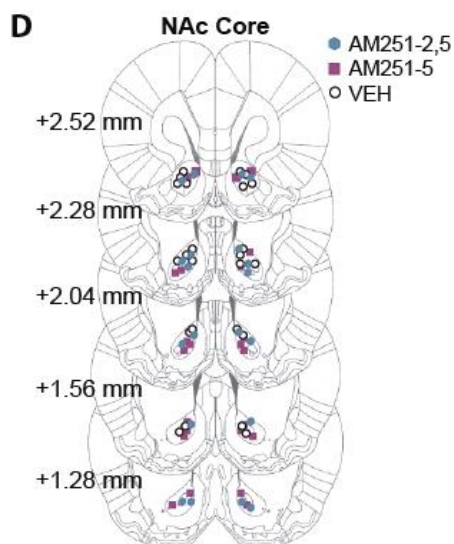


Figura 2. (D) Esquemas de las secciones coronales del cerebro de rata, adaptadas del atlas estereotáxico de Paxinos y Watson (2007), que muestran las ubicaciones bilaterales aproximadas de las microinyecciones en el NAc Core de los animales incluidos en el análisis estadístico (N=34). Los números a la izquierda indican los milímetros en referencia al punto Bregma. Los símbolos representan las diferentes microinyecciones administradas.

Experimento II. La administración local de AM251 en NAc Shell no previene la reinstalación de la conducta de preferencia condicionada a cocaína inducida por la exposición a un estrés por inmovilización de 30 min

Diseño Experimental

Con el objetivo de evaluar la participación de los CB₁Rs localizados en NAc Shell en la reinstalación inducida por estrés, los animales que cumplieron con los criterios de extinción del CPP fueron sometidos al procedimiento de microinyección y de estrés de la misma manera al procedimiento detallado en el experimento anterior (ver línea del tiempo en la [Figura 3A](#)). Los grupos experimentales fueron los siguientes:

1. Microinfusión de vehículo, DMSO 10% + permanencia en su caja-hogar (VEH/NE).
2. Microinfusión de vehículo, DMSO 10% + sesión de estrés por inmovilización de 30 min (VEH/E30).
3. Microinfusión de AM251 en una dosis de 5 nmol /0,5 µl/lado + permanencia en su caja-hogar (AM251-5/NE).
4. Microinfusión de AM251 en una dosis de 5 nmol /0,5 µl/lado + sesión de estrés por inmovilización de 30 min (AM251-5/E30).

La microinfusión de AM251 se realizó directamente en NAc Shell (bilateral, 0,5 µl por hemisferio) 5 min antes de exponer a los animales al estrés por inmovilización. Una vez finalizado el tiempo de exposición al estrés, los animales fueron liberados del

inmovilizador (o retirados de su caja-hogar en el caso del grupo “sin estrés”) e inmediatamente se les dio acceso libre a todo el aparato de CPP durante 15 min para medir los tiempos de permanencia en cada compartimento.

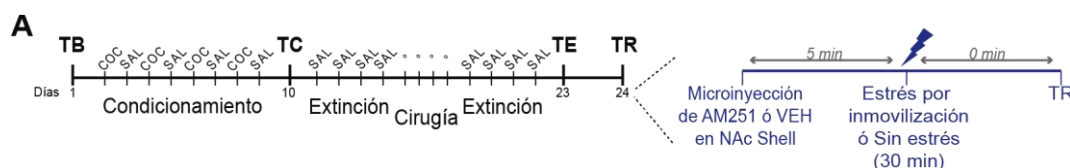


Figura 3. (A) Protocolo experimental. TB= Test Basal; COC= Inyección de cocaína 10mg/kg vía i.p., SAL= Inyección de solución salina vía i.p., TC= Test de Condicionamiento; TE= Test de Extinción; TR= Test de Reinstalación inducida por estrés. La cirugía estereotáxica para implantación de cánulas guía se realizó a la mitad de la etapa de extinción. En cada test los animales pueden recorrer libremente todo el aparato de CPP durante 15 min. Los procedimientos de microinyección y estrés llevados a cabo el día de la reinstalación, como así también los detalles de cada grupo experimental, se describen en el texto.

Resultados

Como se observa en la [Figura 3B](#), la microinyección de AM251 directamente en NAc Shell, en su dosis más alta (5 nmol/0,5 μ l), no fue capaz de suprimir la reinstalación de la conducta de preferencia inducida por estrés. Esta conclusión deriva de la ausencia de una diferencia significativa entre los índices de preferencia observados durante el TR para los grupos de animales sometidos al estrés por inmovilización y que previamente recibieron la microinyección de VEH o de AM251 en NAc Shell. Ambos grupos mostraron un aumento significativo en el tiempo de permanencia en el contexto asociado a la droga durante el TR con respecto al tiempo medido durante el TE del día previo. Los animales que no fueron expuestos al estrés (de los grupos VEH/NE y AM251-5/NE) no evidenciaron tal aumento en el índice de preferencia.

El ANOVA de tres vías (test x tratamiento x estrés) con los test como muestras repetidas (TE vs. TR) reveló el efecto principal del estrés, $F_{(1,22)}=27,57$, $p<0,05$; del test, $F_{(1,22)}=19,63$, $p<0,05$; y de la interacción entre el estrés y el test $F_{(1,22)}=46,08$, $p<0,05$. Las comparaciones *post hoc* de Bonferroni indicaron que los índices de preferencia de los grupos VEH/E30 y AM251-5/E30 durante el TR fueron diferentes a los índices de los mismos grupos medidos durante el TE, $p<0,001$, y a los índices de los grupos no sometidos al estrés (VEH/NE y AM251-5/NE) durante el TR, $p<0,001$.

En la [Figura 3B](#) también se muestran los resultados del TB y TC y se observa que los animales de todos los grupos evidenciaron un aumento significativo de la preferencia por el contexto asociado a la droga durante el TC con respecto a los valores obtenidos

durante el TB previo. Esta adquisición del CPP fue uniforme para todos los grupos, sin diferencias significativas entre los mismos. El ANOVA de tres vías con los test (TB vs.TC) considerados como muestras repetidas reveló el efecto principal de este último factor solamente, $F_{(1, 22)} = 171,5$, $p < 0,0001$. La extinción del CPP para todos los grupos queda evidenciada mediante un ANOVA de tres vías, con TC y TE como muestras repetidas, en el cual se demuestra el efecto significativo del test solamente, $F_{(1, 22)} = 62,88$, $p < 0,0001$.

El análisis de la actividad locomotora (Figura 3C) mediante la comparación entre las cuentas totales medidas en ambos compartimentos del CPP indica que no hay diferencias significativas entre los distintos grupos experimentales que recibieron las microinyecciones de AM251 o VEH en NAc Shell (ANOVA de una vía, $F_{(3, 22)} = 1,96$, $p = 0,149$).

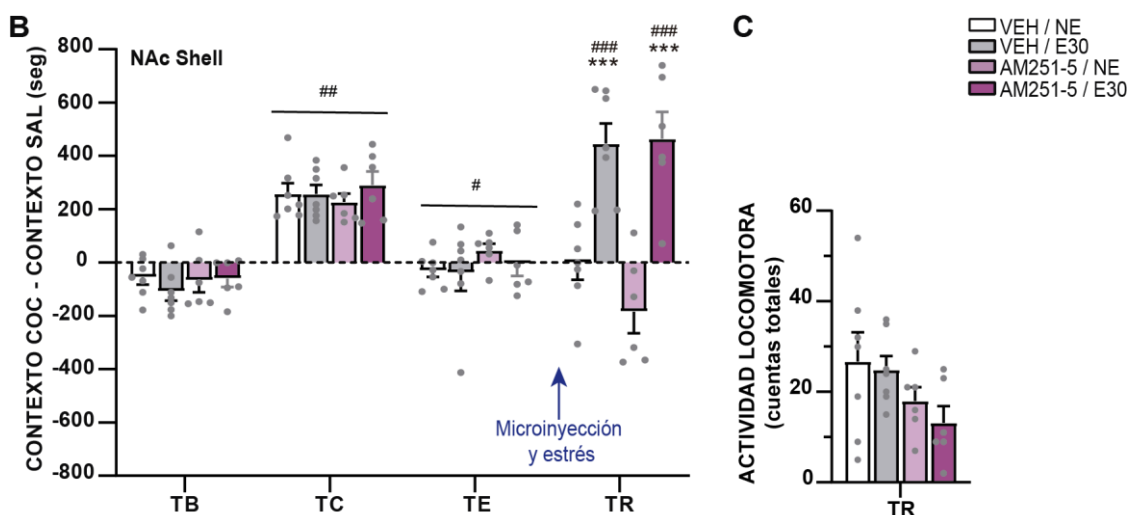


Figura 3. (B) Índice de preferencia calculado para cada uno de los test del protocolo. Contexto COC – Contexto SAL=Diferencia en el tiempo de permanencia entre el contexto asociado a la droga y el contexto asociado a salina. VEH= Solución vehículo, DMSO 10%. Dosis de AM251 microinyectada en NAc Shell en el TR: 5 nmol/0,5 μ l/lado (AM251-5). NE=Animales no sometidos a estrés en el TR. E30=Animales sometidos a una sesión de estrés por inmovilización de 30 min de duración en el TR. Los animales que fueron microinyectados con VEH en NAc Shell 5 min antes de la exposición a estrés muestran un marcado aumento del índice de preferencia durante el TR (** $p < 0,001$ en comparación con los grupos NE durante el TR; ### $p < 0,001$ en comparación con el mismo grupo pero durante el TE). La microinyección de la dosis más alta de AM251 en NAc Shell no previene este efecto. Las barras con puntos representan la media \pm S.E.M., $N=7$ para los grupos VEH/NE y VEH/E30, y $N=6$ para los grupos AM251-5/NE y AM251-5/E30. Durante el TC, se evidencia que todos los grupos adquirieron previamente el CPP de manera uniforme, sin diferencias en el índice de preferencia entre ellos (## $p < 0,001$ en comparación con el TB). Durante el TE, se evidencia que todos los grupos extinguieron el CPP de manera uniforme (# $p < 0,05$ en comparación con el TC). **(C) Actividad Locomotora.** Cuentas totales de movimiento ambulatorio (media \pm S.E.M.) registradas durante el test de reinstalación. No se encuentran diferencias entre los grupos.

Localización de las microinfusiones

En la [Figura 3D](#) se representa la ubicación de los sitios de microinfusión de AM251 y de la solución vehículo en el NAc Shell de los animales que fueron incluidos en los análisis estadísticos de este experimento.

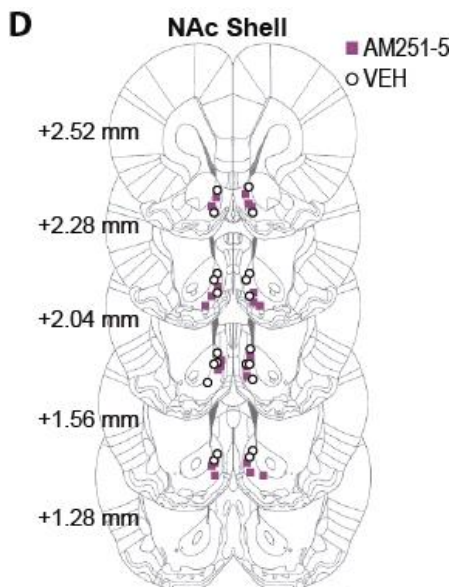


Figura 3. (D) Esquemas de las secciones coronales del cerebro de rata, adaptadas del atlas estereotáxico de Paxinos y Watson (2007), que muestran las ubicaciones bilaterales aproximadas de las microinyecciones en el NAc Shell de los animales incluidos en el análisis estadístico (N=26). Los números a la izquierda indican los milímetros en referencia al punto Bregma. Los símbolos representan las diferentes microinyecciones administradas.

Experimento III. La administración local de ACEA en NAc Core, en combinación con una exposición a estrés sub-umbral, induce reinstalación de la preferencia condicionada a cocaína

Diseño Experimental

Con el objetivo de implementar una herramienta farmacológica adicional para evaluar la participación de los CB₁Rs localizados en NAc Core en la reinstalación inducida por estrés, se realizó la microinyección localizada del agonista ACEA en aquellos animales que cumplieron con los criterios de extinción del CPP (ver línea del tiempo en la [Figura 4A](#)). La duración de la sesión de estrés por inmovilización elegida para este experimento fue la de 15 min, es decir una intensidad del estrés que no induce reinstalación por lo cual la llamamos “sub-umbral”. Dicha elección se basa en la hipótesis de que el efecto de un estrés sub-umbral puede ser potenciado por un tratamiento farmacológico que facilite algún mecanismo celular subyacente, en este caso la activación de los CB₁Rs.

Los grupos experimentales fueron los siguientes:

1. Microinfusión de vehículo, DMSO 0,1% en solución salina + permanencia en su caja-hogar (VEH/NE).
2. Microinfusión de vehículo, DMSO 0,1% en solución salina + sesión de estrés por inmovilización de 15 min (VEH/E15).
3. Microinfusión de ACEA en una dosis de 0,001 fmol /0,5 µl/lado + permanencia en su caja-hogar (ACEA-0,001/NE).
4. Microinfusión de ACEA en una dosis de 0,001 fmol /0,5 µl/lado + sesión de estrés por inmovilización de 15 min (ACEA-0,001/E15).
5. Microinfusión de ACEA en una dosis de 0,01 fmol /0,5 µl/lado + permanencia en su caja-hogar (ACEA-0,01/NE).
6. Microinfusión de ACEA en una dosis de 0,01 fmol /0,5 µl/lado + sesión de estrés por inmovilización de 15 min (ACEA-0,01/E15).

La microinfusión de ACEA también se realizó de manera bilateral (0,5 µl por hemisferio) en NAc Core, 5 min antes de exponer a los animales al estrés por inmovilización. Una vez finalizado el tiempo de exposición al estrés, los animales fueron liberados del inmovilizador (o retirados de su caja-hogar en el caso del grupo “sin estrés”) e inmediatamente se les permitió acceso libre a todo el aparato de CPP durante 15 min para medir los tiempos de permanencia en cada compartimento.

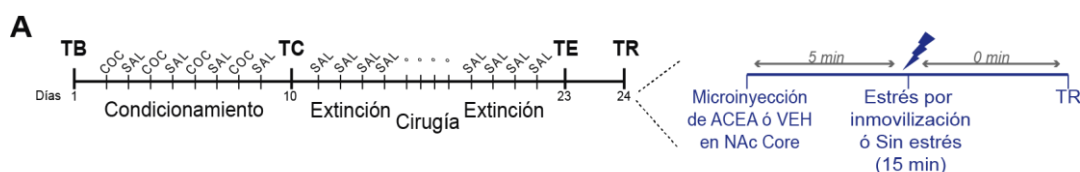


Figura 4. (A) Protocolo experimental. TB= Test Basal; COC= Inyección de cocaína 10mg/kg vía i.p., SAL= Inyección de solución salina vía i.p., TC= Test de Condicionamiento; TE= Test de Extinción; TR= Test de Reinstalación inducida por estrés. La cirugía estereotáxica para implantación de cánulas guía se realizó a la mitad de la etapa de extinción. En cada test los animales pueden recorrer libremente todo el aparato de CPP durante 15 min. Los procedimientos de microinyección y estrés llevados a cabo el día de la reinstalación, como así también los detalles de cada grupo experimental, se describen en el texto.

Resultados

En este experimento ([Figura 4B](#)) puede apreciarse que los animales que recibieron la microinyección de ACEA en su dosis más alta (0,01 fmol/0,5 µl/lado), previamente a ser expuestos al estrés por inmovilización durante 15 min, expresaron un tiempo de permanencia significativamente mayor en el contexto asociado a la droga durante el TR,

en comparación con los tiempos de permanencia medidos para los mismos animales durante el TE del día previo. En contraste, los otros grupos que también fueron expuestos a estrés sub-umbral, pero previamente fueron administrados con VEH o con ACEA en una dosis más baja (0,001 fmol/0,5 µl/lado), no evidenciaron la reinstalación del CPP. Además, la microinyección de ACEA por sí sola en cualquiera de sus dosis, en animales "sin estrés" (NE), no produjo reinstalación de la preferencia. En resumen, estos resultados indican que la activación de los CB₁Rs en NAc Core es capaz de facilitar o potenciar la precipitación de la reinstalación de la preferencia condicionada a cocaína luego de la exposición a una sesión de estrés que no induce reinstalación por sí sola.

El ANOVA de tres vías (test x tratamiento x estrés), con los test como muestras repetidas (TE vs.TR), reveló un efecto de la interacción entre el test y el tratamiento, $F_{(2,29)}=6,67$, $p<0,05$; de la interacción entre el estrés y tratamiento, $F_{(2,29)}=7,60$, $p<0,05$; y de la interacción entre el test, el estrés y el tratamiento $F_{(2,29)}=7,23$, $p<0,05$. No se encontró un efecto significativo en la interacción entre el test y el estrés, $F_{(1,29)}=3,75$, $p=0,062$, consistente con la falta de efecto del estrés sub-umbral sobre la reinstalación. Las comparaciones múltiples mediante el test *post hoc* de Bonferroni indican una diferencia entre el grupo ACEA-0,01/E15 con el resto de los tratamientos durante el TR, $p<0,01$, y con el índice de preferencia del mismo grupo medido durante el TE, $p<0,0001$.

El análisis estadístico de los índices de preferencia obtenidos durante el TB y el TC ([Figura 4B](#)) demuestra que todos los grupos de animales evidenciaron un aumento significativo de la preferencia por el contexto asociado a la droga durante el TC con respecto al TB, es decir que demuestra que todos los animales adquieren el aprendizaje condicionado y que no existen diferencias significativas entre los grupos. El ANOVA de tres vías con los test (TB vs.TC) considerados como muestras repetidas reveló el efecto principal de este último factor solamente, $F_{(1, 29)}= 113,3$, $p<0,0001$. El análisis estadístico de los índices de preferencia obtenidos durante el TC y el TE demuestra que todos los grupos de animales evidenciaron la extinción del CPP (ANOVA de tres vías con muestras repetidas, efecto significativo del test, $F_{(1, 29)}=58,2$, $p<0,0001$).

Finalmente, el análisis de la actividad locomotora dentro de los compartimentos durante el TR demostró que no existen diferencias significativas en este parámetro entre los distintos grupos de animales ([Figura 4C](#); ANOVA de una vía, $F_{(5, 29)}= 1,509$, $p=0,2176$).

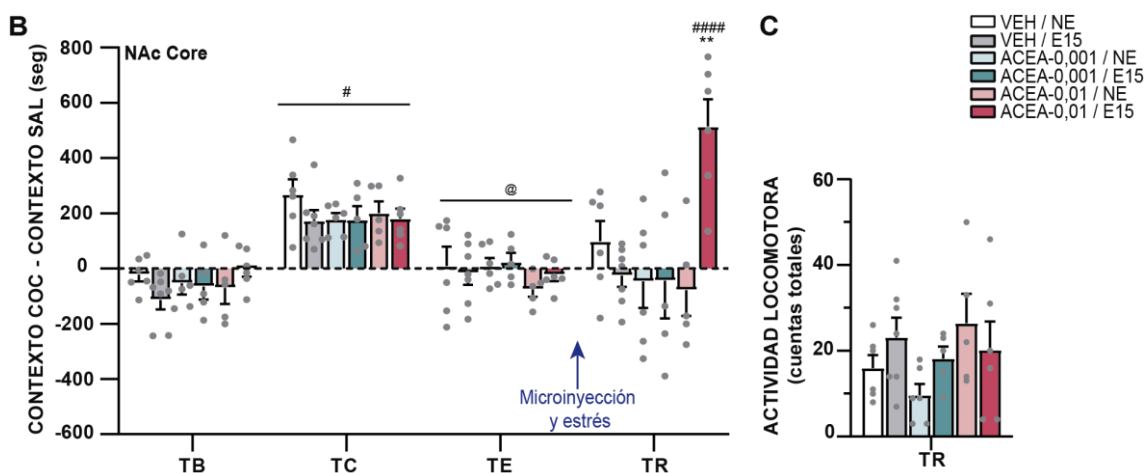
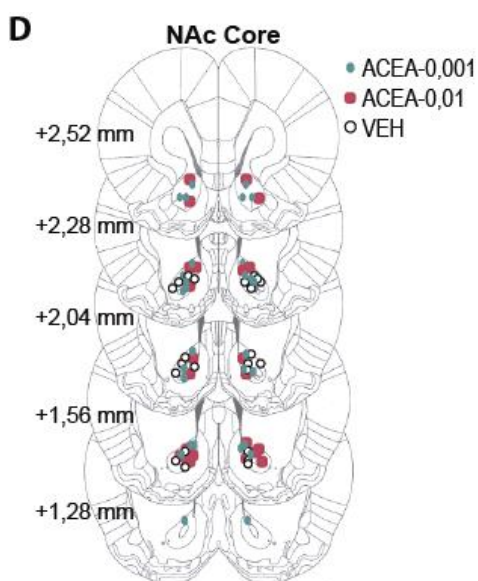


Figura 4. (B) Índice de preferencia calculado para cada uno de los test del protocolo. Contexto COC – Contexto SAL=Diferencia en el tiempo de permanencia entre el contexto asociado a la droga y el contexto asociado a salina. VEH= Solución vehículo, DMSO 0.1% en solución salina. Dosis de ACEA microinyectadas en NAc Core en el TR: 0,001 y 0,01 fmol/0,5 µl/lado (ACEA-0,001 y ACEA-0,01). NE=Animales no sometidos a estrés en el TR. E15=Animales sometidos a una sesión de estrés por inmovilización de 15 min de duración en el TR. Los animales que recibieron VEH en NAc Core 5 min antes de la exposición a estrés no muestran un aumento en el índice de preferencia durante el TR. En cambio, la microinyección de la dosis más alta de ACEA, sólo en combinación con el estrés de 15 min, induce la reinstalación del CPP (** $p < 0,01$ comparado con el resto de los tratamientos durante el TR, #### $p < 0,0001$ comparado con el índice de preferencia del mismo grupo medido durante el TE). Las barras con puntos representan la media \pm S.E.M., $N=6$ para los grupos VEH/NE, ACEA-0,001/NE y ACEA-0,01/E15; $N=5$ para los grupos ACEA-0,001/E15 y ACEA-0,01/NE; y $N=7$ para el grupo VEH/E15. Durante el TC y el TE, se evidencia que todos los grupos adquirieron y extinguieron, respectivamente, el CPP de manera uniforme, sin diferencias en el índice de preferencia entre ellos ($\#p < 0,05$ en comparación con el TB, @ $p < 0,05$ en comparación con el TC). **(C) Actividad Locomotora.** Cuentas totales de movimiento ambulatorio (media \pm S.E.M.) registradas durante el test de reinstalación. No se observan diferencias significativas entre los grupos.

Localización de las microinfusiones



En la [Figura 4D](#) se representa la ubicación de los sitios de microinfusión de ACEA y de la solución vehículo en el NAc Core de los animales que fueron incluidos en los análisis estadísticos de este experimento.

Figura 4. (D) Esquemas de las secciones coronales del cerebro de rata, adaptadas del atlas estereotáxico de Paxinos y Watson (2007), que muestran las ubicaciones bilaterales aproximadas de las microinyecciones en el NAc Core de los animales incluidos en el análisis estadístico ($N=35$). Los números a la izquierda indican los milímetros en referencia al punto Bregma. Los símbolos representan las diferentes microinyecciones administradas.

Experimento IV. La administración local de ACEA en NAc Shell, en combinación con una exposición a estrés sub-umbral, no induce reinstalación de la preferencia condicionada a cocaína

Diseño Experimental

De la misma manera que para el experimento anterior, se evaluó la influencia de la microinyección de ACEA directamente en NAc Shell en la reinstalación del CPP al ser combinada con una sesión de estrés sub-umbral (ver línea del tiempo en la [Figura 5A](#)). Los grupos experimentales fueron los siguientes:

1. Microinfusión de vehículo, DMSO 0.1% en solución salina + permanencia en su caja-hogar (VEH/NE).
2. Microinfusión de vehículo, DMSO 0.1% en solución salina + sesión de estrés por inmovilización de 15 min (VEH/E15).
3. Microinfusión de ACEA en una dosis de 0,01 fmol /0,5 µl/lado + permanencia en su caja-hogar (ACEA-0,01/NE).
4. Microinfusión de ACEA en una dosis de 0,01 fmol /0,5 µl/lado + sesión de estrés por inmovilización de 15 min (ACEA-0,01/E15).

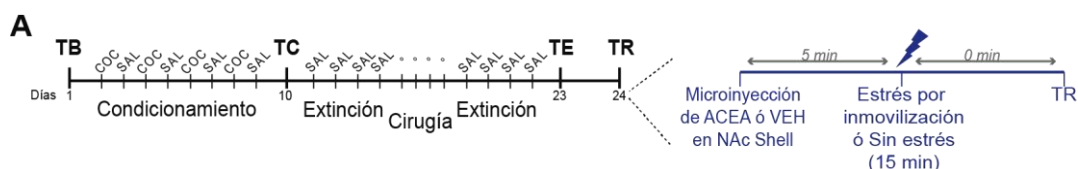


Figura 5. (A) Protocolo experimental. TB= Test Basal; COC= Inyección de cocaína 10mg/kg vía i.p., SAL= Inyección de solución salina vía i.p., TC= Test de Condicionamiento; TE= Test de Extinción; TR= Test de Reinstalación inducida por estrés. La cirugía estereotáxica para implantación de cánulas guía se realizó a la mitad de la etapa de extinción. En cada test los animales pueden recorrer libremente todo el aparato de CPP durante 15 min. Los procedimientos de microinyección y estrés llevados a cabo el día de la reinstalación, como así también los detalles de cada grupo experimental, se describen en el texto.

Resultados

La [Figura 5B](#) muestra que los animales sometidos al estrés por inmovilización durante 15 min, como así también los no estresados, no evidenciaron la conducta de reinstalación de la preferencia al contexto asociado con cocaína, independientemente de si recibieron ACEA (0,01 fmol/0,5 µl/lado) o VEH directamente en NAc Shell. Es decir que, a diferencia de lo que se observó con la microinfusión en NAc Core, la dosis más alta de ACEA administrada en NAc Shell no fue capaz de facilitar o potenciar el aumento de la preferencia condicionada por el contexto previamente asociado a cocaína luego

de aplicar el estrés de 15 min. El ANOVA de tres vías (test x tratamiento x estrés), con los test como muestras repetidas (TE vs.TR), revela que no hubo un efecto significativo en la interacción entre test, estrés y tratamiento, $F_{(1,18)}=0,19$, $p=0,664$; encontrando resultados similares entre el TE y el TR para todos los grupos experimentales, ya sean microinyectados con ACEA o VEH y estresados o no estresados.

El análisis estadístico de los índices de preferencia obtenidos durante el TB y el TC (Figura 5B) demuestra que todos los grupos de animales evidenciaron un aumento significativo de la preferencia por el contexto asociado a la droga durante el TC con respecto al TB, y que no existen diferencias significativas entre los grupos. El ANOVA de tres vías con los test (TB vs.TC) considerados como muestras repetidas reveló el efecto principal de este último factor solamente, $F_{(1, 18)}= 113,2$, $p<0,0001$. El análisis estadístico de los índices de preferencia obtenidos durante el TC y el TE demuestra que todos los grupos de animales evidenciaron la extinción del CPP (ANOVA de tres vías con muestras repetidas, efecto significativo del test, $F_{(1, 18)}=68,85$, $p<0,0001$).

El análisis de la actividad locomotora dentro de los compartimentos durante el test de reinstalación demostró que no existen diferencias significativas entre los diferentes grupos de animales (Figura 5C; ANOVA de una vía, $F_{(3, 18)}= 0,727$, $p=0,549$).

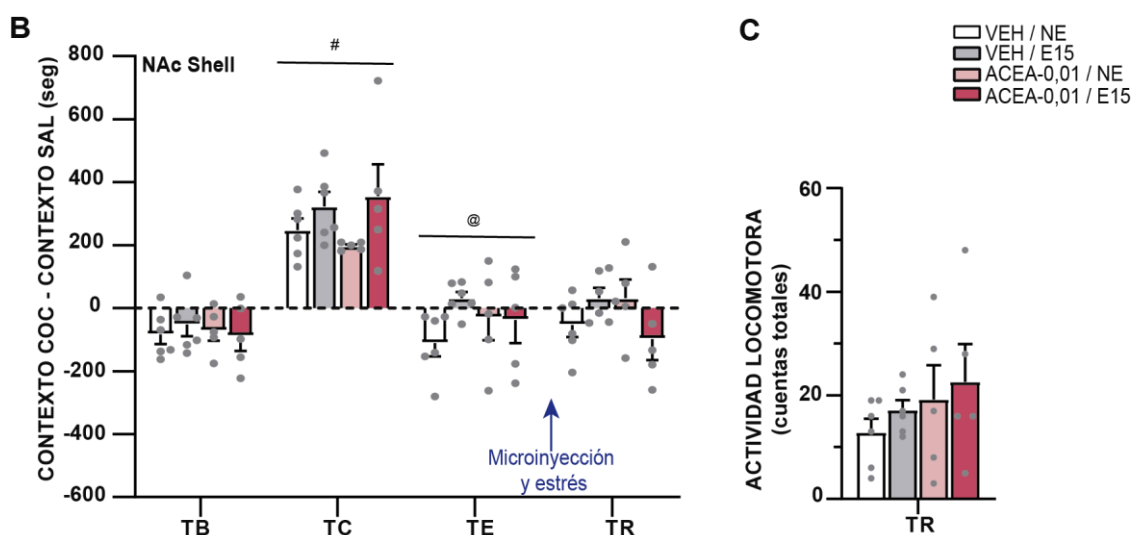


Figura 5. (B) Índice de preferencia calculado para cada uno de los test del protocolo. Contexto Coc – Contexto SAL=Diferencia en el tiempo de permanencia entre el contexto asociado a la droga y el contexto asociado a salina. VEH= Solución vehículo, DMSO 0,1% en solución salina. Dosis de ACEA microinyectada en NAc Shell en el TR: 0,01 fmol/0,5 μ l/lado (ACEA-0,01). NE=Animales no sometidos a estrés en el TR. E15=Animales sometidos a una sesión de estrés por inmovilización de 15 min de duración en el TR. Los animales que fueron microinyectados con VEH en NAc Shell 5 min antes de la exposición a estrés no muestran un aumento en el índice de preferencia durante el TR. La microinyección de la dosis más alta de ACEA en NAc Shell no facilitó el aumento de la preferencia durante el TR. Las barras con puntos

representan la media \pm S.E.M., N=6 para los grupos VEH/NE, VEH/E15, y N=5 para los grupos ACEA-0,001/NE, ACEA-0,001/E15. Durante el TC, se evidencia que todos los grupos adquirieron previamente el CPP de manera uniforme, sin diferencias en el índice de preferencia entre ellos ($\#p < 0,05$ en comparación con el TB). Durante el TE, se evidencia que todos los grupos extinguieron el CPP de manera uniforme ($@p < 0,05$ en comparación con el TC). **(C) Actividad Locomotora.** Cuentas totales de movimiento ambulatorio (media \pm S.E.M.) registradas durante el test de reinstalación. No se observan diferencias significativas.

Localización de las microinfusiones

En la [Figura 5D](#) se representa la ubicación de los sitios de microinfusión de ACEA y de la solución vehículo en el NAc Shell de los animales que fueron incluidos en los análisis estadísticos de este experimento.

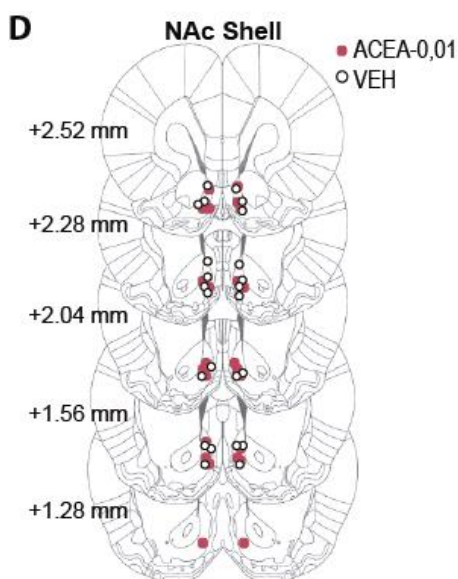


Figura 5. (D) Esquemas de las secciones coronales del cerebro de rata, adaptadas del atlas estereotáxico de Paxinos y Watson (2007), que muestran las ubicaciones bilaterales aproximadas de las microinyecciones en el NAc Shell de los animales incluidos en el análisis estadístico. Los números a la izquierda indican los milímetros en referencia al punto Bregma. Los símbolos representan las diferentes microinyecciones administradas.

Experimento V. El pretratamiento con AM251 previene el efecto facilitador de la administración de ACEA en NAc Core sobre la reinstalación de la preferencia condicionada a cocaína inducida luego de la exposición a estrés sub-umbral

Diseño Experimental

De la misma manera que para los experimentos ya descritos (I-IV), se usaron animales que primero adquirieron, y luego extinguieron, la conducta de CPP asociado a cocaína (ver línea del tiempo en [Figura 6A](#)) para evaluar la especificidad del agonista ACEA sobre los CB₁Rs de NAc Core en la facilitación de la reinstalación de la preferencia luego de la exposición a estrés sub-umbral. Para este experimento se procedió a realizar una doble microinyección que consistió en administrar primero el antagonista AM251 o VEH y, 5 min después, el agonista ACEA. Ambas inyecciones se realizaron de manera

bilateral en NAc Core a través de las mismas cánulas guía. Una vez finalizadas las microinyecciones, se continuó con la exposición a estrés por inmovilización de 15 min y el test subsiguiente (TR). De esta manera, los grupos experimentales analizados fueron los siguientes:

1. Microinfusión de vehículo, DMSO 10% + Microinfusión de ACEA en una dosis de 0,01 fmol /0,5 µl/lado + sesión de estrés por inmovilización de 15 min (VEH/ACEA-0,01/E15).

2. Microinfusión de AM251 en una dosis de 5 nmol /0,5 µl/lado + Microinfusión de ACEA en una dosis de 0,01 fmol /0,5 µl/lado + sesión de estrés por inmovilización de 15 min (AM251-5/ACEA-0,01/E15).

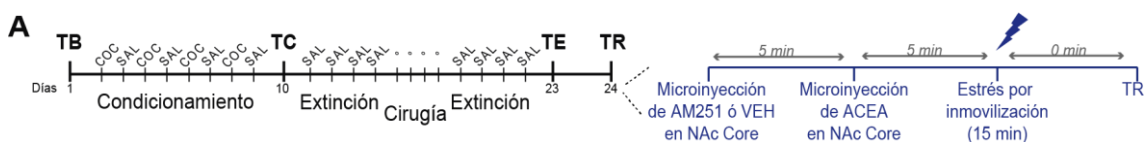


Figura 6. (A) Protocolo experimental. TB= Test Basal; COC= Inyección de cocaína 10mg/kg vía i.p., SAL= Inyección de solución salina vía i.p., TC= Test de Condicionamiento; TE= Test de Extinción; TR= Test de Reinstalación inducida por estrés. La cirugía estereotáxica para implantación de cánulas guía se realizó a la mitad de la etapa de extinción. En cada test los animales pueden recorrer libremente todo el aparato de CPP durante 15 min. Los procedimientos de microinyección y estrés llevados a cabo el día de la reinstalación, como así también los detalles de cada grupo experimental, se describen en el texto.

Resultados

Los resultados presentados en la [Figura 6B](#) demuestran que el pretratamiento con AM251 en NAc Core, antes de la microinfusión de ACEA, previene el efecto facilitador del agonista para precipitar la reinstalación de la preferencia ante la exposición de un estrés sub-umbral. Esto queda plasmado en el aumento del índice de preferencia sólo en el grupo VEH/ACEA-0,01/E15 durante el TR. El análisis estadístico se realizó mediante un ANOVA de dos vías (test x pretratamiento), con los test considerados como muestras repetidas, y se encontraron los efectos principales del test, $F_{(1,14)}=11,90$, $p<0,05$; del pretratamiento, $F_{(1,14)}=39,93$, $p<0,05$; y de la interacción entre el test y el pretratamiento, $F_{(1,14)}=46,16$, $p<0,05$. El test *post hoc* de Bonferroni indica que existe una diferencia significativa entre los índices de preferencia del grupo VEH/ACEA-0,01/E15 medidos durante el TR y el TE, ##### $p<0,0001$; y que también hay diferencia entre dicho grupo y el que recibió el pretratamiento con AM251 durante el TR,

$p < 0,0001$. Además, se encuentra que los índices de preferencia para el grupo AM251-5/ACEA-0,01/E15 durante el TR y el TE también son diferentes.

Todos los grupos de animales evidenciaron un aumento significativo de la preferencia por el contexto asociado a la droga durante el TC con respecto al TB, es decir que todos los animales adquirieron el CPP y que no existen diferencias significativas entre los grupos (Figura 6B). El ANOVA de dos vías con los test (TB vs. TC) considerados como muestras repetidas reveló el efecto principal de este último factor solamente, $F_{(1, 14)} = 59,23$, $p < 0,0001$. De igual manera, todos los grupos evidenciaron la extinción del CPP (ANOVA de dos vías con TC y TE como muestras repetidas, efecto principal del test, $F_{(1, 14)} = 77,08$, $p < 0,0001$).

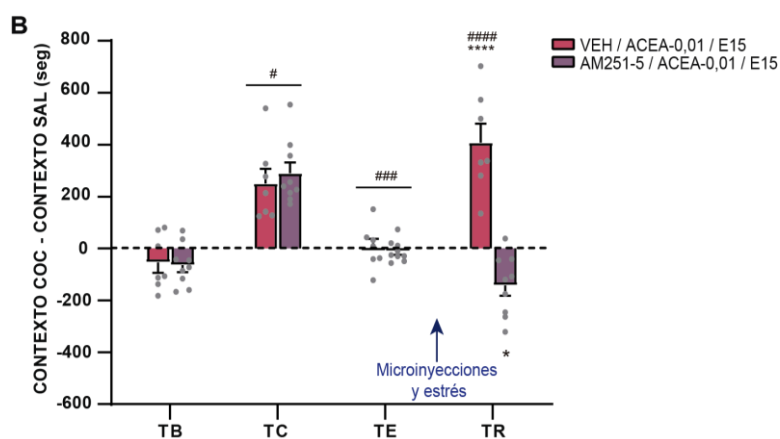


Figura 6. (B) Índice de preferencia calculado para cada uno de los test del protocolo. Contexto COC – Contexto SAL=Diferencia en el tiempo de permanencia entre el contexto asociado a la droga y el contexto asociado a salina. VEH= Solución vehículo, DMSO 10%. Dosis de AM251 microinyectada en NAC Core en el TR: 5 nmol/0,5 μ l/lado (AM251-5). Dosis de ACEA microinyectada en NAc Core en el TR: 0,01 fmol/0,5 μ l/lado (ACEA-0,01). E15=Animales sometidos a una sesión de estrés por inmovilización de 15 min de duración en el TR. Los animales que fueron microinyectados con VEH y luego con ACEA en NAc Core 5 min antes de la exposición a estrés sub-umbral mostraron un aumento significativo en el índice de preferencia durante el TR (#### $p < 0,0001$ comparado con el índice de preferencia para el mismo grupo durante el TE). El pretratamiento con AM251 en NAc Core previno el efecto facilitador de ACEA durante el TR (**** $p < 0,0001$ comparando con el grupo pretratado con VEH durante el TR y * $p < 0,05$ comparado con el TE). Las barras con puntos representan la media \pm S.E.M., $N=7$ para el grupo pretratado con VEH y $N=9$ pretratado con AM251. Durante el TC, se evidencia que todos los grupos adquirieron previamente el CPP de manera uniforme, sin diferencias en el índice de preferencia entre ellos ($\#p < 0,05$ en comparación con el TB). Durante el TE, se evidencia que todos los grupos extinguieron el CPP de manera uniforme (### $p < 0,001$ en comparación con el TC).

Localización de las microinfusiones

En la Figura 6C se representa la ubicación de los sitios de microinfusión de AM251, de ACEA y de la solución vehículo en el NAC Core de los animales que fueron incluidos en los análisis estadísticos de este experimento.

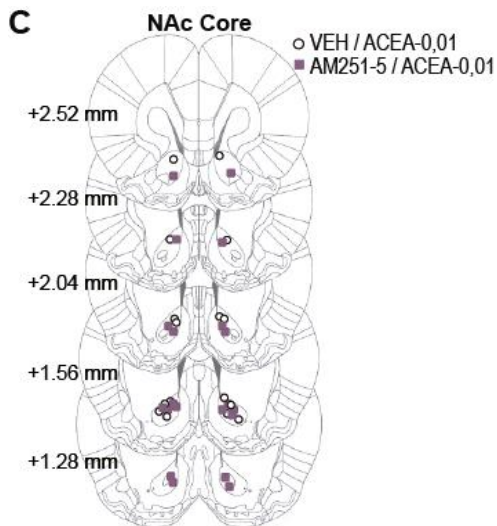


Figura 6. (C) Esquemas de las secciones coronales del cerebro de rata, adaptadas del atlas estereotáxico de Paxinos y Watson (2007), que muestran las ubicaciones bilaterales aproximadas de las microinyecciones en el NAc Core de los animales incluidos en el análisis estadístico (N= 16). Los números a la izquierda indican los milímetros en referencia al punto Bregma. Los símbolos representan las diferentes microinyecciones administradas.

Conclusiones del objetivo específico 1 (Experimentos I-V)

Los resultados descriptos aportan sólida evidencia acerca de la participación de los receptores cannabinoides CB₁ de NAc Core, pero no de NAc Shell, en la reinstalación de la preferencia condicionada a cocaína inducida por estrés por inmovilización. La especificidad del efecto sobre los CB₁Rs está dada por el uso de un antagonista ([Experimento I](#)) y de un agonista de los receptores ([Experimento III](#)), como así también por la co-infusión de ambos ligandos ([Experimento V](#)). El efecto de AM251, como así también de ACEA, depende de la dosis administrada. Ninguno de estos ligandos induce por sí solo un aumento de la preferencia o una aversión por alguno de los compartimentos. AM251 en combinación con el estrés de 30 min parece inducir un efecto similar a la aversión, aunque no se encontró diferencia significativa en los valores de preferencia medidos para este grupo de animales durante el TR en comparación los medidos durante el TE. Cabe destacar que el rol diferencial de los CB₁Rs de NAc Core y Shell no había sido estudiado previamente y puede ser relacionado con los hallazgos previos de nuestro laboratorio acerca del rol de los receptores glutamatérgicos NMDA del NAc Core, pero no Shell, en nuestro modelo de reinstalación inducida por estrés.

Objetivo 2: Cambios en los niveles de glutamato extracelular de NAc Core en relación a la conducta de preferencia condicionada por el contexto asociado a cocaína, evaluada bajo nuestro protocolo de reinstalación inducida por estrés

Este objetivo se llevó a cabo mediante el empleo de la [técnica de microdialisis *in vivo*](#), la cual nos permitió realizar un monitoreo de los niveles de glutamato en NAc Core mediante la recolección directa de muestras de fluido extracelular en animales en libre movimiento, antes y durante la exposición a los compartimentos principales del aparato de CPP. En los siguientes experimentos la recolección de muestras se realizó dos días después de cada uno de los test del CPP, con el fin de evaluar y comparar la influencia de las distintas etapas de nuestro modelo de reinstalación sobre los cambios en los niveles de glutamato extracelular de NAc Core, detectados durante la re-exposición al contexto más preferido (asociado con la conducta de preferencia condicionada a la droga) o al menos preferido (para corroborar la dependencia al contexto).

Las concentraciones absolutas de glutamato (pmol/muestra), determinadas mediante HPLC y detección electroquímica, fueron transformadas a valores porcentuales y representan el porcentaje de cambio con respecto a la línea de base determinada para cada animal (% línea de base). Esta línea de base representa el 100% y se calculó mediante el promedio de las últimas cuatro muestras recolectadas mientras los animales permanecían en sus caja-hogar, es decir las últimas cuatro muestras recolectadas justo antes de transferir a los animales al aparato de CPP o de recibir algún tratamiento.

Experimento VI. La re-exposición al contexto más preferido, sin previo condicionamiento, no indujo un aumento en los niveles de glutamato extracelular en NAc Core

Diseño Experimental

Para este experimento, se trabajó con un grupo de animales que pasaron solamente por el TB del protocolo de CPP-(ver línea del tiempo en [Figura 7A](#)). De esta manera, fue posible evaluar los cambios en los niveles de glutamato de NAc Core en respuesta a la re-exposición al contexto más preferido durante el TB, sin influencia del

proceso de aprendizaje asociativo. Para ello, el día posterior al TB los animales fueron sometidos a una cirugía estereotáxica para la implantación de las *probes* de microdiálisis en NAc Core. Al día siguiente, se procedió a la recolección de muestras de fluido extracelular tal como se detalla en la [Figura 7A](#).

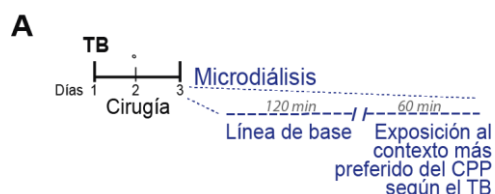


Figura 7. (A) Protocolo experimental. TB= Test Basal. El procedimiento de microdiálisis se llevó a cabo el día posterior a la cirugía de implantación de la *probe* en NAc Core. La recolección de muestras se realizó primero en la caja-hogar durante 120 min, para establecer una línea de base, y luego se transfirió al animal al contexto más preferido, según lo registrado en el TB, para continuar con la recolección de muestras durante 60 min. Las muestras se tomaron cada 15 min, con la solución Ringer circulando a un flujo de 1,5 $\mu\text{l}/\text{min}$.

Resultados

En animales que no fueron sometidos al procedimiento de condicionamiento, y que no mostraron una preferencia incondicionada significativa por alguno de los compartimentos del aparato de CPP, no se observan cambios significativos en los niveles de glutamato extracelular de NAc Core ([Figura 7B](#)) en respuesta a la re-exposición al contexto más preferido durante el TB previo.

Si bien el análisis estadístico de los resultados conductuales del TB indica que no hay una preferencia significativa por algún compartimento del aparato de CPP [tiempo de permanencia en el contexto menos preferido $348,42 \pm 38$, tiempo de permanencia en el contexto más preferido $503,57 \pm 37$; Prueba *t* de Student, contexto menos preferido vs. contexto más preferido: $t_6=2,08$, $p=0,083$], a cada animal se le asignó un “contexto más preferido” según la tendencia registrada. Para este experimento se eligieron animales que presenten esta tendencia un poco más marcada que el resto (en comparación con animales de otros experimentos), con el objetivo de evaluar si esta tendencia en la preferencia incondicionada estaba acompañada de un aumento en los niveles de glutamato en NAc Core al re-exponer a los animales al contexto más preferido.

En la [Figura 7B](#) se muestra la media de los valores porcentuales de glutamato de las últimas tres muestras recolectadas en la caja-hogar y las cuatro muestras

recolectadas durante la re-exposición al contexto más preferido. El análisis estadístico de los microdializados se realizó mediante un ANOVA de una sola vía. Teniendo en cuenta que la microdiálisis permite el estudio temporal de los cambios en los niveles de glutamato, el factor considerado como muestras repetidas es el “tiempo” el cual está representado por el avance en la toma de microdializados a lo largo del experimento (cada 15 min). Para esta figura, el ANOVA nos indica que no hay efecto del tiempo, $F_{(6,36)}=0,61$, $p=0,716$, es decir que no hay cambios significativos en los niveles de glutamato extracelular de NAc Core en ninguna de las muestras analizadas.

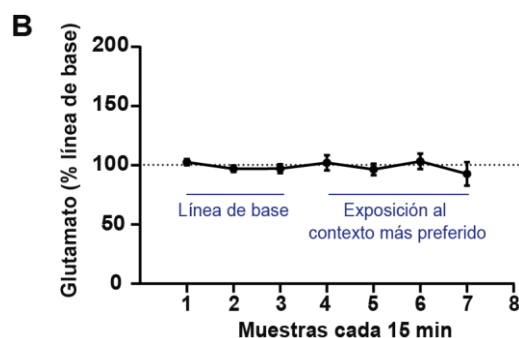


Figura 7. (B) Porcentaje de glutamato extracelular en NAc Core, con respecto a la línea de base (% línea de base), determinado para cada una de las muestras recolectadas a lo largo del tiempo del experimento. En esta figura se muestran los valores de las tres últimas muestras recolectadas mientras el animal permanecía en su caja-hogar y las cuatro muestras recolectadas durante la re-exposición al contexto “más preferido” (preferencia incondicionada estadísticamente no significativa, según los datos conductuales del test basal previo). Cada punto de la curva representa la media \pm S.E.M. de los porcentajes de glutamato extracelular de cada una de las muestras tomadas cada 15 min. No se observa ningún cambio significativo en los niveles de glutamato extracelular de NAc Core cuando los animales son transferidos al contexto más preferido. N=7.

Experimento VII. La re-exposición al contexto asociado a cocaína, pero no al no asociado, posterior a la etapa de condicionamiento, indujo un aumento en los niveles de glutamato extracelular en NAc Core

Diseño Experimental

En el presente experimento se trabajó con animales que pasaron por el TB y por la etapa de condicionamiento con su respectivo test (TC), tal como fue descrito en el protocolo general de CPP y como se representa en la [Figura 8A](#). Los mismos animales evaluados conductualmente fueron sometidos al experimento de microdiálisis dos días después (un día después de la cirugía de implantación de la *probe*). El día del experimento de microdiálisis *in vivo* se tomaron muestras en la caja-hogar (durante 120 min), con el fin de establecer la línea de base para cada animal, e inmediatamente

después se transfirió a los animales a alguno de los compartimentos del aparato de CPP, dentro de los cuales se continuó con la recolección de muestras de dializado (durante 60 min). Según los resultados previos del TC, los animales fueron designados al azar a uno de los siguientes grupos:

1. Re-exposición al compartimento no asociado a cocaína, es decir al asociado previamente con la inyección de solución salina durante el condicionamiento (Contexto no apareado a COC).
2. Re-exposición al compartimento previamente asociado a cocaína durante el condicionamiento (Contexto apareado a COC).

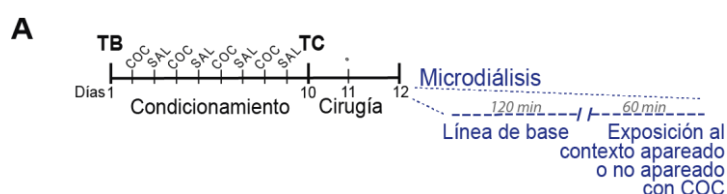


Figura 8. (A) Protocolo experimental. TB= Test Basal. COC= Inyección de cocaína 10mg/kg vía i.p., SAL= Inyección de solución salina vía i.p., TC= Test de Condicionamiento. El procedimiento de microdiálisis se llevó a cabo el día posterior a la cirugía de implantación de la *probe* en NAc Core, tal como se describe en el texto. Las muestras se tomaron cada 15 min, con la solución Ringer circulando a un flujo de 1,5 μ l/min.

Resultados

Los animales incluidos en este experimento de microdiálisis fueron aquellos que durante el TC evidenciaron una preferencia condicionada por el compartimento asociado a cocaína, según el criterio correspondiente a ese test (más del 66% del tiempo total del test dentro del compartimento apareado a la droga). El análisis estadístico de estos resultados conductuales demostró que la diferencia entre los tiempos de permanencia dentro de los compartimentos es diferente. La media \pm S.E.M. del tiempo de permanencia en el compartimento apareado a la droga fue de $554,75 \pm 21$, y dentro del compartimento no apareado a la droga de $314,68 \pm 21$. La prueba *t* de Student, para muestras pareada con distribución de dos colas, indica un efecto del contexto (apareado vs. no apareado), $t_{15}=5,92$, $p<0,0001$.

En la [Figura 8B](#) queda demostrado el aumento significativo en los niveles de glutamato extracelular de NAc Core durante los primeros 15 min de re-exposición al compartimento previamente apareado con cocaína, pero no al contexto no apareado con la droga. El ANOVA de dos vías (tiempo x contexto), con el tiempo como muestras repetidas, indica el efecto principal del tiempo, $F_{(6,90)}=5,33$, $p<0,0001$; del contexto,

$F_{(1,15)}=5,42$, $p<0,05$; y de la interacción entre el tiempo y el contexto $F_{(6,90)}=3,08$, $p<0,05$. El test *post hoc* de Bonferroni indica que los niveles de glutamato determinados para la primera muestra recolectada dentro del contexto apareado a cocaína son diferentes a los de la última muestra recolectada dentro de la caja hogar, $p<0,001$. Además, este primer microdializado del grupo “contexto apareado a COC” también es diferente a la primera muestra recolectada del grupo re-expuesto al contexto no apareado a la droga, $p<0,001$.

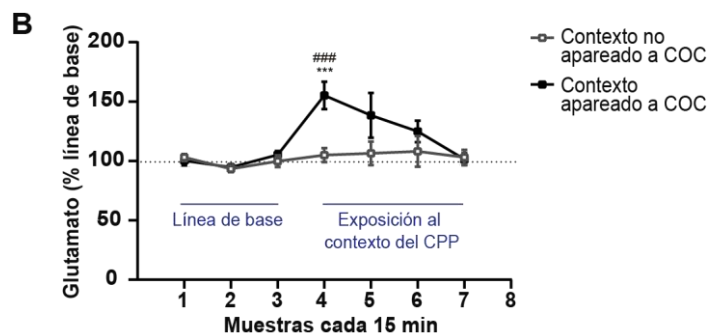


Figura 8. (B) Porcentaje de glutamato extracelular en NAc Core, con respecto a la línea de base (% línea de base), determinado para cada una de las muestras recolectadas a lo largo del tiempo del experimento. Los niveles de glutamato extracelular de NAc Core aumentaron significativamente en la primera muestra recolectada del grupo de animales fue re-expuesto al contexto previamente asociado a cocaína (Contexto apareado a COC), *** $p<0,001$ en comparación con la primera muestra tomada para el grupo re-expuesto al contexto no apareado a cocaína (Contexto no apareado a COC), ### $p<0,001$ en comparación con las muestras tomadas en la caja-hogar para el mismo grupo. Cada punto de la curva representa la media \pm S.E.M. de los porcentajes de glutamato extracelular de cada una de las muestras tomadas cada 15 min. $N=8$ para el grupo “no apareado” y $N=9$ para el grupo “apareado”.

Experimento VIII. La re-exposición al contexto asociado a cocaína, posterior a la etapa de extinción, no indujo un aumento en los niveles de glutamato extracelular en NAc Core

Diseño Experimental

Un grupo de animales que adquirió y luego extinguió el CPP asociado a cocaína, tal como fue descrito en el protocolo general de CPP y como se esquematiza en la [Figura 9A](#), fue usado para evaluar los cambios en el glutamato extracelular de NAc Core ante la re-exposición al contexto del CPP previamente asociado la droga. De la misma manera que para los experimentos VI y VII, durante la microdialisis *in vivo* se tomaron muestras primero mientras los animales permanecieron en su caja-hogar (durante 120 min, para establecer la línea de base) e inmediatamente después fueron transferidos al

compartimento del aparato de CPP apareado con cocaína, dentro del cual se continuó con la recolección de muestras de dializado (durante 60 min).

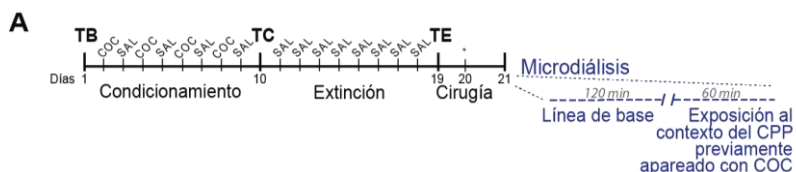


Figura 9. (A) Protocolo experimental. TB= Test Basal. COC= Inyección de cocaína 10mg/kg vía i.p., SAL= Inyección de solución salina vía i.p., TC= Test de Condicionamiento. TE=Test de extinción. El procedimiento de microdialísis se llevó a cabo el día posterior a la cirugía de implantación de la *probe* en NAc Core, tal como se describe en el texto Las muestras se tomaron cada 15 min, con la solución Ringer circulando a un flujo de 1,5 μ l/min.

Resultados

Después de cumplir con el criterio de extinción (según los datos de preferencia obtenidos en el TE), los animales sometidos al presente experimento de microdialísis *in vivo* no mostraron un aumento significativo del glutamato extracelular de NAc Core durante la re-exposición al contexto previamente apareado a cocaína ([Figura 9B](#)). Este último resultado está respaldado por el análisis estadístico mediante un ANOVA de una vía, el cual muestra que no hay efecto significativo del tiempo $F_{(6,42)}=1,14$, $p=0,353$. La extinción previa del CPP (datos no mostrados) está respaldada por una prueba *t* de Student pareada que indica que no hubo diferencias entre los tiempos de permanencia en ambos compartimentos del CPP durante el TE, $t_6=0,021$, $p=0,984$.



Figura 9. (B) Porcentaje de glutamato extracelular en NAc Core, con respecto a la línea de base (% línea de base), determinado para cada una de las muestras recolectadas a lo largo del tiempo del experimento. En esta figura se muestran los valores de las tres últimas muestras recolectadas mientras el animal permanecía en su caja-hogar y las cuatro muestras recolectadas durante la re-exposición al contexto más preferido. Cada punto de la curva representa la media \pm S.E.M. de los porcentajes de glutamato extracelular de cada una de las muestras tomadas cada 15 min. No se observa ningún cambio significativo en los niveles de glutamato extracelular de NAc Core cuando los animales son transferidos al contexto previamente asociado a cocaína. N=8.

Análisis integrado de los experimentos VI, VII y VIII

En la [Tabla 1](#) se compararon los resultados principales de los experimentos VI, VII y VIII. Específicamente, se calculó el área bajo la curva (AUC) de los valores porcentuales de glutamato extracelular determinados para las cuatro muestras recolectadas durante la re-exposición al aparato de CPP (mostrados en las Figuras [7B](#), [8B](#) y [9B](#)). Se compararon los promedios de las AUCs determinadas para cada uno de los animales evaluados antes de la etapa de condicionamiento ([Experimento VI](#)), después del condicionamiento ([Experimento VII](#)) y después de la etapa de extinción ([Experimento VIII](#)). Para este análisis fueron incluidos los datos de la re-exposición al contexto más preferido, en el caso de los animales no condicionados, o al contexto asociado a cocaína, en el caso de animales que pasaron previamente por la etapa de condicionamiento. El análisis estadístico indica que los valores de las AUCs de glutamato extracelular en NAc Core, obtenidos al finalizar la etapa de condicionamiento, son significativamente mayores a los valores obtenidos en animales evaluados en las otras etapas del protocolo de CPP. El ANOVA de una vía muestra el efecto principal de las etapas, $F_{(2, 21)} = 8,098$, $p < 0,01$, y el test *post hoc* la diferencia entre el grupo evaluado después del condicionamiento y los grupos evaluados antes del condicionamiento ($p < 0,05$) y después de la extinción ($p < 0,01$).

<i>Etapa del protocolo de CPP</i>	<i>Glutamato (AUC) durante re-exposición al contexto</i>	
<i>Antes del condicionamiento, contexto más preferido</i>	2,87 ± 15,8	
<i>Después del condicionamiento, contexto apareado con cocaína</i>	91,36 ± 25,9	* **
<i>Después de la extinción, contexto apareado con cocaína</i>	10,66 ± 14,8	

Tabla 1. Área bajo la curva (AUC) de los niveles de glutamato extracelular en NAc Core. Los valores presentados fueron calculados a partir de los datos obtenidos en los experimentos de microdiálisis llevados a cabo antes y después del condicionamiento (Figuras 8B y 9B respectivamente) y después de la extinción del CPP (Figura 10B). El AUC fue calculado para cada animal considerando los valores porcentuales de glutamato obtenidos para las cuatro muestras recolectadas durante la re-exposición al contexto del CPP “más preferido” o al “apareado con cocaína”, según corresponda. Los valores de AUC se expresan como la media ± S.E.M. El AUC de niveles de glutamato extracelular determinado para el grupo de animales re-expuesto al contexto apareado a la droga después de la etapa de condicionamiento resulta significativamente mayor que el AUC de niveles de glutamato determinado antes del condicionamiento (* $p < 0,05$) y después de la extinción (** $p < 0,01$).

Localización de las probes de microdiálisis en los experimentos VI, VII y VIII

En la [Figura 10](#) se representa la ubicación del área activa de intercambio de las membranas de diálisis de las *probes* implantadas en el NAc Core de cada animal que participó de los experimentos VI, VII y VIII. Los esquemas de estos tres experimentos se presentan juntos en esta figura debido a que la distribución de las localizaciones de las membranas fue uniforme.

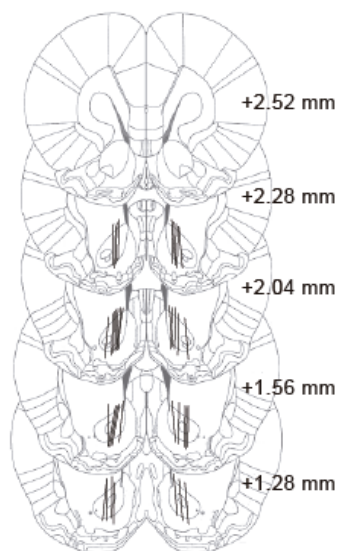


Figura 10. Esquemas de las secciones coronales del cerebro de rata correspondientes a los experimentos VI, VII y VIII, adaptadas del atlas estereotáxico de Paxinos y Watson (2007), que muestran las ubicaciones unilaterales (izquierda ó derecha) aproximadas de las membranas de microdiálisis (líneas verticales) en el NAc Core de los animales incluidos en los experimentos descritos (N= 32). Los números a la derecha indican los milímetros en referencia al punto Bregma.

Conclusiones parciales del objetivo específico 2 (Experimentos VI, VII y VIII)

Estos estudios realizados bajo las mismas condiciones experimentales pero con animales bajo distintas condiciones de aprendizaje (diferentes etapas del protocolo de extinción del CPP), demuestran una relación consistente entre el aumento de glutamato extracelular de NAc Core y la adquisición/expresión de la preferencia condicionada por el contexto asociado a cocaína. También demuestran que la “ausencia o falta de aumento” de glutamato extracelular de NAc Core está relacionado con la falta de adquisición o expresión de una respuesta condicionada ([Experimento VI](#)) y con la disminución de la preferencia condicionada luego de ser extinguida ([Experimento VIII](#)). Cabe destacar que el incremento transitorio de glutamato en NAc Core observado luego del condicionamiento es específico para el compartimento apareado con la droga ([Experimento VII](#)). En conjunto, estas observaciones sustentan las hipótesis de que: 1) el aumento de glutamato constituye una respuesta neuroquímica robusta ante la presentación de claves ambientales asociadas a los efectos gratificantes obtenidos con la droga, 2) el incremento de glutamato se relaciona con el incremento del valor

incentivo motivacional asignado a estas claves, y 3) el aumento de glutamato subyace el comportamiento de búsqueda de droga bajo el paradigma de CPP.

Experimento IX. Una sesión de estrés por inmovilización de 30 min, pero no de 15 min, induce un aumento de glutamato extracelular en NAc Core durante la re-exposición al contexto asociado a cocaína, en animales que previamente extinguieron la preferencia condicionada a la droga

Diseño Experimental

El objetivo de este experimento consistió en estudiar si el estrés por inmovilización causaba un incremento de glutamato extracelular en NAc Core en animales que extinguieron previamente la preferencia condicionada a cocaína, y si este aumento era dependiente de la duración de la sesión de estrés. Para este experimento se seleccionó un grupo de animales que atravesaron todas las etapas del protocolo de extinción del CPP y cumplieron con los criterios de todos los test ([Figura 11A](#)). Estos animales fueron sometidos al experimento de microdiálisis dos días después del TE (un día después de la cirugía de implantación de la *probe*). Al igual que los experimentos descritos arriba, el día del experimento de microdiálisis *in vivo* se tomaron muestras primero en la caja-hogar, durante 120 min. Luego de tomar las muestras necesarias para establecer la línea de base, los animales fueron desconectados del sistema de tubos de microdiálisis y divididos en dos grupos. Ambos fueron sometidos a una sesión de estrés por inmovilización, siendo colocados en el corredor central del aparato de CPP e inmovilizados mediante un dispositivo adaptado ([ver sección](#) correspondiente a Materiales y Métodos). Uno de estos grupos fue inmovilizado durante 15 min y el otro durante 30 min con el objetivo de replicar de la mejor manera posible las condiciones experimentales de los experimentos conductuales ([Objetivo específico 1](#)). Inmediatamente después de que finalizara el tiempo de estrés, los animales fueron reconectados al sistema de tubos de microdiálisis y transferidos al compartimento del aparato de CPP previamente asociado a cocaína, dentro del cual se continuó con la recolección de muestras de dializado durante 60 min. De esta manera, los grupos experimentales fueron los siguientes:

1. Estrés por inmovilización durante 15 min y re-exposición al compartimento asociado a cocaína (E15).
2. Estrés por inmovilización durante 30 min y re-exposición al compartimento previamente asociado a cocaína (E30).

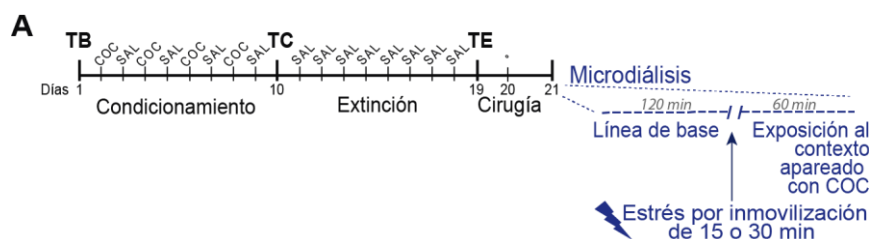


Figura 11. (A) Protocolo experimental. TB= Test Basal. COC= Inyección de cocaína 10 mg/kg vía i.p., SAL= Inyección de solución salina vía i.p., TC= Test de Condicionamiento. TE=Test de extinción. El procedimiento de microdiálisis se llevó a cabo el día posterior a la cirugía de implantación de la *probe* en NAc Core (detalles en el texto). Las muestras se tomaron cada 15 min, con la solución Ringer circulando a un flujo de 1,5 μ l/min.

Resultados

En la [Figura 11B](#) se muestra que la exposición a estrés por inmovilización resulta en un aumento significativo de glutamato extracelular en NAc Core durante la re-exposición al contexto apareado a cocaína, sólo cuando la duración de la sesión de estrés es de 30 min y no de 15 min. En esta figura, la cual muestra el curso temporal de glutamato antes y después de la aplicación del estresor, queda evidenciado que la primera muestra post-estrés recolectada dentro del compartimento asociado a cocaína (muestra 4) contiene niveles altos de glutamato en comparación con la línea de base y con el grupo E15 ($p < 0,0001$ y $p < 0,001$ respectivamente, según el test *post hoc* de Bonferroni). El ANOVA de dos vías (tiempo de recolección de muestras x duración del estrés) con el tiempo considerado como muestras repetidas, reveló el efecto principal del tiempo, $F_{(6, 84)} = 6,092$, $p < 0,0001$; de la duración del estrés, $F_{(1, 14)} = 4,662$, $p < 0,05$; y de la interacción tiempo x duración, $F_{(6, 84)} = 4,874$, $p < 0,001$.

En la [Figura 11C](#) se presentan los valores individuales de glutamato correspondientes a los primeros 15 min de microdiálisis post-estrés (muestra 4), y queda plasmada la diferencia entre los grupos E30 y E15. La prueba *t* de Student pareada con distribución de dos colas revela el efecto de la duración del estrés (E30 x E15), $t_{14} = 4,345$, $p < 0,001$.

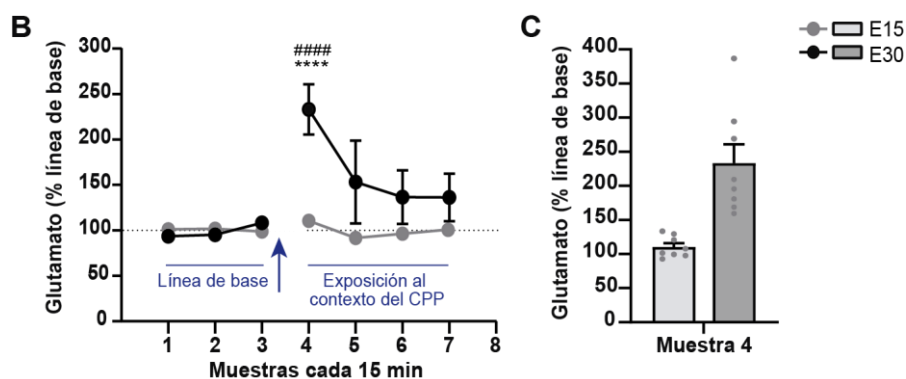


Figura 11. (B) Porcentaje de glutamato extracelular en NAc Core, con respecto a la línea de base (% línea de base), determinado para cada una de las muestras recolectadas a lo largo del tiempo del experimento. Luego de la recolección de muestras en la caja-hogar, un grupo de animales fue inmovilizado dentro del corredor central del aparato de CPP (flecha azul) durante 30 min (E30) y otro grupo durante 15 min (E15). Al finalizar el tiempo de estrés los animales fueron re-expuestos al contexto previamente asociado a cocaína. Se observa un aumento significativo en los niveles de glutamato extracelular de NAc Core en la muestra 4 de los animales del grupo E30, es decir en la primera muestra recolectada dentro del contexto previamente asociado a la droga (**** $p < 0,0001$ en comparación con la muestra 4 del grupo E15; #### $p < 0,0001$ en comparación con todas las muestras de la línea de base). Cada punto de la curva representa la media \pm S.E.M. de los porcentajes de glutamato extracelular de cada una de las muestras tomadas cada 15 min. $N=8$ para ambos grupos. **(C) Valores individuales de los porcentajes de glutamato extracelular en NAc Core, con respecto a la línea de base (% línea de base), determinados para la muestra 4 de cada uno de los grupos experimentales.** Los valores de glutamato de la muestra 4, es decir la primera post-estrés, son mayores en el grupo de animales sometido a la inmovilización de 30 min (** $p < 0,001$ comparando E15). Las barras con puntos representan la media \pm S.E.M.

Localización de las probes de microdiálisis

En la [Figura 11D](#) se representa la ubicación aproximada del área activa de las membranas de diálisis de las *probes* implantadas en el NAc Core de cada animal que participó de este experimento ($N=16$).

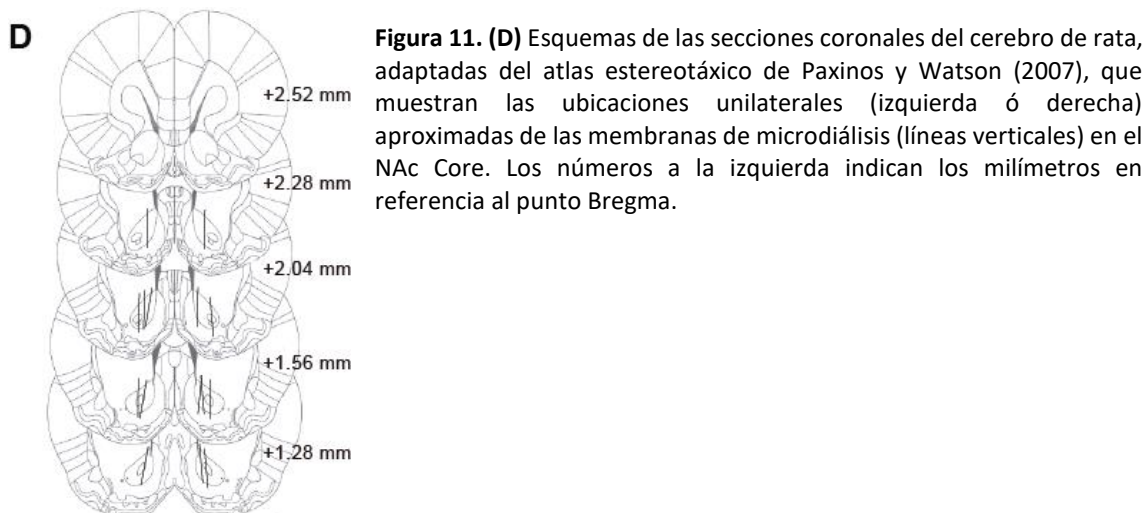


Figura 11. (D) Esquemas de las secciones coronales del cerebro de rata, adaptadas del atlas estereotáxico de Paxinos y Watson (2007), que muestran las ubicaciones unilaterales (izquierda ó derecha) aproximadas de las membranas de microdiálisis (líneas verticales) en el NAc Core. Los números a la izquierda indican los milímetros en referencia al punto Bregma.

Experimento X. El estrés por inmovilización induce un aumento de glutamato extracelular en NAc Core durante la re-exposición al contexto asociado a cocaína, pero no al no asociado, en animales que previamente extinguieron la preferencia condicionada a la droga

Diseño Experimental

El objetivo de este experimento consistió en estudiar si el aumento de glutamato extracelular en NAc Core luego de la sesión de estrés por inmovilización es dependiente del contexto. Al igual que para el experimento anterior, se usaron animales que atravesaron todas las etapas del protocolo de extinción del CPP ([Figura 12A](#)). De la misma manera que para todos los experimentos ya descritos, el día del experimento de microdiálisis *in vivo* primero se tomaron muestras mientras los animales permanecían en su caja-hogar. Luego de tomar las muestras necesarias para establecer la línea de base (durante 120 min), los animales fueron desconectados del sistema de tubos de microdiálisis y sometidos a una sesión de estrés por inmovilización de 30 min tal como se describió en el experimento anterior. Inmediatamente después de que finalizara el tiempo de estrés, los animales fueron divididos en dos grupos según el contexto del aparato del CPP al que fueron re-expuestos para continuar con la recolección de muestras de dializado durante 60 min. De esta manera, los grupos experimentales fueron los siguientes:

1. Estrés por inmovilización durante 30 min y re-exposición al compartimento no asociado a cocaína (Contexto no apareado a COC).
2. Estrés por inmovilización durante 30 min y re-exposición al compartimento previamente asociado a cocaína (Contexto apareado a COC).

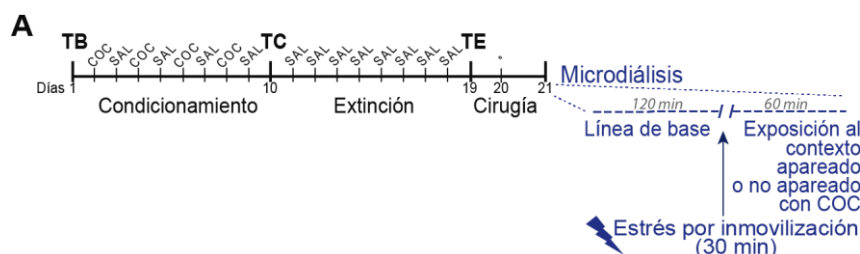


Figura 12. (A) Protocolo experimental. TB= Test Basal. COC= Inyección de cocaína 10mg/kg vía i.p., SAL= Inyección de solución salina vía i.p., TC= Test de Condicionamiento. TE=Test de extinción. El procedimiento de microdiálisis se llevó a cabo tal como está descrito en el texto. Todas las muestras se tomaron cada 15 min, con la solución Ringer circulando por la *probe* y el sistema de tubos a un flujo de 1,5 μ l/min.

Resultados

La re-exposición al contexto asociado a cocaína, pero no al contexto no asociado, después del estrés incrementa los niveles de glutamato extracelular en NAc Core en ratas que previamente extinguieron el CPP. Específicamente, la primera muestra post-estrés colectada dentro del compartimento apareado a la droga (muestra 4 de la [Figura 12B](#)) contiene más del doble de glutamato que las muestras de la línea de base. Contrariamente, las muestras de los animales re-expuestos al contexto no asociado a cocaína no difieren con respecto a su línea de base. El ANOVA de dos vías (tiempo x contexto), con el tiempo como muestras repetidas, indica el efecto principal del tiempo, $F_{(6,72)}= 5,67$, $p<0,0001$; del contexto, $F_{(1,12)}=4,80$, $p<0,05$; y de la interacción entre el tiempo y el contexto $F_{(6,72)}=4,21$, $p<0,01$. El test *post hoc* de Bonferroni indica que, para el grupo “contexto apareado a cocaína” los niveles de glutamato determinados para la muestra 4 son diferentes a los de todas las muestras recolectadas dentro de la caja hogar, $p<0,001$. Además, esta primera muestra también es diferente al primer microdializador recolectado del grupo re-expuesto al contexto no apareado a la droga, $p<0,001$. Esta última observación se presenta en detalle (valores individuales) en la [Figura 12C](#). El análisis estadístico aplicado a los datos de esta figura revela el efecto del contexto sobre el glutamato medido post-estrés (prueba *t* de Student apareada con distribución de dos colas, $t_{13}=3,971$, $p<0,01$).

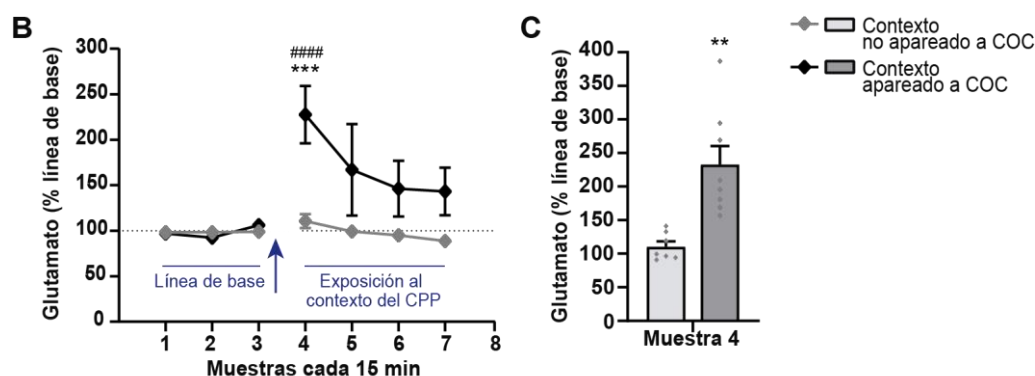


Figura 12. (B) Porcentaje de glutamato extracelular en NAc Core, con respecto a la línea de base (% línea de base), determinado para cada una de las muestras recolectadas a lo largo del tiempo del experimento. Luego de la aplicación del estresor (flecha azul) se observa un aumento significativo en los niveles de glutamato extracelular de NAc Core en la muestra 4 de los animales del grupo re-expuesto al contexto que previamente había sido asociado a cocaína durante el condicionamiento (Contexto apareado a COC, N=8). Dicho aumento no se observa en el grupo re-expuesto al contexto que previamente había sido asociado a solución salina durante el condicionamiento (Contexto no apareado a COC, N=7) (*** $p<0,0001$ en comparación con la muestra 4 del grupo “no apareado”; #### $p<0,0001$ en comparación con todas las muestras de la línea de base del grupo “apareado”). Cada punto de la curva representa la

media \pm S.E.M. de los porcentajes de glutamato extracelular de cada una de las muestras tomadas cada 15 min, tanto en la caja-hogar como en el compartimento del CPP. **(C) Valores individuales de los porcentajes de glutamato extracelular en NAc Core, con respecto a la línea de base (% línea de base), determinados para la muestra 4 de cada uno de los grupos experimentales.** Los valores de glutamato de la muestra 4, es decir la primera post-estrés, son mayores en el grupo de animales re-expuesto al contexto apareado a cocaína (** $p < 0,01$). Las barras con puntos representan la media \pm S.E.M.

Localización de las probes de microdiálisis

En la [Figura 12D](#) se representa la ubicación aproximada del área activa de las membranas de diálisis de las *probes* implantadas en el NAc Core de cada animal que participó de este experimento (N= 15).

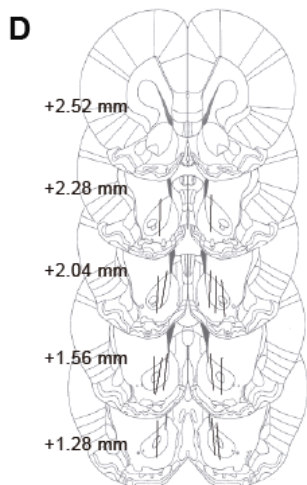


Figura 12. (D) Esquemas de las secciones coronales del cerebro de rata, adaptadas del atlas estereotáxico de Paxinos y Watson (2007), que muestran las ubicaciones unilaterales (izquierda ó derecha) aproximadas de las membranas de microdiálisis (líneas verticales) en el NAc Core. Los números a la izquierda indican los milímetros en referencia al punto Bregma.

Conclusiones parciales del objetivo específico 2 (Experimentos IX y X).

Estos resultados demuestran que el aumento de glutamato extracelular en NAc Core luego de la exposición al estrés por inmovilización emerge en respuesta a la exposición al contexto asociado a cocaína y no meramente por la exposición al estresor o a cualquier otro estímulo de la habitación experimental (claves inespecíficas). Estas observaciones aportan evidencia de que el aumento de la transmisión glutamatérgica en NAc Core está relacionado con el procesamiento de las claves contextuales, el valor motivacional de las mismas y la conducta de búsqueda de droga medida como preferencia bajo el paradigma de CPP. Se sugiere que el estrés, durante la etapa de reinstalación, actúa como disparador del valor motivacional del contexto, induciendo aumento en los niveles de glutamato y en la preferencia por el contexto asociado a la droga, lo cual previamente no fue observado al finalizar la etapa de extinción.

El hecho de que los experimentos neuroquímicos de este objetivo específico hayan sido realizados en la misma habitación experimental y en los mismos compartimentos

del aparato de CPP en donde los animales fueron sometidos a los procedimientos conductuales, incrementa aún más la relevancia del presente trabajo de tesis.

Objetivo 3: Influencia de AM251 y de ACEA sobre los niveles de glutamato extracelular de NAc Core luego de una sesión de estrés por inmovilización y re-exposición al contexto asociado a cocaína, en animales que extinguieron la preferencia condicionada a la droga

Los experimentos correspondientes a este objetivo consistieron en monitorear los niveles de glutamato extracelular en NAc Core luego de la manipulación farmacológica local de los CB₁Rs, en animales bajo condiciones de reinstalación inducida por estrés. Al igual que para el objetivo específico anterior, estos experimentos se llevaron a cabo mediante el empleo de la técnica de microdiálisis *in vivo*. De manera importante, se tuvieron en cuenta los resultados recién descritos que demuestran que la conducta de búsqueda de cocaína, modelada bajo el paradigma de CPP, se correlaciona con cambios en los niveles de glutamato en NAc Core y que estos cambios se dan en respuesta a la presentación de claves contextuales asociadas con la droga y a la exposición aguda al estrés. En base a estas conclusiones se planteó la hipótesis de que AM251 (el antagonista/agonista inverso de los CB₁Rs) es capaz de prevenir la reinstalación de la preferencia condicionada a cocaína ([Experimento I](#)) debido a su capacidad de prevenir el aumento de glutamato extracelular en NAc Core luego del estrés. Adicionalmente, se planteó que la activación de los CB₁Rs de NAc Core mediante la microinyección de ACEA (agonista) es capaz de facilitar la reinstalación ([Experimento III](#)) debido a que este agonista, en combinación con una sesión de estrés sub-umbral y con la re-exposición al contexto apareado con cocaína, resulta en el incremento de glutamato extracelular.

Experimento XI. La administración de AM251 en NAc Core previene el aumento de glutamato extracelular de NAc Core luego de la aplicación de una sesión de estrés por inmovilización de 30 min y durante la re-exposición al contexto asociado a cocaína

Diseño Experimental

Con el objetivo de evaluar la participación de los CB₁Rs localizados en NAc Core en la modulación de los niveles de glutamato extracelular en respuesta al estrés y al

contexto, se usaron animales que previamente adquirieron y luego extinguieron la preferencia condicionada a un compartimento asociado a cocaína (ver línea del tiempo en la [Figura 13A](#)). El día después de haber cumplido con los criterios del TE que confirman la extinción del CPP, los animales fueron sometidos a la cirugía de implantación de la *probe* de microdiálisis y, 18 hs después, al experimento de microdiálisis *in vivo* propiamente dicho. Al igual que los experimentos descriptos más arriba, el procedimiento consistió en recolectar primero las muestras necesarias para establecer la línea de base (durante 120 min), y luego desconectar a los animales del sistema de tubos de microdiálisis para que reciban alguno de los siguientes tratamientos:

1. Microinfusión de vehículo, DMSO 10% + permanencia en su caja-hogar (VEH/NE).
2. Microinfusión de vehículo, DMSO 10% + sesión de estrés por inmovilización de 30 min (VEH/E30).
3. Microinfusión de AM251 en una dosis de 5 nmol /0,5 µl/lado + permanencia en su caja-hogar (AM251-5/NE).
4. Microinfusión de AM251 en una dosis de 5 nmol /0,5 µl/lado + sesión de estrés por inmovilización de 30 min (AM251-5/E30).

Inmediatamente después de que finalizara el tiempo de estrés (o no estrés), todos los animales fueron reconectados al sistema de tubos de microdiálisis y re-expuestos al compartimento del CPP previamente asociado a cocaína (durante el condicionamiento), dentro del cual se continuó con la recolección de muestras de dializado durante 60 min.

Cabe destacar que la microinyección de AM251 en NAc Core se realizó manera unilateral a través de la cánula guía adosada a la [probe dual de microdiálisis](#).

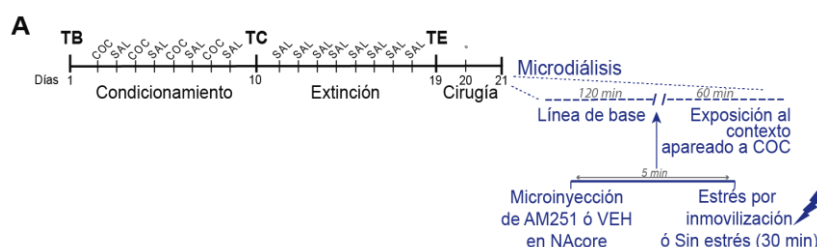


Figura 13. (A) Protocolo experimental. TB= Test Basal. COC= Inyección de cocaína 10mg/kg vía i.p., SAL= Inyección de solución salina vía i.p., TC= Test de Condicionamiento. TE=Test de extinción. Los procedimientos de microdiálisis, microinyección y estrés, como así también los detalles de cada grupo

experimental, se describen en el texto. Las muestras de microdiálisis se tomaron cada 15 min, con la solución Ringer circulando por la *probe* y el sistema de tubos a un flujo de 1.5 $\mu\text{l}/\text{min}$.

Resultados

Como se observa en la [Figura 13B](#), se demostró que AM251 administrado directamente en NAc Core, en una dosis de 5 nmol/0,5 $\mu\text{l}/\text{lado}$ (AM251-5) e inmediatamente antes de la exposición a estrés por inmovilización de 30 min (E30), previno el aumento de glutamato extracelular en NAc Core. Este efecto fue evidenciado por los niveles bajos de glutamato detectados en la primera muestra recolectada mientras los animales exploraban el compartimento asociado a cocaína (muestra 4), en comparación con los datos del grupo de animales que recibió la microinyección de solución vehículo antes de la exposición al estrés (VEH/E30). De la misma manera que se mostró en los Experimentos [IX](#) y [X](#), este último grupo fue el único que evidenció un aumento significativo del glutamato extracelular durante los primeros 15 min de microdiálisis post-estrés (muestra 4), en comparación con sus propios valores de la línea de base. Dicho aumento no fue observado en ninguno de los grupos que permanecieron en sus cajas-hogar, ya sea luego de recibir la microinyección de solución vehículo o de AM251 (VEH/NE y AM251-5/NE).

El análisis estadístico de estas muestras se realizó mediante un ANOVA de tres vías (estrés x tratamiento x tiempo). Teniendo en cuenta que la microdiálisis permite el estudio temporal de los cambios en los niveles de glutamato, el factor considerado como muestras repetidas es el “tiempo” el cual está representado por el avance en la toma de muestras a lo largo del experimento (cada 15 min). El ANOVA aplicado a los datos de la [Figura 13B](#) revela un efecto significativo del estrés ($F_{(1,24)}=5,51$, $p<0,05$), del tiempo ($F_{(6,144)}=8,69$, $p<0,05$), y de las interacciones tiempo x estrés, ($F_{(6,144)}=6,76$, $p<0,05$), tratamiento x estrés ($F_{(1,24)}=5,46$, $p<0,05$), y tratamiento x estrés x tiempo ($F_{(6,144)}=4,68$, $p<0,05$). El test *post hoc* de Bonferroni indica que los valores de glutamato de la muestra 4 del grupo VEH/E30 son significativamente mayores en comparación con todas las muestras de la línea de base ($p<0,0001$) y en comparación con la muestra 4 de los grupos VEH/NE, AM251-5/NE y AM251-5/E30 ($p<0,0001$).

En la [Figura 13C](#) queda también plasmada la diferencia entre los valores porcentuales de glutamato obtenidos en la primera muestra post-tratamientos

(muestra 4) de los cuatro grupos experimentales analizados. El ANOVA de una sola vía y el test *a posteriori* aplicados a estos datos permitieron demostrar que los valores porcentuales de glutamato en la muestra 4 del grupo VEH/E30 son significativamente mayores a los de los grupos VEH/NE, AM251-5/NE y AM251-5/E30 ($F_{(3, 24)} = 11,70$, $p < 0,0001$).

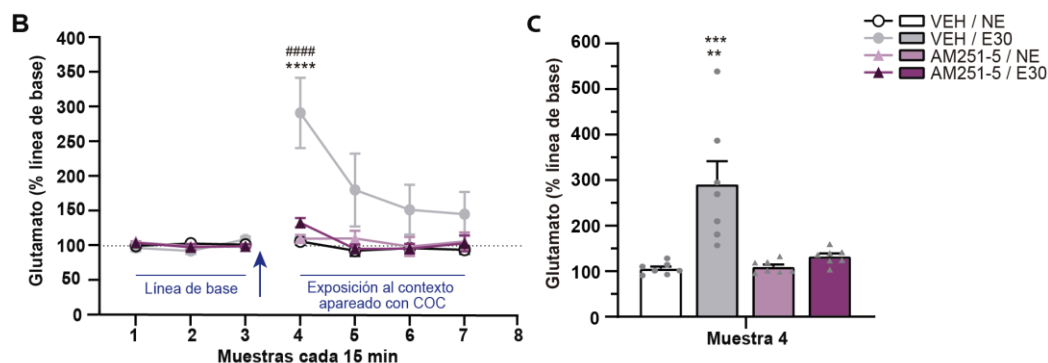


Figura 13. (B) Porcentaje de glutamato extracelular en NAc Core, con respecto a la línea de base (% línea de base), determinado para cada una de las muestras recolectadas a lo largo del tiempo del experimento de microdiálisis. En esta figura se muestran los valores de las tres últimas muestras recolectadas mientras el animal permanecía en su caja-hogar y las cuatro muestras recolectadas durante la re-exposición al contexto previamente asociado con cocaína, posteriormente a los distintos tratamientos aplicados (flecha azul). Cada punto de la curva representa la media \pm S.E.M. de los porcentajes de glutamato extracelular (% con respecto a la línea de base) de cada una de las muestras recolectadas cada 15 min. VEH= Solución vehículo, DMSO 10%. Dosis de AM251 microinyectada en NAc Core: 5 nmol/0,5 μ l/lado (AM251-5). NE=Animales no sometidos a estrés. E30=Animales sometidos a una sesión de estrés por inmovilización de 30 min de duración. Los animales microinyectados con VEH en NAc Core 5 min antes de la exposición a estrés (VEH/E30) muestran un aumento significativo en los niveles de glutamato extracelular de NAc Core en la primera muestra recolectada mientras los animales están en el contexto previamente asociado a la droga (#### $p < 0,0001$ en comparación con las muestras de la línea de base, **** $p < 0,0001$ en comparación con la primera muestra de los grupos restantes). El grupo de animales que recibió la microinyección de AM251 antes del estrés (AM251-5/E30) no evidenció tal aumento. **(C) Valores individuales de los porcentajes de glutamato extracelular en NAc Core, con respecto a la línea de base (% línea de base), determinados para la muestra 4 de cada uno de los grupos experimentales.** ** $p < 0,01$ comparando VEH/E30 con AM251-5/E30, *** $p < 0,001$ comparando VEH/E30 con VEH/NE y AM251-5/NS. Las barras con puntos representan la media \pm S.E.M., $N = 7$ para cada grupo.

Localización de las probes de microdiálisis y de las microinfusiones

En la [Figura 13D](#) se representa la ubicación aproximada de los sitios de microinfusión de AM251 y de VEH, así como también la ubicación de las membranas de diálisis de las *probes* implantadas en cada animal que participó de este experimento.

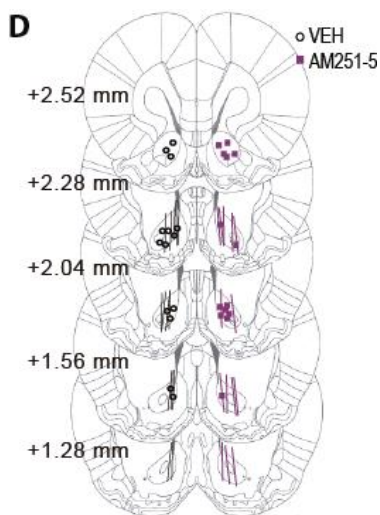


Figura 13. (D) Esquemas de las secciones coronales del cerebro de rata, adaptadas del atlas estereotáxico de Paxinos y Watson (2007), que muestran las ubicaciones unilaterales (izquierda ó derecha) aproximadas de las membranas de microdiálisis (líneas verticales) en el NAc Core y las ubicaciones unilaterales aproximadas de las microinyecciones de en los animales incluidos en en el análisis estadístico (N= 28). Los números a la izquierda indican los milímetros en referencia al punto Bregma. Los símbolos representan las diferentes microinyecciones administradas (AM251-5 o VEH).

Experimento XII. La administración de ACEA en NAc Core antes de una sesión de estrés por inmovilización de 15 min facilita el aumento de glutamato extracelular en NAc Core durante la re-exposición al contexto asociado a cocaína

Diseño Experimental

El objetivo del presente experimento fue evaluar cómo la activación de los CB₁R_s localizados en NAc Core impacta sobre los niveles de glutamato extracelular luego de que los animales sean sometidos a una sesión de estrés que no induce reinstalación (ver [Experimento III](#)) y re-expuestos a claves contextuales asociadas con cocaína. Para ello se usaron animales que previamente adquirieron y luego extinguieron la preferencia condicionada por un compartimento asociado a la droga (ver línea del tiempo en la [Figura 14A](#)). Dos días después del TE, con la cirugía estereotáxica de implantación de la *probe* de microdiálisis en el medio, se realizó el experimento de microdiálisis *in vivo* propiamente dicho. Al igual que los experimentos descritos más arriba, el procedimiento consistió en recolectar primero las muestras necesarias para establecer la línea de base (durante 120 min), y luego desconectar a los animales del sistema de tubos de microdiálisis para que reciban alguno de los siguientes tratamientos:

1. Microinfusión de vehículo, DMSO 0,1% en solución salina + permanencia en su caja-hogar (VEH/NE).
2. Microinfusión de vehículo, DMSO 0,1% en solución salina + sesión de estrés por inmovilización de 15 min (VEH/E15).

3. Microinfusión de ACEA en una dosis de 0,01 fmol /0,5 µl/lado + permanencia en su caja-hogar (ACEA-0,01/NE).

4. Microinfusión de ACEA en una dosis de 0,01 fmol /0,5 µl/lado + sesión de estrés por inmovilización de 15 min (ACEA-0,01/E15).

Inmediatamente después de que finalizara el tiempo de estrés (o no estrés), todos los animales fueron reconectados al sistema de tubos de microdiálisis y re-expuestos al compartimento del CPP previamente asociado a cocaína (durante el condicionamiento), dentro del cual se continuó con la recolección de muestras de dializado durante 60 min.

La microinyección de ACEA en NAc Core se realizó de manera unilateral a través de la cánula guía adosada a la *probe* dual de microdiálisis tal como ya fue descrito en la sección correspondiente de Materiales y Métodos.

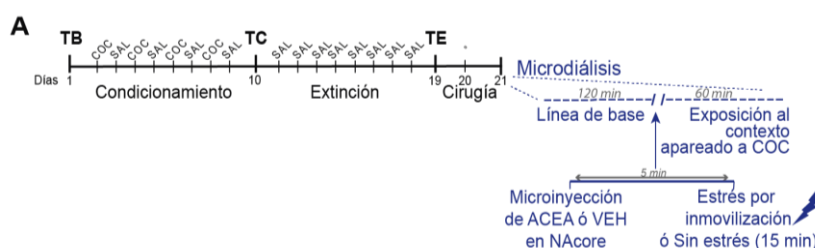


Figura 14. (A) Protocolo experimental. TB= Test Basal. COC= Inyección de cocaína 10mg/kg vía i.p., SAL= Inyección de solución salina vía i.p., TC= Test de Condicionamiento. TE=Test de extinción. Los procedimientos de microdiálisis, microinyección y estrés, como así también los detalles de cada grupo experimental, se describen en el texto. Las muestras de microdiálisis se tomaron cada 15 min, con la solución Ringer circulando por la *probe* y el sistema de tubos a un flujo de 1,5 µl/min.

Resultados

Los resultados de este experimento de microdiálisis *in vivo* ([Figura 14B](#)) muestran un aumento significativo de glutamato extracelular en aquellas muestras de NAc Core de animales que recibieron una microinyección local de ACEA (0,01 fmol/0,5 µl/lado, ACEA-0,01) justo antes de ser sometidos a una sesión de estrés por inmovilización de 15 min (E15). Al igual que el experimento anterior, este aumento de glutamato fue detectado en la primera muestra recolectada post-tratamientos (muestra 4), es decir en el dializado recolectado durante los primeros 15 min de permanencia en el contexto apareado con cocaína. Los valores porcentuales de glutamato en esta muestra fueron significativamente mayores a los obtenidos en las muestras recolectadas en la caja-hogar. En contraste, aquellos grupos de animales microinyectados con solución vehículo

antes del estrés (VEH/E15) o aquellos microinyectados con ACEA o con VEH, pero no sometidos al estrés (ACEA-0,01/NE y VEH/NE), no mostraron tal aumento.

El análisis estadístico de estas muestras se realizó mediante un ANOVA de tres vías (estrés x tratamiento x tiempo), considerando como muestras repetidas al factor “tiempo”, el cual está representado por el avance en la toma de muestras (cada 15 min). El ANOVA aplicado a los datos de la [Figura 14B](#) revela el efecto principal de la interacción tiempo x tratamiento x estrés $F_{(6,132)}=2,23$, $p<0,05$, y de la interacción tiempo x tratamiento $F_{(6,132)}=3,31$, $p<0,05$. El test *post hoc* de Bonferroni indica que los valores de glutamato de la muestra 4 del grupo ACEA-0,01/E15 son significativamente mayores en comparación con todas las muestras de la línea de base ($p<0,0001$) y en comparación con la muestra 4 de los grupos VEH/NE, VEH/E15 y ACEA-0,01/NE ($p<0,001$).

En la [Figura 14C](#) también queda plasmada la diferencia entre los valores porcentuales de glutamato obtenidos en la primera muestra post-tratamientos (muestra 4) de los cuatro grupos experimentales analizados. El ANOVA de una sola vía y el test *a posteriori* aplicados a los datos de esta figura permitieron demostrar que los valores porcentuales de glutamato en la muestra 4 del grupo ACEA-0,01/E15 son significativamente mayores a los de los grupos VEH/NE, VEH/E15 y ACEA-0,01/NE ($F_{(3,22)}=12,08$, $p<0,0001$).

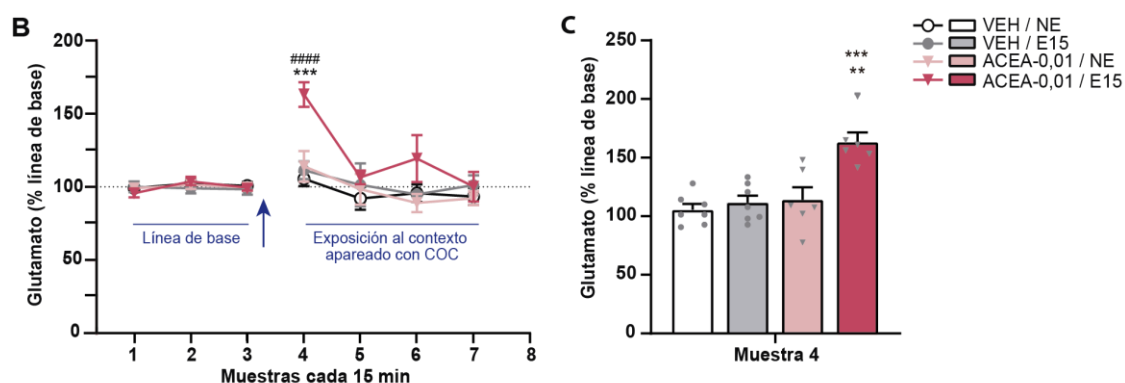


Figura 14. (B) Porcentaje de glutamato extracelular en NAc Core, con respecto a la línea de base (% línea de base), determinado para cada una de las muestras recolectadas a lo largo del tiempo del experimento de microdiálisis. En esta figura se muestran los valores de las tres últimas muestras recolectadas mientras el animal permanecía en su caja-hogar y las cuatro muestras recolectadas durante la re-exposición al contexto previamente asociado con cocaína, posteriormente a los distintos tratamientos aplicados (flecha azul). Cada punto de la curva representa la media \pm S.E.M. de los porcentajes de glutamato extracelular (% con respecto a la línea de base) de cada una de las muestras recolectadas cada 15 min. VEH= Solución vehículo, DMSO 0.1% en solución salina. Dosis de ACEA microinyectada en NAc Core: 0,01 fmol/0,5 μ l/lado (ACEA-0,01). NE=Animales no sometidos a estrés. E15=Animales sometidos a una sesión de estrés por inmovilización de 15 min de duración. Los animales

del grupo ACEA-0,01/E15 mostraron un aumento significativo en los niveles de glutamato extracelular de NAc Core en la primera muestra recolectada mientras los animales están en el contexto previamente asociado a la droga (#### $p < 0,001$ en comparación con las muestras de la línea de base, *** $p < 0,0001$ en comparación con la primera muestra de los grupos restantes). **(C) Valores individuales de los porcentajes de glutamato extracelular en NAc Core, con respecto a la línea de base (% línea de base), determinados para la muestra 4 de cada uno de los grupos experimentales.** ** $p < 0,01$ comparando ACEA-0,01/E15 con ACEA-0,01/NE, *** $p < 0,001$ comparando ACEA-0,01/E15 con VEH/NE y VEH/E15. Las barras con puntos representan la media \pm S.E.M., $N=7$ para los grupos VEH/NE y VEH/E15, y $N=6$ para los grupos ACEA-0,01/E15 y ACEA-0,01/NE.

Localización de las probes de microdiálisis y las microinfusiones

En la [Figura 14D](#) se representa la ubicación aproximada de los sitios de microinfusión de ACEA y de VEH, así como también la ubicación de las membranas de diálisis de las *probes* implantadas en cada animal que participó de este experimento.

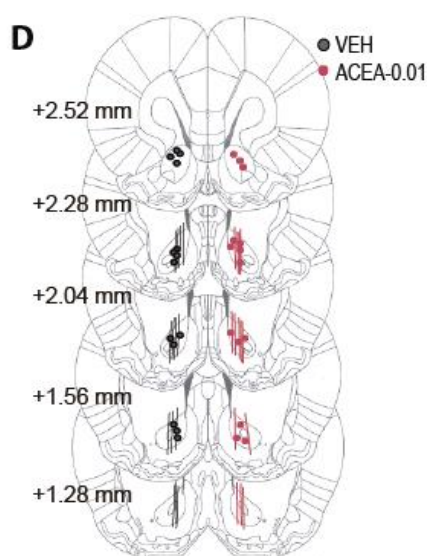


Figura 14. (D) Esquemas de las secciones coronales del cerebro de rata, adaptadas del atlas estereotáxico de Paxinos y Watson (2007), que muestran las ubicaciones unilaterales (izquierda ó derecha) aproximadas de las membranas de microdiálisis (líneas verticales) en el NAc Core y las ubicaciones unilaterales aproximadas de las microinyecciones de los animales incluidos en el análisis estadístico ($N= 26$). Los números a la izquierda indican los milímetros en referencia al punto Bregma. Los símbolos representan las diferentes microinyecciones administradas (ACEA-0,01 o VEH).

Conclusiones del objetivo específico 3 (Experimentos XI y XII)

En conjunto, estos dos últimos experimentos aportan evidencias acerca del mecanismo glutamatérgico que subyace a la participación de los CB₁Rs en la respuesta al estrés y a las claves contextuales previamente asociadas a la droga, en animales que extinguieron el CPP. Por un lado, AM251 microinyectado en NAc Core, en la dosis más alta usada para el [Experimento I](#), fue capaz de prevenir el aumento de glutamato extracelular dentro del compartimento apareado a cocaína luego del estrés, lo cual fue observado para el grupo microinyectado con VEH ([Experimento XI](#)). Por otro lado, ACEA microinyectado en NAc Core, en la dosis más alta usada para el [Experimento III](#), fue capaz de inducir el aumento de glutamato extracelular dentro del compartimento

apareado a cocaína al combinarse con un estrés de 15 min que no indujo el aumento de glutamato por sí solo ([Experimento XII](#)).

En consistencia con los resultados del [objetivo anterior](#), e integrando los resultados del [objetivo 1](#), nuestros hallazgos indican que la supresión o el aumento de la liberación de glutamato en NAc Core durante la re-exposición al contexto asociado a la droga subyacen claramente a la ausencia o al desencadenamiento de la búsqueda de droga respectivamente. De manera interesante, en esta tesis se demuestra que la manipulación farmacológica intra-accumbens de los CB₁Rs al modular *in vivo* los niveles de glutamato extracelular influye en la reinstalación inducida por estrés.

También queda demostrado que los estudios de microdiálisis *in vivo* como el nuestro, en combinación con técnicas farmacológicas y comportamentales, resultan de gran utilidad para el estudio de los cambios neuroquímicos asociados a la conducta de búsqueda de droga.

Objetivo 4: Influencia de la activación de los receptores CB₁ sobre los niveles basales de glutamato extracelular de NAc Core, en animales que extinguieron la preferencia condicionada a la droga

Experimento XIII. La perfusión de ACEA en NAc Core mediante microdiálisis reversa reduce de manera dosis-dependiente los niveles basales de glutamato extracelular en NAc Core

Diseño Experimental

Se evaluó el efecto de la activación sostenida y continuada de los CB₁Rs sobre los niveles basales de glutamato de NAc Core mediante un experimento de perfusión local de dosis crecientes del agonista de los CB₁Rs (ACEA) mediante microdiálisis reversa, tal como se describió en la [sección correspondiente de Materiales y Métodos](#). Cabe destacar que el grupo de animales usados para este experimento fueron aquellos que previamente adquirieron y luego extinguieron el CPP asociado a cocaína (ver línea del tiempo en la [Figura 15A](#)). El día posterior a la implantación de la *probe* de microdiálisis (después del TE), los animales fueron conectados al sistema de tubos de microdiálisis y se tomaron muestras durante 120 min para determinar la línea de base, de la misma

manera que para los experimentos anteriores. Luego, sin desconectar el circuito y con los animales siempre adentro de su caja-hogar, el agonista de los CB₁Rs, disuelto en solución Ringer en una concentración de 10 nM, fue perfundido a través de la *probe* durante 60 min. Consecutivamente y de la misma manera, se administraron dos concentraciones adicionales de ACEA (100 y 1000 nM). Por lo tanto, para cada animal mantenido en su caja-hogar se obtuvieron cuatro muestras (cada 15 min) por cada concentración de ACEA. De esta manera, se analizaron las variaciones sucesivas en los niveles basales de glutamato extracelular en respuesta a la activación de los CB₁Rs.

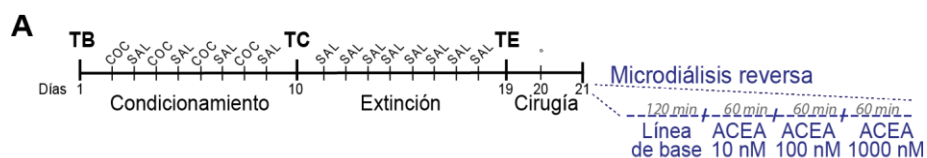


Figura 15. (A) Protocolo experimental. TB= Test Basal. COC= Inyección de cocaína 10mg/kg vía i.p., SAL= Inyección de solución salina vía i.p., TC= Test de Condicionamiento. TE=Test de extinción. El procedimiento de microdiálisis reversa se llevó a cabo tal como se describe en el texto. Durante los primeros 120 min las *probes* fueron solo perfundidas con solución Ringer para establecer una línea de base. Luego se administraron concentraciones crecientes de ACEA [10-100-1000 nM], disueltas en solución Ringer, mediante el sistema de bomba y tubos de microdiálisis. Todas las muestras se tomaron cada 15 min, con las distintas soluciones circulando por la *probe* y el sistema de tubos a un flujo de 1,5 µl/min.

Resultados

Mientras los animales permanecían en su caja-hogar dentro de la habitación experimental, sin ningún tipo de contacto con las operadoras, ni con el aparato de CPP y ningún otro estímulo, la perfusión local de ACEA produjo una disminución significativa en los niveles basales de glutamato extracelular en NAc Core, de manera gradual y en parte dependiente de la concentración. En la [Figura 15B](#) se observa que mientras se perfundía ACEA en concentraciones de 100 y 1000nM los niveles basales de glutamato fueron más bajos que los de la línea de base (sin ACEA). Si bien los niveles de glutamato de las muestras recolectadas durante la perfusión de ACEA en una concentración de 10 nM no son significativamente diferentes a todas las muestras de la línea de base (sólo a las dos primeras), al agrupar y calcular el promedio de las muestras por cada concentración de ACEA ([Figura 15C](#)) puede observarse que todas las concentraciones de ACEA reducen los niveles basales de glutamato extracelular. Si se considera el promedio de las últimas cuatro muestras de la línea de base como el 100%, puede observarse que

la perfusión de 10 nM ACEA reduce los niveles basales de glutamato en un $23,54 \pm 5,55$ %, 100 nM ACEA en un $34,02 \pm 6,8$ %, y 1000 nM ACEA en un $35,97 \pm 7,46$ %.

Los datos de la [Figura 15B](#), que muestra los niveles de glutamato (% con respecto a la línea de base) a lo largo de todas las muestras recolectadas, fueron analizados estadísticamente mediante un ANOVA de una vía en donde los microdializados sucesivos obtenidos (cada 15 min) fueron considerados como el factor de muestras repetidas. Este análisis reporta el efecto significativo de este factor, $F_{(15,90)}=9,11$, $p<0,0001$. El test *post hoc* de Bonferroni revela que 3 de 4 muestras recolectadas durante la perfusión de 100 nM ACEA (muestras 10, 11 y 12) y 3 de 4 muestras recolectadas durante la perfusión de 1000 nM ACEA (muestras 14, 15 y 16) fueron significativamente diferentes a todas las muestras de la línea de base ($p<0,01$).

Los datos de la [Figura 15C](#), representados como gráfico de barras con el promedio de los valores porcentuales de glutamato de las cuatro muestras correspondientes a cada una de las concentraciones de ACEA (0, 10, 100 y 1000 nM), fueron analizados con un ANOVA de una vía que revela que las diferencias entre los promedios son estadísticamente significativas, $F_{(3, 24)}= 7,836$, $p<0,001$. El test *post hoc* indica que todos los promedios de las muestras recolectadas por cada concentración de ACEA perfundida son diferentes al promedio de las muestras de la línea de base (0 nM).

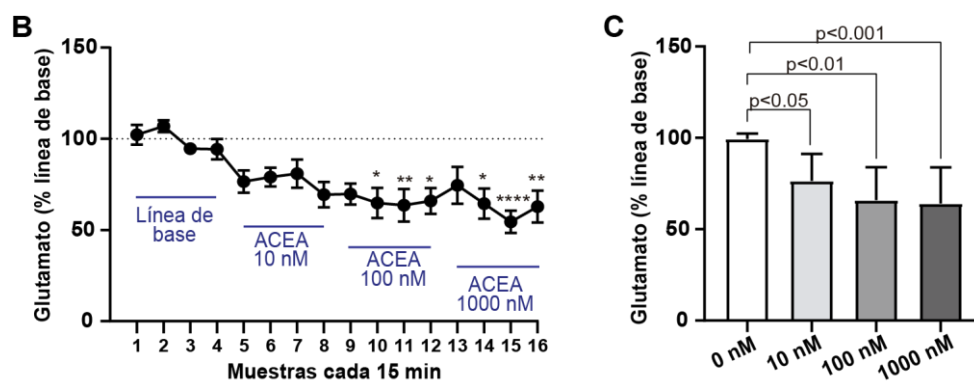


Figura 15. (B) Porcentaje de glutamato extracelular en NAc Core, con respecto a la línea de base (% línea de base), determinado para cada una de las muestras recolectadas a lo largo del tiempo del experimento de microdiálisis. En esta figura se muestran los valores de las últimas cuatro muestras recolectadas mientras los animales eran perfundidos con solución Ringer solamente y las doce muestras recolectadas de manera ininterrumpida mientras se perfundía el agonista de los CB₁Rs ACEA a través de la membrana de diálisis (cuatro muestras por cada concentración de administrada, 10-100-1000 nM). Cada punto de la curva representa la media \pm S.E.M. de los porcentajes de glutamato extracelular (% con respecto a la línea de base) de cada una de las muestras recolectadas cada 15 min. Todas las muestras fueron recolectadas mientras los animales permanecían en su caja-hogar. Las muestras recolectadas mientras se perfundió ACEA en las concentraciones de 100 y 1000 nM muestran niveles de glutamato extracelular significativamente menores a los niveles detectados en todas las muestras de la línea de base

(* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$). $N=7$. **(C) Promedio de los porcentajes de glutamato extracelular en NAc Core determinado para las muestras agrupadas según la concentración de ACEA administrada.** Los datos de porcentaje de glutamato (% con respecto a la línea de base) de las muestras recolectadas fueron agrupados por concentración de ACEA (cuatro muestras por cada concentración, 0-10-100-1000 nM). Las barras representan la media \pm S.E.M. Los promedios de las muestras por cada concentración de ACEA muestran los niveles reducidos de glutamato basal en NAc Core con respecto a las muestras tomadas cuando no circula ACEA (0 nM), es decir las de la línea de base. La significancia se detalla en la figura.

Localización de las probes de microdiálisis y las microinfusiones

En la [Figura 15D](#) se representa la ubicación aproximada de las membranas de diálisis de las *probes* implantadas en cada animal que participó de este experimento.

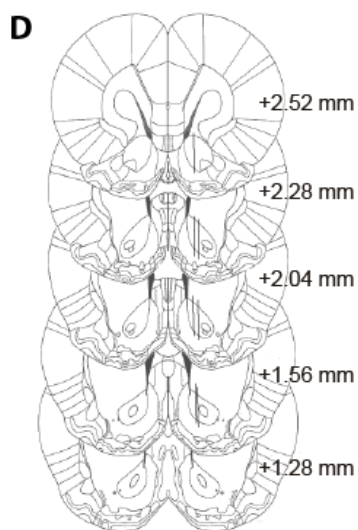


Figura 15. (D) Esquemas de las secciones coronales del cerebro de rata, adaptadas del atlas estereotáxico de Paxinos y Watson (2007), que muestran las ubicaciones unilaterales aproximadas de las membranas de microdiálisis (líneas verticales) en el NAc Core. Los números a la izquierda indican los milímetros en referencia al punto Bregma.

Análisis integrado de los niveles basales de glutamato extracelular de NAc Core a lo largo del protocolo de CPP y en respuesta a la activación de los CB₁Rs.

Si bien el método de [No Net Flux](#) es el más aceptado para determinar la concentración basal de glutamato en unidades absolutas (Chefer y col., 2009), esta última también puede reportarse a partir de los datos de lo que llamamos “línea de base” en esta tesis, correspondiente a los experimentos de microdiálisis “común”. Si tenemos en cuenta la definición de [nivel basal de glutamato extracelular](#) puede considerarse que las muestras recolectadas mientras los animales permanecieron en su caja-hogar sin ningún tipo de contacto con las operadoras, ni con el aparato de CPP y ningún otro estímulo estresante o social, reflejan las concentraciones de “glutamato basal”. De hecho, muchos trabajos se refieren como “glutamato basal” a todas las muestras tomadas antes de la aplicación de algún tratamiento o estímulo en particular (Hotsenpiller y col., 2001; McFarland y col., 2003; Miguens y col., 2008), o incluso

después de un tratamiento farmacológico mientras los animales permanecen en las mismas condiciones (Baker y col., 2003; Baker y col., 2002; Li y col., 2018; Xi y col., 2006).

Teniendo en cuenta que la administración contingente y no contingente de cocaína, así como el proceso de extinción y la retirada de la droga, afecta la homeostasis de glutamato en NAc Core y produce cambios en sus concentraciones basales (Baker y col., 2003; Hotsenpiller y col., 2001; McFarland y col., 2003; Miguens y col., 2008), el objetivo del presente análisis fue evaluar la influencia de las distintas etapas de nuestro protocolo de adquisición, extinción y reinstalación del CPP, en los niveles basales de glutamato extracelular de NAc Core. Para ello se reportaron y se compararon los promedios de las muestras de las líneas de base, en unidades absolutas, de los experimentos de microdiálisis presentados más arriba (Experimentos [VI](#), [VII](#), [VIII](#), [XI](#) y [XII](#)). Adicionalmente, según el porcentaje de reducción de “glutamato basal” determinado en el experimento de perfusión de ACEA (Experimento [XIII](#)) se infirieron los valores de glutamato extracelular que se obtendrían si todos los animales que pasaron por la etapa de extinción recibieran ACEA en una concentración de 100 o 1000 nM mediante microdiálisis reversa.

El método de detección empleado en la presente tesis permite calcular las concentraciones de glutamato extracelular extrapolando, a partir una curva de calibración, los valores analíticos de nuestras muestras con los de concentraciones conocidas de glutamato. De esta manera, los datos pueden expresarse en unidades de concentración, como pmol/15 μ l o pmol/muestra. Como fue mencionado más arriba, para los experimentos anteriores se reportaron los datos de glutamato que fueron transformados a valores porcentuales para un mejor análisis de los resultados considerando la variabilidad entre las líneas de base de distintos animales. Para el presente análisis se consideraron los datos de concentración sin transformación a valores porcentuales.

En la [Tabla 2](#), se presentan las concentraciones basales de glutamato extracelular (pmol/muestra) determinadas para distintos grupos de animales según la etapa del protocolo de CPP en la que fueron analizados. Como puede observarse, luego de la etapa de condicionamiento los niveles basales de glutamato extracelular en NAc Core disminuyeron significativamente con respecto a aquellos obtenidos para el grupo de

animales no expuestos a cocaína ($p < 0,0001$). Si bien la concentración basal de glutamato pareció aumentar luego de la etapa de extinción, con respecto al “post-condicionamiento”, los valores permanecieron bajos con respecto a los obtenidos para el grupo “pre-condicionamiento”. Por otro lado, si el grupo de animales que extinguió el CPP recibiera ACEA a través de microdiálisis reversa (como los animales del Experimento XIII) y se permitiera que se establecieran los niveles basales de glutamato, la concentración final de glutamato sería de $22,75 \pm 0,94$ pmol/muestra o $1,01 \pm 0,04$ μ M. La significancia estadística de las diferencias entre los grupos está determinada por un ANOVA de una vía, $F_{(3, 99)} = 29,44$, $p < 0,0001$.

<i>Etapa del protocolo de CPP</i>	<i>N</i>	<i>Glutamato basal (pmol/muestra)</i>	
<i>Antes del condicionamiento</i>	7	50,56 \pm 4,8	
<i>Después del condicionamiento</i>	14	29,02 \pm 2,5	****
<i>Después de la extinción</i>	41	34,78 \pm 2,4	***
<i>Por perfusión de ACEA (predicción)</i>	41	22,75 \pm 0,9	****

Tabla 2. Niveles basales de glutamato extracelular en NAc Core medidos después de finalizar cada etapa del protocolo de CPP y predichos para la perfusión de ACEA. El valor de concentración basal de glutamato extracelular (pmol/muestra) para cada grupo corresponde al promedio de las últimas 4 muestras recolectadas antes de que los animales recibieran cualquier tipo de tratamiento, es decir las últimas 4 muestras recolectadas para establecer una línea de base en los experimentos anteriormente descritos. Los valores se expresan como la media \pm S.E.M. Los niveles basales de glutamato extracelular en NAc Core disminuyen significativamente después del condicionamiento con cocaína y se mantiene bajos después de la extinción del CPP, con respecto a los valores obtenidos en animales que no pasaron la primera etapa. También se presentan los niveles de glutamato predichos para un experimento hipotético en el cual se administre ACEA, de la misma manera que para el experimento XIII, a animales que hayan extinguido el CPP. *** $p < 0,001$ y **** $p < 0,0001$ con respecto a los valores del grupo evaluado antes del condicionamiento.

Conclusiones del objetivo específico 4 (Experimento XII)

Cabe destacar que los niveles de glutamato analizados para este objetivo específico fueron medidos en condiciones basales, lo cual sugiere que la activación sostenida de los CB₁Rs contribuye a los procesos reguladores de la homeostasis de glutamato en NAc Core.

A diferencia de la administración aguda de ACEA en una concentración conocida (microinyección, [Experimento XII](#)), la perfusión sostenida de ACEA en NAc Core disminuye los niveles de glutamato extracelular. Esta diferencia puede deberse a las

limitaciones de la técnica de microdiálisis en términos analíticos. Ciertos cambios en la liberación de glutamato son tan sutiles y transitorios que resultan difíciles de detectar con el método de microinyección, mientras que la perfusión sostenida permite que se evidencie mejor. Además, debido a que las muestras son recolectadas cada 15 min (tiempo necesario para que se recoja suficiente cantidad de glutamato que pueda ser detectado) algunas variaciones transitorias en los niveles del neurotransmisor pueden “diluirse”. Sin embargo, a pesar de las limitaciones, nuestros hallazgos aportan una consistente evidencia de que los estudios de microdiálisis *in vivo* constituyen una herramienta valiosa para seguir investigando los mecanismos que subyacen a la participación de los CB₁Rs y de glutamato en la reinstalación de la búsqueda de droga inducida por estrés.



DISCUSIÓN

Los resultados del presente estudio demuestran que los CB₁Rs participan en la reinstalación de la preferencia condicionada (CPP) a cocaína inducida por estrés y que este rol se asocia a la función que estos receptores cumplen en la modulación de la liberación de glutamato en NAc Core, lo cual resulta clave para la iniciación del comportamiento de búsqueda de droga. Si bien se conoce que ambas subregiones del NAc, Core y Shell, participan en los procesos de aprendizaje asociativo relacionados con las drogas y el control sobre las conductas apetitivas, nuestro estudio aporta evidencia importante acerca de la participación específica de los CB₁Rs de NAc Core, pero no de NAc Shell, en la inducción de la conducta de búsqueda de cocaína, en respuesta a un estresor así como a las claves contextuales asociadas a dicha conducta.

Específicamente, nuestros principales hallazgos mostraron que el antagonismo/agonismo inverso de los CB₁Rs por AM251 en NAc Core, pero no en NAc Shell, revierte de manera dosis-dependiente la reinstalación del CPP inducida por una sesión de estrés por inmovilización; y que el agonismo de CB₁R por ACEA en la misma subregión facilitó la reinstalación después de una sesión de estrés sub-umbral. Curiosamente, esta acción supresora o facilitadora de AM251 o ACEA, respectivamente, se reflejó en una supresión o una potenciación del aumento de glutamato extracelular en NAc Core, específicamente durante la re-exposición al contexto asociado a cocaína luego del estrés, en animales bajo condiciones de reinstalación. Además, mediante el uso de una variante de la técnica de microdiálisis *in vivo* que permitió administrar ACEA de una manera más sostenida en el tiempo, se demostró que la activación de los CB₁Rs tiene como consecuencia una disminución de los niveles basales de glutamato extracelular, lo cual se propone que podría resultar en una reducción en el tono inhibitorio de receptores metabotrópicos presinápticos mGluR-2/3. De esta manera, la disminución de los niveles basales de glutamato extracelular, como resultado de la activación de los CB₁Rs (demostrado en esta tesis), favorecería el subsecuente aumento de la liberación de glutamato extracelular inducido por estrés y por el contexto asociado a la droga y, en consecuencia, se desencadenaría la búsqueda de droga en el modelo de reinstalación del CPP.

A continuación, se discutirán aspectos conductuales y neuroquímicos contrastando nuestros resultados con la bibliografía más relevante hasta la fecha,

resaltando cuestiones no solo metodológicas sino también conceptuales y mecánicas. Cabe destacar que nuestros hallazgos más importantes derivan del uso combinado de métodos neuroquímicos, neurofarmacológicos y comportamentales, dentro de los cuales se incluyen el monitoreo de glutamato mediante microdiálisis *in vivo*, la administración localizada de ligandos para los CB₁Rs, y la utilización del paradigma de CPP para modelar la conducta de búsqueda de cocaína inducida por estrés. Este tipo de abordaje no sólo resulta de gran importancia para profundizar en el estudio de los mecanismos de neuroplasticidad a corto y largo plazo relacionados con una patología dual (trastorno por consumo de sustancias y trastornos de estrés) sino que también permite la identificación de blancos valiosos para el desarrollo de nuevas estrategias de prevención y tratamiento de la adicción a cocaína.

Antagonismo de los receptores cannabinoides CB₁ y supresión de la reinstalación inducida por estrés

En el presente estudio se demostró que la administración del antagonista/agonista inverso CB₁R, AM251 en NAc Core, pero no Shell, en una dosis de 5 nmol/0,5 µl/lado, suprime la reinstalación de la preferencia condicionada al sitio asociado a cocaína inducida por un estrés por inmovilización de 30 min de duración (Experimentos I y II). En concordancia con nuestro estudio, otras dos investigaciones, que también utilizaron el paradigma de CPP, demostraron que la administración de AM251 bloqueó la reinstalación de la preferencia condicionada inducida por estrés. Más específicamente, un estudio realizado con ratones ha demostrado que la administración sistémica de AM251 bloquea la reinstalación inducida por un estrés de nado forzado en un paradigma de extinción de CPP (Vaughn y col., 2012). Por otra parte, en el trabajo de Tung y col. (2016) se muestra en ratas Wistar que la reinstalación del CPP a cocaína, inducida por una sesión de estrés por inmovilización de 30 min, es prevenida por la administración de AM251 tanto por vía sistémica como intra-ATV. Además, ambos trabajos relacionaron este efecto de AM251 en la reinstalación con la interacción de los CB₁Rs con otros sistemas cerebrales, como el noradrenérgico y el de orexina/hipocretina. Conjuntamente con nuestros resultados, la evidencia indicaría que es necesaria la activación de los CB₁Rs, presentes en circuitos mesolímbicos, para que

ocurra la reinstalación de la preferencia condicionada a cocaína, luego de la exposición a un estresor. Sin embargo, en la bibliografía también se reportan algunos resultados contrastantes cuando el modelo de reinstalación inducida por estrés se evalúa bajo el paradigma de autoadministración (AA). Por un lado, la administración de AM251 por vía intracerebroventricular (i.c.v.) en ratas Long-Evans (Kupferschmidt y col., 2012) y por otro lado, la administración sistémica de otro antagonista/agonista inverso de CB₁R (SR141716A) en ratas Long-Evans y Wistar (De Vries y col., 2001), no lograron revertir la reinstalación de la conducta de AA de cocaína inducida por *footshock*. Los resultados obtenidos por Kupferschmidt y col. (2012) resultan llamativos ya que encontraron que la administración sistémica de AM251 sí logró inhibir la reinstalación a la búsqueda de cocaína inducida por una inyección de CRF, pero no alteró la reinstalación inducida por *footshock* ni por una dosis desafío de cocaína, siendo que ambos efectos están mediados por CRF (Erb y col., 1998; B. Wang y col., 2005). De manera interesante, otro trabajo reportó que si bien la reinstalación de la AA de cocaína inducida por estrés por *footshock* no fue revertida por la administración sistémica de AM251 (en ratas Sprague Dawley que previamente tuvieron acceso extendido a la droga), el mismo tratamiento sí bloqueó la reinstalación inducida por una combinación entre una dosis sub-umbral de cocaína y el estresor (McReynolds y col., 2016), indicando que los CB₁Rs son importantes en la interacción estrés-droga. Las diferencias encontradas entre todos estos trabajos mencionados y nuestros resultados pueden deberse a las distintas variables farmacológicas y conductuales que están en juego. Entre estas podemos mencionar: los distintos modelos conductuales empleados para inducir condicionamiento a cocaína, extinción y luego reinstalación (CPP vs. AA), como así también las especies y cepas de animales bajo estudio (ratones, ratas Wistar, Sprague Dawley o Long-Evans), los antagonistas empleados (SR141716A o AM251), las vías de administración (sistémica o localizada) y los diferentes protocolos de estrés (inmovilización, nado forzado o *footshock*). A continuación, se amplía un poco más la discusión acerca de cómo estas variables farmacológicas y conductuales pueden explicar las discrepancias encontradas en la bibliografía.

Cabe destacar que si bien el rol de los CB₁Rs está mejor establecido para la reinstalación inducida por una dosis desafío de cocaína o por claves asociadas a la misma

(ver reviews: Fattore y col., 2007; Oliere y col., 2013; Wiskerke y col., 2008), este tipo de inconsistencias también han sido reportadas y discutidas en diferentes trabajos. Por ejemplo, bajo el paradigma de CPP (Yu y col., 2011) o de AA (Adamczyk, Miszkiel, y col., 2012; De Vries y col., 2001; Filip y col., 2006; Jing y col., 2014; Xi y col., 2006) se demostró que diferentes antagonistas CB₁R administrados sistémicamente bloquean la reinstalación inducida por una re-exposición a cocaína o a claves asociadas a la misma. Sin embargo, hay estudios que hallaron resultados diferentes, como los experimentos de Kupferschmidt y col. (2012) y de Mc Reynolds y col. (2018; 2016) en los cuales no se observó un efecto de AM251 (i.c.v. o i.p., respectivamente) sobre la reinstalación de AA de cocaína inducida por una inyección de una dosis baja de la misma, o como el estudio de Vaughn y col. (2012), llevado a cabo bajo el paradigma de CPP en ratones, en el cual el antagonista AM251 no fue capaz de evitar la reinstalación de la preferencia inducida por una re-exposición a cocaína. Nuevamente estas divergencias fueron discutidas en base a la variedad de modelos comportamentales empleados, los diferentes antagonistas, las dosis administradas y la distribución regional de los mismos como resultado de las distintas vías de administración (sistémica, intrastriatal o i.c.v.).

La vía de administración de los ligandos para CB₁R es probablemente uno de los factores a considerar de manera especial al momento de comparar resultados de diferentes trabajos. El CB₁R es el receptor acoplado a proteína Gi/o presináptica más ampliamente expresado en el cerebro (Herkenham y col., 1991; Mackie, 2005) y participa en la modulación de múltiples procesos neuronales y conductuales, lo que sugiere que el bloqueo simultáneo de CB₁R en distintas áreas cerebrales podría provocar efectos complejos e incluso antagónicos entre sí. Es preciso recordar también que los receptores cannabinoides están distribuidos en tejidos periféricos (Maccarrone y col., 2015). En conjunto, la administración sistémica de un antagonista implica que se estén ejerciendo acciones simultáneas sobre receptores implicados en diferentes procesos neurobiológicos y fisiológicos, por lo tanto, puede resultar compleja la interpretación de los resultados. De hecho, actualmente se está poniendo especial atención en el rol de los CB₁Rs periféricos (presentes en células del tracto gastrointestinal o en el sistema nervioso autónomo) en diversos comportamientos tales como el consumo de alimento o alcohol (Chorvat y col., 2012; DiPatrizio y col., 2011; Gomez y col., 2002), las respuestas

de miedo o tipo ansiedad (Bellocchio y col., 2013) y los efectos del estrés sobre procesos de memoria (Busquets-Garcia y col., 2016). Por lo tanto, deberían considerarse las acciones periféricas de SR141716A y AM251 cuando son administrados por vía sistémica, aunque se sostenga que AM251 posee una mayor afinidad y selectividad por los CB₁Rs del SNC (Lan y col., 1999). No obstante, vale resaltar que está bien establecida la relación entre los efectos conductuales observados en respuesta a la manipulación farmacológica de los CB₁Rs y su rol en la modulación de los sistemas de neurotransmisión (como glutamato, GABA, dopamina, noradrenalina) de áreas cerebrales claves en el desarrollo y mantenimiento de los comportamientos adictivos (Lopez-Moreno y col., 2008; Schlicker & Kathmann, 2001). Por lo tanto, los antagonistas de CB₁R por vía sistémica claramente afectan de manera directa a estas estructuras para inhibir la búsqueda de droga a través de la modulación de la liberación de neurotransmisores. En este sentido, las herramientas farmacológicas dirigidas directamente a estas áreas pueden resultar muy valiosas para la investigación del rol de los CB₁Rs en el SNC.

En distintos modelos de reinstalación para varios tipos de sustancias de abuso, el empleo de la técnica de microinyección localizada provee evidencia de la importancia de explorar la contribución específica de los CB₁Rs de distintas áreas del circuito mesolímbico en el comportamiento de búsqueda de droga. Por ejemplo, se ha visto que el tratamiento local con SR141716A tanto en BLA, CPf o en NAc reduce la conducta de búsqueda de nicotina (Kodas y col., 2007) y que la administración local de AM251 en NAc (Khaleghzadeh-Ahangar & Haghparast, 2015) o en hipocampo dorsal, pero no en CPf (Zhao y col., 2017), disminuye la reinstalación del CPP asociado a morfina. En la reinstalación de la AA de heroína inducida por claves contextuales, se observó que los CB₁Rs de NAc y CPf, pero no los de BLA, son los que participan (Alvarez-Jaimes y col., 2008). Otros estudios que aplicaron AM251 de forma localizada en ATV o NAc (Tung y col., 2016; Xi y col., 2006) también reportaron el bloqueo de la reinstalación a la búsqueda de cocaína inducida por estrés o droga, respectivamente. A pesar de toda esta evidencia, todavía resulta necesario seguir profundizando en la contribución particular de estas regiones cerebrales en la reinstalación y en cómo los CB₁Rs modulan localmente procesos homeostáticos y sinápticos propios de cada área. Es por todo esto que en

nuestro trabajo exploramos la contribución diferencial de los CB₁Rs de las subregiones que conforman el NAc (Core vs.Shell), tanto en la conducta de búsqueda de droga como en la modulación de la transmisión glutamatérgica local. Este tipo de abordaje permite evaluar los efectos de la manipulación farmacológica de los CB₁Rs en los circuitos específicos que controlan la conducta asociada a aquellos estímulos que impactan en el circuito de la motivación.

Interesantemente en nuestro trabajo, el bloqueo de CB₁R en NAc Core (mediante la microinfusión de AM251 en la dosis más alta) parece suprimir la reinstalación al inducir “aversión” por el contexto del CPP asociado con cocaína, aumentando el tiempo de permanencia en el contexto apareado a solución salina. En primer lugar, cabe destacar que en este caso no es posible afirmar que AM251 produce “aversión condicionada a un lugar” (CPA, por sus siglas en inglés), ya que bajo condiciones de reinstalación no se evalúa el desarrollo del condicionamiento pavloviano para AM251, sino meramente una consecuencia aguda e inmediata del tratamiento. En segundo lugar, al analizar la [Figura 2B](#) puede observarse que el tiempo de permanencia en el contexto apareado a solución salina durante el TR en realidad no es estadísticamente diferente al medido durante el TE para el mismo grupo experimental (AM251-5/E30). Sin embargo, la tendencia hacia el aumento de la preferencia por el compartimento apareado con salina resulta llamativa, sumado a la diferencia significativa con el resto de los grupos experimentales. De esta manera, consideramos que es conveniente reemplazar el término “aversión” por “tendencia a la evitación” del contexto apareado a la droga. En los otros dos trabajos que también reportan que AM251 (vía i.p. o intra-ATV) suprime la reinstalación del CPP, no hay indicios de que los animales eviten de manera significativa el compartimento apareado a cocaína durante el TR (Tung y col., 2016; Vaughn y col., 2012), por lo tanto podría descartarse un efecto “aversivo” de AM251 bajo estas condiciones. Sin embargo, resulta interesante la hipótesis que sugiere que un estado de anhedonia inducido por el estrés en combinación con el bloqueo de CB₁R en NAc podría llevar a los animales a evitar el contexto asociado a cocaína y por lo tanto a prevenir la reinstalación. En este sentido, Rademacher y Hillard (2007) reportan que el antagonismo de CB₁R exacerba la anhedonia inducida por el estrés. Además, los antagonistas/agonistas inversos de CB₁R en dosis altas pueden suprimir la búsqueda de

reforzadores naturales lo cual indica que podrían estar induciendo un estado de falta de motivación general (Adamczyk, Miszkiel, y col., 2012; Chambers y col., 2004; De Vry y col., 2004; J. McLaughlin & See, 2003; McReynolds y col., 2016). Lo interesante es que en la presente tesis se muestra que la administración de AM251 en NAc por sí sola, en ratas que no fueron sometidas a estrés, no indujo evitación ni preferencia por un contexto en particular, al igual que lo observado por Karimi y col. (2013) en ratas naïve, y por Vaughn y col. (2012) en ratones bajo condiciones de reinstalación. Es decir, un tratamiento agudo con antagonistas de CB₁R por sí solo no induce ningún efecto en la expresión de la preferencia/evitación por un contexto del aparato de CPP. De manera un poco contraria a esta afirmación, en dos trabajos independientes se observó que un tratamiento intra-accumbens de varios días con los antagonistas AM251 y SR141716A resultó en CPA y CPP, respectivamente (Karimi y col., 2013; Ramiro-Fuentes y col., 2010). Estas observaciones junto con nuestros resultados pueden indicar dos aspectos adicionales: que los antagonistas de CB₁R pueden tener efectos conductuales específicos y que los CB₁Rs de NAc pueden estar regulando de manera bidireccional la expresión de respuestas condicionadas. Esta dicotomía en el tipo de respuesta observada se relaciona justamente con la capacidad de NAc en modular el comportamiento dirigido, tanto a la búsqueda de estímulos recompensantes como a la evitación de los aversivos, y con que el resultado conductual final parece depender del balance entre la información que llega de áreas límbicas y corticales (Floresco, 2015). Por todo esto sugerimos que los CB₁Rs podrían estar participando en la regulación del flujo de información que llega a NAc y en la selección de subcircuitos motores involucrados en ambos tipos de respuestas (búsqueda/evitación).

Siguiendo la misma línea que el párrafo anterior, uno de los aspectos principales a tener en cuenta es el rol de los CB₁Rs en el procesamiento de memorias asociadas a una droga (De Vries & Schoffelmeer, 2005). En la bibliografía se encuentran varios trabajos que informan que los antagonistas de CB₁R administrados por vía sistémica previenen la adquisición de la AA y del CPP a cocaína en roedores (S. S. Hu y col., 2015; Lopes y col., 2020; Orio y col., 2009; Soria y col., 2005; Xi y col., 2008; Yu y col., 2011), aunque también hay trabajos que reportan lo contrario (Adamczyk, Miszkiel, y col., 2012; Chaperon y col., 1998; Fattore y col., 2007; Filip y col., 2006; Lesscher y col., 2005)

y las discrepancias se discuten considerando los aspectos farmacológicos y metodológicos que hemos desarrollado en esta tesis. En relación a los CB₁Rs localizados específicamente en el NAc y a la atenuación del efecto reforzante/gratificante de la cocaína, Orio y col. (2009) reporta que este último puede ser atenuado por la microinfusión de SR141716A en NAc Shell (y probablemente en NAc Core también, según discuten los autores). Además, Ramiro-Fuentes y col. (2010) mostraron que cuando el antagonista SR141716A es inyectado directamente en NAc (Shell, pero con difusión a Core también) conjuntamente con el tratamiento repetido con cocaína bajo el paradigma de CPP, o cuando los CB₁Rs de NAc son silenciados *in vivo*, lo que se observa es una aversión condicionada al contexto asociado a la droga. En conjunto, todo indica que en el NAc los CB₁Rs son necesarios para regular la adquisición del aprendizaje condicionado a cocaína. Con respecto al proceso de extinción de la AA y del CPP asociado a cocaína, se ha demostrado que los antagonistas CB₁R la facilitan (S. S. Hu y col., 2015; Ward y col., 2009). En este sentido se discute que, en realidad, los antagonistas de CB₁R en condiciones de reinstalación no tendrían un efecto sobre la extinción *per se*, sino que más bien suprimirían el comportamiento de búsqueda de estímulos apetitivos en general y de esta manera resultaría más fácil modificar el aprendizaje original (Ward y col., 2009). Con respecto a la sensibilización conductual inducida por la administración repetida de cocaína, los antagonistas de CB₁R previenen la expresión de la sensibilización comportamental a cocaína de manera dependiente del contexto (Gerdeman y col., 2008). En resumen, teniendo en cuenta que el NAc cumple un rol clave en el comportamiento dirigido y en el procesamiento de memorias asociadas a una droga (Carlezon & Thomas, 2009), nuestros resultados suman evidencia relacionada con que los efectos atribuidos a los cannabinoides exógenos se deben, en parte, a la acción de los CB₁Rs sobre la neurotransmisión de esta área.

En relación al paradigma comportamental usado para modelar la recaída, diversos trabajos plantean que en el establecimiento del CPP y de la AA se evalúan diferentes procesos de aprendizaje (pavloviano clásico vs. instrumental) y diferentes propiedades de las drogas (recompensa vs. reforzamiento), lo cual deriva en que los mecanismos neurobiológicos implicados en las respuestas evaluadas por estos paradigmas sean distintos y disociables (ver revisiones de: Bardo & Bevins, 2000; Everitt y col., 2001;

Weiss, 2005). Otro aspecto que puede ser tenido en cuenta al momento de comparar ambos paradigmas comportamentales es el hecho de que el sistema mesocorticolímbico se activa de forma diferente, según si la administración de la droga está bajo el control operante del animal o si recibe la droga de forma pasiva como sucede en el CPP (Di Ciano y col., 1996; Hemby y col., 1997; Stefanski y col., 1999). Otra hipótesis importante acerca de por qué se observan mecanismos neurofarmacológicos diferentes ante el uso de paradigmas comportamentales distintos tiene que ver con el tipo de “señales ambientales” que son intencionalmente apareadas con la administración una droga y que cumplen un rol crucial en la reinstalación (Crombag & Shaham, 2002; See, 2002; Weiss, 2005). Las señales de tipo “más contextuales” incluyen al conjunto de estímulos olfatorios, auditivos, táctiles o visuales presentados de forma “más continua” y no contingente a una respuesta conductual específica durante la fase de adquisición del aprendizaje (Di Ciano & Everitt, 2003; Fuchs y col., 2005). En un aparato de CPP, las claves contextuales de los compartimentos funcionan además como señales “discriminativas”, ya que el animal puede “discriminar o discernir” entre un compartimento asociado a la droga y otro compartimento que señala la ausencia de la misma. Tanto en estudios clínicos como preclínicos, se ha visto que este tipo de señales “más contextuales” tienen mayor poder predictivo, son más potentes y adquieren mayor relevancia en la recaída, en comparación con señales “más discretas” apareadas específicamente con la ejecución de una respuesta operante (Bouton, 2002; Crombag y col., 2008; Perry y col., 2014). Aunque se sabe que cualquier estímulo externo condicionado tiene la capacidad de reactivar las propiedades incentivo-motivacionales asociadas a la droga, parecería que, según su naturaleza, están codificados, al menos en parte, por diferentes patrones de activación de circuitos neuronales (Bossert y col., 2007; Fuchs y col., 2005; Valyear y col., 2020). Estos hallazgos brindan nuevamente la idea de que dependiendo del paradigma usado o de la naturaleza de las claves empleadas para inducir reinstalación, pueden existir algunas variaciones en los sustratos neurobiológicos. Todos estos aspectos mencionados podrían explicar en parte algunos de los resultados divergentes de la bibliografía en cuanto al rol de los CB₁Rs en el proceso adictivo, aunque es importante considerar que los eventos descritos tienen cierto grado de simultaneidad en los distintos modelos de reinstalación, como así también

cierta superposición en los sustratos neurobiológicos subyacentes. No obstante, a partir del análisis de los trabajos relacionados estrictamente con nuestro objetivo principal, es razonable proponer que los CB₁Rs de NAc regulan de forma específica la expresión del comportamiento dirigido en respuesta a procesos dependientes del contexto. En este sentido, creemos que nuestras observaciones bajo el paradigma de CPP, el cual se enfoca de manera más directa en el componente pavloviano clásico del aprendizaje asociativo y predomina el componente “más contextual” de los estímulos apareados con la droga (Bardo & Bevins, 2000; Tzschentke, 2007), le dan relevancia al entendimiento del rol de CB₁R en NAc Core en los procesos dependientes del contexto (De Vries & Schoffelmeer, 2005; Gerdeman y col., 2008). Finalmente, queremos resaltar la importancia de tener en cuenta las diferencias metodológicas al momento de discutir resultados, sin dejar de considerar que las conclusiones obtenidas a partir de distintos paradigmas, son complementarios y aportan significativamente a la comprensión integral de un fenómeno comportamental complejo, como lo es la búsqueda de droga.

El tipo de estresor al que son sometidos los animales al momento de evaluar la reinstalación es otro aspecto importante a tener en cuenta. Los distintos tipos de estresores más comúnmente usados en la bibliografía ejercen efectos diferentes a nivel comportamental, neurobiológico y molecular. Esta premisa deriva de varios estudios comparativos que reportan, por ejemplo, diferencias en la activación del sistema dopaminérgico (Dunn, 1988), en los niveles de citoquinas (Deak y col., 2005), ARNm para c-fos y CRF (Funk y col., 2006), factor de transcripción CREB (Briand & Blendy, 2013), neurotrofinas (Scaccianoce y col., 2000) y expresión de receptores histaminérgicos (Ghi y col., 1995), además de diferencias comportamentales (Mercier y col., 2003; Warner & Drugan, 2012). Los hallazgos reportados en estos trabajos se dan principalmente tanto a nivel de áreas cerebrales que responden al estrés como así también en áreas involucradas en la reinstalación a la búsqueda de droga. Incluso, a nivel del SEC también se encuentran diferencias en la producción de endocannabinoides, según el área cerebral y el tipo de estresor estudiados (Gorzalka y col., 2008; Patel & Hillard, 2008; Rademacher y col., 2008). Si bien resulta difícil establecer una relación causal directa entre los efectos neurofarmacológicos observados según las variantes del estrés y los efectos a nivel conductual, tener presente estas diferencias permite hacer un análisis

integral de las implicancias o el impacto que pueden ocasionar distintos tratamientos farmacológicos a nivel de las áreas cerebrales afectadas por el estrés.

Agonismo de los receptores cannabinoides CB₁ e inducción de la reinstalación luego del estrés sub-umbral

Nuestros resultados indican que la activación de los CB₁Rs de NAc Core es capaz de facilitar la reinstalación de la preferencia condicionada a cocaína luego de la exposición a una sesión de estrés que no induce reinstalación por sí sola. Específicamente, una sesión de inmovilización de 15 min, que llamamos “sub-umbral”, en combinación con la administración intra-NAc Core, pero no intra-NAc Shell, de la dosis más alta del agonista de los CB₁Rs, ACEA, desencadenó la reinstalación del CPP previamente extinguido (Experimentos [III](#), [IV](#) y [V](#)). Al revisar la bibliografía existente, se destaca que el uso de agonistas CB₁R para evaluar la participación del SEC en la reinstalación se ha restringido a su administración por vía sistémica y, en la mayoría de los casos, sin la presentación adicional de un estímulo disparador de la recaída, como las claves, una dosis desafío o la exposición a estrés. De forma pionera, De Vries y col. (2001) demostraron que el agonista cannabinoide no selectivo, HU210, conduce a una marcada reinstalación de la AA de cocaína luego de un periodo libre de droga de 2 ó 3 semanas. De la misma manera, la reinstalación de la AA de heroína (De Vries y col., 2003; Fattore y col., 2011) o de nicotina (Biala & Budzynska, 2008; Gamaledin y col., 2012) pudo ser inducida mediante la sola administración de agonistas CB₁R tales como HU210 o WIN 55,212-2. Sin embargo, los resultados encontrados en el presente estudio indicaron que la sola administración de ACEA en NAc Core, en cualquiera de las dosis utilizadas, no produjo reinstalación de la preferencia condicionada al sitio previamente asociado a cocaína. De manera similar a nuestras observaciones, se vió que la inyección sistémica de CP-55,940, otro agonista CB₁R, tampoco indujo la reinstalación del CPP a cocaína en ratones (Vaughn y col., 2012). Como ya mencionamos, las diferencias encontradas en este tipo de estudios pueden deberse al uso de distintos agonistas, vías de administración y paradigmas conductuales. Interesantemente, estas inconsistencias también aparecen en el conjunto de estudios que intentan determinar las propiedades gratificantes/aversivas de agonistas CB₁R *per se* (modelos de adquisición de la conducta

de búsqueda de droga). Como se mencionó en la Introducción, en algunos trabajos se observó que la administración i.v. o i.p. de agonistas CB₁R fue capaz de inducir el comportamiento de búsqueda/consumo en roedores y monos ardilla (De Luca y col., 2015; Fattore y col., 2001; Justinova y col., 2003; Martellotta y col., 1998; Tanda y col., 2000), aunque en otros trabajos se reporta lo contrario dependiendo del tipo de agonista usado, de la especie animal o del paradigma conductual (Braida y col., 2001; Chaperon y col., 1998; Cheer y col., 2000; Fattore y col., 2007; Lefever y col., 2014; Lepore y col., 1995; Mallet & Beninger, 1998; Scherma y col., 2008; Valjent & Maldonado, 2000; van Ree y col., 1978). Una explicación posible para los efectos contrapuestos de los agonistas CB₁R es que los mismos podrían ejercer acciones sobre otros tipos de receptores más allá de su acción primaria sobre los CB₁Rs (Pertwee, 2010), como por ejemplo acciones sobre los receptores vanilloides, GABAérgicos o serotoninérgicos, a los cuales se unen con mucha menos afinidad. Además, se ha propuesto que los diferentes agonistas CB₁R tienen acciones específicas a nivel de las vías intracelulares que modulan y proteínas con las que interactúan, lo cual puede derivar en diferentes efectos comportamentales (Bonhaus y col., 1998; Zou & Kumar, 2018).

Con respecto a la acción de ACEA sobre los CB₁Rs, se sabe que este agonista constituye el ligando con más especificidad y afinidad por este subtipo de receptores cannabinoides (An y col., 2020; Hillard y col., 1999) y ha sido empleado en diferentes estudios para demostrar la activación de esos receptores, tanto a nivel del SNC como en sistemas periféricos. En nuestro trabajo, para demostrar esta especificidad se decidió realizar una co-infusión de AM251 con ACEA en NAc Core, y se observó que el pretratamiento con AM251 previene el efecto facilitador de la administración de ACEA en NAc Core sobre la reinstalación de la preferencia condicionada a cocaína inducida luego de la exposición a estrés sub-umbral ([Experimento V](#)). De esta manera, confirmamos que el empleo de ACEA complementa de manera consistente los resultados observados con AM251, y permite demostrar la participación específica de los CB₁Rs en nuestro modelo. De manera interesante, a través de la administración de ACEA ha sido reportado previamente que la activación del SEC tiene además propiedades antidepressivas, anticonvulsivantes, analgésicas y neuroprotectoras (An y

col., 2020; Aso y col., 2012; Luszczki y col., 2017; McDowell y col., 2013). No obstante, no se ha reportado hasta el momento ningún estudio que emplee este agonista específico para demostrar la participación de los CB₁R en la reinstalación de la búsqueda de droga. Lo que sí se ha estudiado es la participación de los CB₁Rs en la excitotoxicidad y neuroinflamación inducida por un estrés sub-crónico (Zoppi y col., 2011). Al respecto, estos autores encontraron que un pre-tratamiento con ACEA previene la disminución del transporte y la recaptación de glutamato inducida luego de la exposición repetida al estrés. En línea con esto, el agonista empleado en este trabajo ha resultado una buena estrategia para estudiar la participación de los CB₁Rs en la homeostasis glutamatérgica y en el impacto del estrés en la recaída.

De manera muy interesante, se ha demostrado previamente que el agonismo de CB₁R puede potenciar el efecto de estímulos que no produjeron reinstalación por sí solos, tales como claves asociadas a una droga (Anggadiredja y col., 2004; Gamaledin y col., 2012) o dosis sub-umbrales de un antagonista alfa-adrenérgico (Vaughn y col., 2012), de MDMA (Daza-Losada y col., 2011) o de metanfetamina (Anggadiredja y col., 2004). En conjunto con nuestros resultados, proponemos que la activación de CB₁R podría estar incrementando la vulnerabilidad para restablecer el comportamiento de búsqueda de cocaína al modificar el impacto de otros estímulos sobre determinadas áreas del cerebro. En nuestro caso, los CB₁Rs ejercen una influencia sobre el impacto del estrés en NAc Core. En este sentido, es importante hacer referencia primero a cómo el estrés podría estar influyendo en la transmisión endocannabinoide en el cerebro. La evidencia indica que diferentes tipos de estrés o eventos que inducen comportamientos “tipo ansiedad” pueden modificar los niveles de endocannabinoides y pueden influir en la señalización de CB₁R en varias regiones del cerebro implicadas en el comportamiento de búsqueda de drogas (ver revisiones de: Gorzalka y col., 2008; Hill & McEwen, 2010; Hillard, 2014; Morena y col., 2016). Específicamente en el NAc, el estrés repetido por inmovilización provocó un aumento en el contenido de 2-araquidonil-glicerol (2-AG) (Patel y col., 2005) y el estrés crónico impredecible produjo una disminución de la actividad de los CB₁Rs (W. Wang y col., 2010). Desafortunadamente, la relación directa entre una exposición aguda a estrés y los cambios en la señalización endocannabinoide en NAc no ha sido establecida hasta la fecha, y menos aún luego de un tratamiento con

cocaína. No obstante, en el trabajo de Patel (2005) se sugiere que en realidad sí podría haber un aumento de 2-AG en NAc, tal como sucede en el hipocampo y la CPf (Hill y col., 2011; R. J. McLaughlin y col., 2012; Rademacher y col., 2008; Roberts y col., 2012), pero que, debido al contenido absoluto muy pequeño de 2-AG en esta área, las variaciones en la concentración son difíciles de detectar mediante las técnicas empleadas (cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas).

Consideramos que resultaría interesante y necesario profundizar en el diseño de experimentos que permitan evaluar los cambios en el SEC que ocurren *in vivo*, luego de la exposición al estrés y en condiciones de reinstalación, para entender mejor la dinámica de los procesos celulares que subyacen a las respuestas conductuales mediada por los CB₁Rs. En conclusión, nuestras observaciones referidas a que el agonismo de CB₁R en NAc Core facilita la reinstalación después de un estrés sub-umbral, en conjunto con los resultados neuroquímicos que se discutirán más adelante, nos brinda un claro indicio de que el estrés impacta en el NAc Core y que la activación de los CB₁Rs contribuye a este proceso.

Participación diferencial de los receptores cannabinoides CB₁ de Núcleo Accumbens Core vs. Shell

Los resultados del presente trabajo de tesis doctoral indican por primera vez que los CB₁Rs específicamente de NAc Core, pero no de NAc Shell, están involucrados en la reinstalación inducida por estrés, en concordancia con hallazgos previos de nuestro laboratorio que demostraron el rol de los receptores glutamatérgicos NMDA y mGluR5 de NAc Core, pero no de Shell, bajo el mismo protocolo experimental de reinstalación inducida por estrés (De Giovanni y col., 2016, ver tesis doctoral de De Giovanni). Esta consistencia nos permitió plantear experimentos para probar la hipótesis de que, en nuestro modelo, el conocido rol de los CB₁Rs como neuromoduladores puede estar ejerciéndose sobre las terminales glutamatérgicas de NAc Core para influenciar la reinstalación. Hasta la fecha, ningún trabajo había explorado la participación diferencial de los CB₁Rs de NAc Core vs. Shell en la reinstalación a la búsqueda de droga. De hecho, en el único trabajo en el cual se evaluó y demostró la participación específica de los CB₁Rs de NAc en este fenómeno no se hizo una distinción entre las subregiones (Xi y col.,

2006), pero lo interesante es que según el examen histológico que presentan los autores se podría decir que sus resultados están más relacionados con efectos sobre el NAc Core.

La evidencia demuestra que el rol que cumple el NAc en la búsqueda de droga es bastante complejo y si bien ambas subregiones que lo componen participan en la reinstalación de la búsqueda de cocaína, las proyecciones glutamatérgicas que llegan exclusivamente a NAc Core constituyen una vía en común crítica para los distintos estímulos que inducen la reinstalación (Mantsch y col., 2014; McFarland y col., 2004; McFarland y col., 2003; See, 2002; Stefanik & Kalivas, 2013; Stefanik y col., 2016). Cabe destacar que el NAc Core y el NAc Shell no están involucrados en la respuesta instrumental *per se*, sino que más bien influyen el comportamiento de búsqueda en base al procesamiento de información motivacionalmente relevante (Corbit & Balleine, 2011; Corbit y col., 2001). Específicamente el NAc Core, planteado como el principal sitio de integración límbica-motora del cerebro, recibe proyecciones glutamatérgicas desde estructuras “límbicas” como el hipocampo, BLA, pero principalmente de CPF dorsomedial, y proyecta hacia otras áreas motoras como el pálido ventral y sustancia nigra principalmente (más detalles en la [Introducción](#)) (Floresco, 2015). De esta manera, el NAc Core es el responsable de integrar información contextual, espacial, asociativa y emocional para luego iniciar la acción motora que subyace a la expresión de los comportamientos aprendidos relacionados con estímulos recompensantes (Scofield y col., 2016). De hecho, bajo los procedimientos conductuales de condicionamiento pavloviano clásico, reforzamiento de segundo orden y reinstalación inducida por claves, se comprobó que la lesión o la inactivación selectiva de NAc Core, pero no de NAc Shell, atenúa la búsqueda de psicoestimulantes (Fuchs y col., 2004; Gipson, Kupchik, y col., 2013; Ito & Hayen, 2011; McFarland y col., 2003; Parkinson y col., 2000). De manera más específica, numerosos estudios confirmaron la importancia de la transmisión glutamatérgica de NAc Core en diversos modelos de búsqueda de cocaína controlada por claves discretas o contextuales (Backstrom & Hyttia, 2007; Di Ciano & Everitt, 2001; McGlinchey y col., 2016; Stefanik y col., 2016; Xie y col., 2012), reinstalación inducida por la droga (Cornish & Kalivas, 2000; McFarland y col., 2003; Stefanik y col., 2016; Stefanik y col., 2013), y reinstalación inducida por estrés (De Giovanni y col., 2016; McFarland y col., 2004). Estudios comparativos que exploraron la contribución

diferencial de los mecanismos moleculares glutamatérgicos en las subregiones de NAc, muestran por ejemplo la importancia del transportador de glutamato GLT-1 (Fischer-Smith y col., 2012; Fischer y col., 2013) y de los receptores NMDA (De Giovanni y col., 2016), mGluR1 (Hammad y col., 2017; Xie y col., 2012) y AMPA (Cornish & Kalivas, 2000; Di Ciano & Everitt, 2001) de NAc Core, pero no Shell, en la reinstalación a la búsqueda de cocaína inducida por diversos estímulos.

El NAc Shell parece cumplir un rol más importante en las primeras etapas del proceso adictivo, como ya fue descrito en la [Introducción](#), puesto que estaría asociado más bien con los efectos estimulantes y el procesamiento del valor incentivo-motivacional de las drogas (Floresco, 2015; Pontieri y col., 1995; Sellings & Clarke, 2003) y su inactivación no altera la reinstalación de la AA de cocaína inducida por una dosis desafío de la misma o por claves discretas asociadas (Fuchs y col., 2004; McFarland & Kalivas, 2001; McFarland y col., 2003). Sin embargo, se ha visto que el NAc Shell sí participa en la reinstalación inducida por estrés (McFarland y col., 2004; Xi y col., 2004) y por claves contextuales (Fuchs y col., 2008), aunque las evidencias indican que en esta subregión predominan los mecanismos asociados a la transmisión dopaminérgica, más que a la glutamatérgica, para inducir la búsqueda de cocaína. Esta conclusión deriva de varios experimentos que demuestran que la manipulación farmacológica de los receptores dopaminérgicos, o la lesión selectiva de terminales dopaminérgicas en esta subregión, inducen un efecto marcado en la reinstalación (S. M. Anderson y col., 2006; Bachtell y col., 2005; Schmidt y col., 2006; Schmidt & Pierce, 2006) y en la adquisición del aprendizaje condicionado a cocaína (Sellings y col., 2006). Finalmente, cabe destacar que el NAc Shell se encuentra más bien “cascada arriba” con respecto a NAc Core, y junto con los núcleos del lecho de la estría terminal (BNST) y la amígdala central conforman lo que se denomina la amígdala central extendida (de Olmos & Heimer, 1999), en donde se procesa información más bien de tipo sensorial y emocional para otorgar un significado al estímulo estresor. De esta manera, se cree que el estrés activa primero a estas regiones y luego, a través del ATV, se activa al subcircuito motor conformado por la CPf, el NAc Core y el pálido ventral para ejecutar la respuesta motora (McFarland y col., 2004).

Los CB₁Rs se expresan en las terminales neuronales tanto de NAc Core como de NAc Shell, siendo levemente mayor la expresión en NAc Shell aunque no se ha encontrado el significado funcional de esta diferencia (Mato y col., 2005; Matyas y col., 2006; Pickel y col., 2004; Pickel y col., 2006; Robbe y col., 2001; Schoffelmeer y col., 2006). Sin embargo, la contribución específica de las subpoblaciones de CB₁Rs en las subregiones del NAc en la reinstalación no había sido investigada hasta el momento. Por un lado, resulta llamativa la superposición de funciones entre los CB₁Rs y el NAc Core específicamente, como por ejemplo sus roles sobre la modulación de los efectos reforzantes secundarios de las drogas y en la reinstalación. Su principal localización a nivel presináptico en las terminales glutamatérgicas de NAc pero no en las dopaminérgicas (Matyas y col., 2006; Pickel y col., 2004; Pickel y col., 2006; Robbe y col., 2001; resultados contrastantes en: Wenger y col., 2003), y el hecho de que el antagonismo de CB₁R afecta la liberación *in vivo* de glutamato pero no de dopamina, en el NAc de animales con una historia previa con cocaína (Li y col., 2018; Xi y col., 2006), y que la activación de los CB₁Rs no inhibe la liberación *in vitro* de dopamina de forma directa en el NAc (Mateo y col., 2017; Sperlagh y col., 2009; Szabo y col., 1999), sustenta la idea de que los receptores cannabinoides podrían estar influyendo en la reinstalación principalmente por su acción sobre las terminales glutamatérgicas de NAc Core.

Interesantemente, un trabajo muy reciente que analiza las conexiones neuronales de NAc Core, de forma celular-específica, muestra cómo las proyecciones glutamatérgicas (provenientes de hipocampo ventral, BLA y CPf dorsomedial) interactúan con determinados tipos de neuronas espinosas medianas que componen el NAc (las MSNs-D₁ y las MSNs-D₂), y cómo los CB₁Rs regulan el grado de inhibición en la neurotransmisión según el tipo de sinapsis (Deroche y col., 2020). Este tipo de enfoque resulta interesante debido a la heterogeneidad de subcircuitos presentes en NAc Core, las propiedades intrínsecas de los mismos y los roles antagónicos pero balanceados que ejercen en la modulación de respuestas relacionadas al aprendizaje condicionado. En este sentido, el SEC se plantea como un sistema muy versátil capaz de modelar la plasticidad sináptica de NAc de forma dependiente al tipo celular (Deroche y col., 2020; Grueter y col., 2010). Sin embargo, aún queda mucho por explorar con respecto a la

correlación entre la especificidad de las conexiones neuronales en el NAc, la expresión de distintos comportamientos y el rol de los CB₁Rs en el balance de esta actividad.

El rol de los receptores cannabinoides CB₁ de Núcleo Accumbens Core en la reinstalación inducida por estrés involucra cambios en los niveles extracelulares de glutamato

Como ya se describió en la [Introducción](#), la reinstalación de la búsqueda de cocaína involucra a varios sistemas de neurotransmisión del circuito mesocorticolímbico, pero los sistemas glutamatérgico y dopaminérgico son los más estudiados. Un hallazgo relevante en esta temática es que el aumento tanto de glutamato como de dopamina en NAc (Core y Shell) resulta necesario para la reincidencia a la búsqueda de cocaína disparada por la droga misma, por presentación de claves asociadas o por exposición a un estresor (Bossert y col., 2013). Resultan interesantes los resultados de estudios recientes que emplean métodos optogenéticos para inhibir vías específicas y que muestran que tanto la proyecciones glutamatérgicas que llegan desde la CPf como desde BLA son importantes en la reinstalación (Stefanik y col., 2016; Stefanik y col., 2013). En base a esta evidencia se ha planteado que el balance final de la transmisión excitatoria en NAc Core no depende específicamente del área de donde provenga el glutamato, sino que más bien depende de la cantidad de glutamato liberado en ese núcleo, lo cual indica que existe un umbral necesario que debe alcanzarse para que se dispare o se inicie el comportamiento dirigido. En este sentido, la hipótesis propone que dicho umbral es alcanzado cuando hay un exceso de liberación presináptica de glutamato de manera tal que se activan los receptores postsinápticos responsables de la potenciación sináptica rápida transitoria en las MSNs (receptores AMPA y NMDA), y adicionalmente se activan aquellos receptores que se encuentran más alejados de la sinapsis (como los mGluR-5 y los NMDA que expresan la subunidad N2B) y que están involucrados en cambios neuroplásticos (Backstrom & Hyttia, 2007; Knackstedt y col., 2014; H. Shen y col., 2011; H. W. Shen y col., 2014). Estos procesos pre-, post- y extra-sinápticos están estrechamente relacionados con la recaída y su probabilidad o grado de ocurrencia depende de aquellos [mecanismos que regulan la homeostasis de glutamato](#) en el compartimento extracelular (Kalivas, 2009). En esta línea, está bien

establecido que el transportador glial de glutamato GLT-1 regula negativamente los niveles basales de glutamato extracelular, y su expresión y actividad se ve reducida luego del consumo de drogas como la heroína, nicotina, cocaína y alcohol. Lo interesante es que esta reducción inducida por las drogas conlleva a un subsecuente “[derrame](#)” de glutamato sináptico en NAc Core que está asociado con la reinstalación a la búsqueda de las mismas (Gipson, Reissner, y col., 2013; Knackstedt y col., 2010; Reissner y col., 2015; Sari y col., 2011; H. W. Shen y col., 2014). Además de reducir al GLT-1, el consumo crónico de cocaína, pero no de otras drogas, reduce la actividad del intercambiador cistina/glutamato (Baker y col., 2003; Kau y col., 2008). También encontramos que distintos tipos de drogas de abuso alteran la funcionalidad del receptor metabotrópico mGluR-2/3 en NAc Core lo cual, debido a su localización presináptica, resulta en un aumento de la probabilidad de liberación de glutamato ante la administración de una dosis de cocaína en la reinstalación (Moran y col., 2005; Moussawi y col., 2011; Peters & Kalivas, 2006; Xi y col., 2002). Todo esto indicaría que la reinstalación depende de que la liberación de glutamato desde las terminales aferentes ocurra en cantidades suficientes como para activar las vías eferentes. Por lo tanto, la homeostasis de glutamato en dicha área constituye un blanco clave para proponer terapias farmacológicas que ayuden a prevenir la recaída (Kalivas y col., 2009).

Los CB₁Rs cumplirían un rol importante en la regulación de la liberación de glutamato necesario para que se desencadene la conducta de búsqueda droga. El presente trabajo de tesis aporta evidencias sólidas a esta hipótesis. En primer lugar, observamos que la microinfusión del antagonista CB₁R AM251 en NAc Core previene el aumento de glutamato extracelular de NAc Core, inducido por estrés durante los primeros 15 min de re-exposición al contexto asociado a cocaína ([Experimento XI](#)). De manera similar, previamente se ha demostrado que el antagonismo de CB₁R, mediante la administración sistémica de AM251, fue capaz de bloquear el aumento de glutamato extracelular en NAc inducido por una dosis desafío de cocaína, pero no así de bloquear el aumento de liberación dopamina en la misma área (Xi y col., 2006). Esto coincide, como ya se mencionó, con la localización de los CB₁Rs en terminales glutamatérgicas pero no dopaminérgicas en NAc (Mato y col., 2005; Matyas y col., 2006; Pickel y col., 2006; Robbe y col., 2001). En conjunto con nuestras observaciones, podemos afirmar

que AM251, administrado tanto por vía i.p. como localmente en NAc, ejerce su efecto inhibitorio sobre la búsqueda de cocaína al modular negativamente la liberación de glutamato, y no de dopamina, en respuesta a un estímulo desencadenante, y que este efecto supresor resulta crucial para que no ocurra la reinstalación. Complementariamente a los resultados observados con el antagonista CB₁R, en la presente tesis se observó que la microinfusión del agonista CB₁R ACEA en NAc Core, en combinación con una sesión de estrés sub-umbral, induce un aumento de glutamato extracelular en el área durante los primeros 15 min de re-exposición al contexto asociado con cocaína ([Experimento XII](#)). En conjunto con las observaciones a nivel comportamental, podemos establecer que el antagonismo o el agonismo de los CB₁Rs, que se asocia al bloqueo o a la potenciación, respectivamente, de la conducta de reinstalación de la preferencia luego del estrés, sucede en simultáneo al bloqueo o a la potenciación, respectivamente, del aumento de la liberación de glutamato en NAc Core durante la re-exposición al contexto asociado con la droga. En resumen, nuestro trabajo aporta, de manera novedosa, evidencia de que la manipulación farmacológica de los CB₁Rs modula *in vivo* los niveles de glutamato contribuyendo al alcance, o no, del umbral necesario para activar la respuesta conductual.

En consistencia con nuestros hallazgos obtenidos con los ligandos para CB₁R sobre la reinstalación de la conducta de búsqueda a cocaína, existen evidencias del impacto de diferentes estímulos disparadores (estresores, claves contextuales y una dosis desafío de la droga) sobre la neurotransmisión glutamatérgica, así como también sobre la liberación de endocannabinoides o la expresión de los CB₁Rs en el NAc. Con respecto al efecto de una dosis desafío de cocaína, ya presentamos evidencias de que es capaz de inducir aumento *in vivo* del glutamato extracelular en el NAc de animales bajo condiciones de reinstalación (McFarland y col., 2003; Xi y col., 2006) y aumento de la potenciación sináptica en preparados *ex vivo* (Gipson, Kupchik, y col., 2013; Stankeviciute y col., 2014). A nivel del SEC, se observó un aumento de los endocannabinoides 2-G, oleoiletanolamida (OEA) y palmitoiletanolamida (PEA), pero disminución de la concentración de anandamida y ningún cambio en la expresión de los CB₁Rs (Bystrowska y col., 2019). Con respecto al efecto de las claves asociadas a cocaína, también se reporta el aumento de glutamato extracelular (Bell y col., 2000; Hotsenpiller

y col., 2001). En relación al efecto de una sesión de estrés, se ha mencionado previamente que puede provocar un aumento de glutamato extracelular en varias áreas del circuito de la motivación (ver [más arriba](#)), pero nuestro trabajo ([Experimento XI](#)) y el de McFarland (2004) serían los únicos en reportar dicho aumento en NAc Core bajo condiciones de reinstalación a la búsqueda de cocaína. A nivel del SEC, no encontramos ningún trabajo que haya monitoreado los niveles de endocannabinoides o expresión de los CB₁R en el NAc de animales que hayan reinstalado la búsqueda de cocaína luego de la exposición a un estresor o a claves, pero sí se han reportado cambios en el SEC luego del estrés en animales naïve (ver detalles [más arriba](#)). En conclusión, la evidencia disponible hasta la fecha es consistente con nuestros resultados del [Experimento XII](#), en donde el agonista ACEA, en combinación con la sesión de estrés sub-umbral, provoca el aumento del glutamato extracelular en NAc durante la re-exposición al contexto apareado a la droga. En la presente tesis sugerimos que la administración de ACEA puede estar recapitulando la liberación de 2-AG en NAc Core en respuesta al estrés, mecanismo a través del cual se activan los CB₁R presinápticos y astrogliales que, mediante mecanismos indirectos y directos, favorecen el aumento de glutamato extracelular en respuesta a estrés y, por lo tanto, la conducta de búsqueda de droga.

El desarrollo de un sistema de monitoreo *in vivo* de los niveles de glutamato extracelular mediante [la técnica de microdialisis](#), no sólo en condiciones de reinstalación sino también en las fases previas del protocolo de CPP, nos permitió determinar varios aspectos importantes en el modelo planteado. En primer lugar, que existe una correlación entre la activación de una memoria apetitiva (ante la presentación del contexto asociado a la droga) y mayores niveles de glutamato extracelular de NAc Core en las muestras recolectadas, ya que esto último sólo ocurre después de confirmar la adquisición de la preferencia condicionada pero no antes del condicionamiento o después de la extinción de ese aprendizaje (Experimentos [VI](#), [VII](#) y [VIII](#)). En segundo lugar, el hecho de que el aumento de glutamato se dé solamente en el contexto motivacionalmente relevante para el animal, nos da una idea de la importancia de la transmisión glutamatérgica de NAc Core en el procesamiento de la información sensorial y contextual asociada a la droga y de la especificidad de la respuesta neuroquímica (Experimentos [VII](#) y [X](#)). En tercer lugar, que los efectos del estrés en la

transmisión glutamatérgica de NAc Core de manera dependiente del contexto ([Experimento X](#)) coinciden con la concepción del estrés como un potenciador de los efectos gratificantes de la droga y el valor incentivo de las claves previamente asociadas a su consumo (Mantsch y col., 2014). Y en cuarto lugar, la adaptación de la técnica (mediante el uso de una *probe* con una cánula guía adosada para microinfusiones) permitió replicar de la mejor manera posible las condiciones en las cuales se llevaron a cabo las pruebas conductuales, logrando que las dosis de los ligandos CB₁R sean microinyectados en el mismo volumen y durante la misma ventana de tiempo (Experimentos [XI](#) y [XII](#)). De esta manera, el diseño de nuestros experimentos permite brindar información valiosa y necesaria acerca de los procesos transitorios que se dan *in vivo* y en presencia del conjunto de variables ambientales que influyen en la conducta de los animales. Además, el diseño de nuestros experimentos permitió arribar a conclusiones más precisas acerca de cómo se correlaciona la liberación de glutamato dependiente del contexto e inducida por estrés y la conducta de reinstalación del CPP. En conclusión, nuestro trabajo permite profundizar en cómo los CB₁Rs median la influencia *in vivo* del estrés sobre la neurotransmisión glutamatérgica en NAc para desencadenar la recaída, de manera dependiente del significado motivacional del contexto al cual se exponen los animales, de la historia previa con la droga, y del curso temporal de los cambios sobre el glutamato extracelular.

La abundante evidencia recabada en estos 30 años de estudio de los receptores cannabinoides desde su identificación sugiere que el mecanismo neurobiológico que subyace al papel de CB₁R en la adicción a las drogas es complejo, de modo que las vías de señalización y las proteínas de interacción utilizadas por estos receptores son mucho más variadas que las establecidas originalmente (Demuth & Molleman, 2006; Noguerras-Ortiz & Yudowski, 2016). Consideramos que este estudio abre nuevas avenidas al análisis de las complejas interacciones de CB₁R con numerosos efectores y proporciona una plataforma neuroquímica-comportamental sólida para monitorear *in vivo* los cambios en la liberación de glutamato en respuesta al estrés y a un contexto específico, bajo un modelo de recaída. La información presentada en esta tesis resulta muy valiosa ya que todos los datos recabados hasta la fecha han sido obtenidos principalmente a partir de modelos *in vitro* o *ex vivo*. A continuación, se discutirá el posible mecanismo que

subyace al rol de los CB₁Rs en nuestro modelo experimental sin dejar de considerar las limitaciones que poseen las distintas técnicas empleadas para explorar mecanismos celulares y moleculares involucrados.

Mecanismos neuroquímicos que subyacen al rol modulador de los receptores cannabinoides CB₁ sobre los niveles de glutamato extracelular

Los principales mecanismos celulares descriptos para explicar el rol modulador de CB₁R en la neurotransmisión excitatoria se basan en la capacidad que tienen estos receptores tanto para modificar la eficacia sináptica como para alterar la homeostasis del glutamato de un área cerebral en particular. En el presente estudio enfatizamos que estos dos procesos pueden involucrar mecanismos moleculares diferentes, los cuales pueden ser directos o indirectos e incluso desarrollarse a distintas escalas temporales y tener influencia el uno sobre el otro. Por un lado, describimos cómo los CB₁Rs podrían tener cierta actividad constitutiva de manera tal que modulan los niveles basales de glutamato, en ratas que se encuentran bajo condiciones de reinstalación y que no reciben ningún estímulo particular en simultáneo que pueda disparar la búsqueda de droga. Por otro lado, describimos los mecanismos moleculares relacionados a una liberación de glutamato más “fásica”, a nivel sináptico y evocada por estímulos que se sabe que disparan la búsqueda de droga (claves, estrés y/o droga). En este sentido, es altamente probable que la manipulación farmacológica de los CB₁Rs de NAc Core altere la homeostasis de glutamato en condiciones basales e impacte en la subsecuente liberación presináptica de glutamato disparada por el estrés durante la reinstalación de la conducta de búsqueda de cocaína.

El mecanismo neurobiológico subyacente que proponemos aquí, para explicar la regulación de los niveles basales de glutamato extracelular por parte de los CB₁Rs, se basa en el mecanismo canónico establecido para estos receptores, y en los procesos de metaplasticidad en respuesta al tratamiento farmacológico con los cannabinoides sintéticos. El mecanismo canónico de CB₁R en NAc, demostrado en preparados *in vitro* o *ex vivo* de cerebro de animales sin ningún tratamiento previo, explica cómo la adición de cannabinoides exógenos resulta en la inhibición de la neurotransmisión mediada por

glutamato, tal como ya se explicó [en la Introducción](#) (Hoffman & Lupica, 2001; Robbe y col., 2001; Robbe y col., 2003). Curiosamente, resultados reportados por el grupo de Manzoni muestran que el mecanismo presináptico inhibitorio inducido por la activación de CB₁R en NAc es independiente del bloqueo de los canales de Ca⁺² sensibles al voltaje y de la cascada de AMPc/PKA, y sugiere que la inhibición de la liberación de glutamato no sólo involucra un efecto sobre la conductancia de la corriente de K⁺, que participa en la liberación evocada, sino también una acción directa sobre la maquinaria responsable de la liberación espontánea del transmisor, independiente de un potencial de acción (Robbe y col., 2001; Robbe y col., 2003). Este último mecanismo indica una posible influencia sobre la liberación basal de glutamato y es pertinente para explicar nuestras observaciones *in vivo* durante la administración local y sostenida del agonista de CB₁R ACEA mediante [microdiálisis reversa](#), en donde fue observada una disminución de los niveles basales de glutamato extracelular de NAc Core, en animales bajo condiciones de reinstalación y que no recibieron ningún otro estímulo en simultáneo ([Experimento XIII](#)). De forma complementaria a nuestros resultados, otro estudio *in vivo* mostró que la administración del antagonista SR141716A mediante microdiálisis reversa aumentó el glutamato extracelular en NAc (Li y col., 2018). En la misma línea, la sola inyección i.p. de AM251 o SR141716A aumentó los niveles de glutamato en NAc (Li y col., 2018; Sano y col., 2008; Xi y col., 2006), y la sola inyección de agonistas de CB₁R (Δ^9 -THC o WIN 55,212-2) produjo la disminución del glutamato en muestras de dializado de NAc (Polissidis y col., 2013; Sano y col., 2008). En conjunto, sugerimos que todos estos resultados de experimentos realizados *in vivo* apoyan la idea de que los CB₁R de NAc ejercen un control tónico inhibitorio de los niveles basales de glutamato extracelular, en animales evaluados en ausencia de cualquier estímulo desencadenante, como la droga o un estresor. Apoyando esta idea, ciertas evidencias *in vitro* y *ex vivo* indican que los CB₁Rs ejercen una acción tónica inhibitoria sobre la liberación de los neurotransmisores, ya que su bloqueo incrementa la transmisión sináptica basal en distintas áreas cerebrales (Castillo y col., 2012). Además, en general es aceptado que los CB₁R están activos constitutivamente en la mayoría de los sistemas (Canals & Milligan, 2008; Fioravanti y col., 2008; Howlett y col., 2011; Nie & Lewis, 2001; Pertwee, 2005). También vale resaltar que AM251 y SR141716A funcionan como agonistas inversos y por lo tanto

reducen la actividad basal de CB₁R (Pertwee, 2005). Todas estas evidencias acompañan la hipótesis de que, en ausencia de estímulos que puedan evocar una gran liberación sináptica de glutamato en NAc, los CB₁Rs ejercen un control tónico sobre la liberación espontánea de glutamato, lo cual trae consecuencias sobre sus niveles basales. En conclusión, es razonable pensar que, actuando directamente sobre la maquinaria de liberación vesicular, la manipulación farmacológica de CB₁R induce una desregulación marcada en la homeostasis de glutamato de NAc Core.

La noción de que los cannabinoides exógenos pueden desregular la homeostasis de glutamato del NAc sugiere que el posterior efecto de un estímulo externo sobre la liberación sináptica de glutamato *in vivo* puede verse afectado de forma secundaria. En este sentido, está bien establecido que las estrategias farmacológicas que revierten la reducción de los niveles basales de glutamato en NAc (ver ejemplos [más arriba](#)) son capaces de bloquear el subsecuente aumento transitorio de la transmisión glutamatérgica, inducida por estímulo, que es necesaria para que ocurra el comportamiento de búsqueda de droga (Kalivas, 2009). La evidencia indica que el aumento de los niveles basales de glutamato en NAc Core reestablece la función de los auto-receptores glutamatérgicos mGluR-2/3, los cuales modulan negativamente la liberación de glutamato inducida por cocaína y la conducta de búsqueda de droga (Kupchik y col., 2012; Moran y col., 2005; Moussawi & Kalivas, 2010; Moussawi y col., 2009; Peters & Kalivas, 2006). Este mecanismo también fue propuesto en el trabajo de Xi y col. (2006) para explicar el efecto supresor de AM251 sobre la liberación de glutamato en NAc desencadenado por cocaína. Los autores sugieren que AM251 estaría revirtiendo, en primera instancia, la disminución de los niveles basales inducida por la previa exposición crónica a cocaína, lo cual restauraría el tono presináptico inhibitorio del receptor mGluR-2/3 y llevaría a evitar el comportamiento de búsqueda de droga. Como prueba de esta hipótesis, estos autores mostraron que al bloquear los receptores mGluR-2/3 de NAc, administrando localmente el antagonista LY341495, fue revertido el efecto inhibitorio de AM251 sobre la reinstalación inducida por cocaína. De la misma manera, es altamente probable que en nuestro trabajo el efecto supresor de AM251 sobre la liberación de glutamato, inducida por exposición al estrés y al contexto asociado a la droga ([Experimento XI](#)), esté relacionado con la restauración del tono inhibitorio de

los mGluR-2/3 como resultado de un previo incremento del glutamato extrasináptico basal. En apoyo a esta hipótesis, se sabe que los receptores CB₁R y mGluR-2/3 co-localizan en NAc (Mato y col., 2005). Además, de la misma manera que sucede con el aumento de la liberación de glutamato inducido por cocaína (Mahler y col., 2014; Xie & Steketee, 2008) e inducido por claves asociadas a la droga (Smith y col., 2017), se sugiere que la activación del receptor mGluR-2/3 controla el aumento de la transmisión sináptica provocada por el estrés (Coplan y col., 2001; Schoepp y col., 2003; Swanson y col., 2005) y, como ya dijimos, este efecto disminuye la probabilidad de reinstalación de la búsqueda de droga. De hecho, la administración de un agonista de los mGluR-2/3, LY379268, previene la reinstalación de la búsqueda de cocaína inducida por estrés (Martin-Fardon & Weiss, 2012). Como contraparte de lo propuesto para AM251, sugerimos que la microinyección de ACEA en el NAc Core, mediante la disminución de los niveles basales de glutamato (a esto lo demostramos en el [Experimento XIII](#)), resultaría en una menor inhibición presináptica de los mGluR-2/3 y una potenciación de la liberación de glutamato inducida por el estrés y el contexto asociado a la droga. En la [Figura 1](#) de esta sección se muestra una representación esquemática de la hipótesis planteada para explicar los mecanismos mediante los cuales AM251 y ACEA regulan los niveles de glutamato extracelular en NAc Core y la conducta de búsqueda de cocaína luego del estrés.

La aparente falta de conciliación de los estudios *in vivo* con el mecanismo canónico de CB₁R demostrado en preparados *in vitro* o *ex vivo* se ha observado en varios trabajos, como en el caso de Xi y col. (2006) mencionado anteriormente. Otro ejemplo se reportó en ratas en condiciones de reinstalación del CPP asociado a morfina. Mediante el uso de microelectrodos para medir la actividad de disparo espontáneo de las neuronas NAc, la administración sola de AM251 por vía i.c.v. aumentó la tasa de activación espontánea de las neuronas en NAc y, en otro experimento, inhibió la activación de las mismas inducida por morfina durante la reinstalación (Khaleghzadeh-Ahangar & Haghparast, 2020). En el mismo trabajo, y de manera complementaria, se observó que la sola infusión i.c.v. del agonista WIN 55,212-2 disminuyó la actividad neuronal de NAc, pero aumentó la tasa de disparo de NAc luego de que se administrara morfina por vía subcutánea. Estas evidencias en conjunto con nuestras observaciones, permiten

proponer que los efectos conductuales observados en la reinstalación después de la administración de ligandos para CB₁R, son el resultado de eventos celulares sucesivos y dependientes del estado, en donde primero ocurre una regulación homeostática del estado basal que luego influye en la dirección de eventos celulares subsecuentes. En este sentido, existe evidencia de que una dosis baja de un cannabinoide exógeno puede inducir cambios plásticos homeostáticos que modifican la posterior inducción de la plasticidad a largo plazo en las sinapsis de NAc (Mato y col., 2004). En el presente trabajo sugerimos que el cambio de dirección en los eventos sinápticos denota que un proceso de alteración homeostática (metaplasticidad) precedente al estrés, inducido por los cannabinoides exógenos, puede influir en el resultado de los efectos transitorios neuroquímicos y conductuales que ocurren durante la re-exposición al contexto asociado a la droga. En conclusión, proponemos que los CB₁Rs modulan los niveles basales de glutamato extracelular en NAc afectando el posterior aumento de glutamato inducido por estrés/contexto, y que el mecanismo neurobiológico subyacente a este último efecto podría estar relacionado de forma más directa con la actividad de los auto-receptores mGluR-2/3.

Otra hipótesis, formulada por Wiskerke (2008), que intenta explicar la posible estimulación de los mGluR-2/3 luego de microinyectar antagonistas de CB₁R, propone que tal estimulación podría deberse a un incremento de la cantidad de proteínas Gi/Go que pueden unirse a los receptores mGluR-2/3 activándolos después de que el bloqueo de los CB₁Rs resulte en un desacoplamiento de las proteínas Gi/Go normalmente acopladas a este receptor. Esta idea está sustentada por la capacidad de los CB₁R de secuestrar las proteínas Gi/Go e inhibir el funcionamiento de otros receptores acoplados a proteína G (Nie & Lewis, 2001; Vasquez & Lewis, 1999). Sin embargo, hasta el momento no se ha demostrado que todos estos eventos celulares y moleculares ocurran en relación a condiciones de reinstalación de búsqueda de droga inducida por estrés. Resulta interesante que trabajos futuros intenten profundizar en estos posibles mecanismos moleculares subyacentes a la influencia de los ligandos para CB₁R sobre la recaída.

Por otra parte, el papel de los astrocitos en el mecanismo de acción de los ligandos para CB₁R resulta intrigante. Algunos estudios informaron que los CB₁Rs que se expresan

en astrocitos están acoplados a proteína Gq/11 estimuladora y su activación conduce a la liberación de glutamato (Navarrete & Araque, 2008; Navarrete y col., 2014). De hecho, un estudio electrofisiológico muy reciente realizado en preparados *ex vivo* de NAc, en animales que previamente recibieron repetidamente cocaína, muestra que la activación de los CB₁Rs causa un evento excitatorio postsináptico que se corresponde típicamente con un aumento de la liberación de glutamato desde astrocitos (Zhang y col., 2021). Cabe destacar que estos resultados fueron observados luego de un tratamiento repetido con un agonista parcial de los CB₁Rs y de los TRPV1 (methAEA) que además tiene un efecto más robusto sobre los CB₁Rs astrogliales, por lo tanto, resulta difícil hacer una comparación directa con nuestras observaciones *in vivo*. Además, este mecanismo parece no predominar durante la administración de ACEA mediante microdiálisis reversa ([Experimento XIII](#)), ya que en esta tesis observamos una disminución marcada del glutamato extracelular, no un aumento. Es decir que el glutamato detectado en nuestros experimentos parece tener un origen preferentemente neuronal. Esto coincide con lo reportado por Xi y col. (2006), en cuyo trabajo se muestra que la administración sistémica de AM251 por sí sola aumenta los niveles de glutamato extracelular en NAc de manera dependiente de la adición de tetrodotoxina (bloqueante de los canales de Na⁺ presentes en neuronas) a la solución que circula por la *probe* de microdiálisis. A pesar de que es difícil comparar nuestros resultados con los del trabajo de Zhang y col. (2021), resulta interesante que estos autores también proponen que la restauración de la homeostasis de glutamato (en este caso inducida por el tratamiento repetido con methAEA) previene la reinstalación a la búsqueda de cocaína. También resulta interesante que la liberación de glutamato desde astrocitos parece ocurrir en aquellos que están reactivos (D'Ascenzo y col., 2007) y en respuesta a claves asociadas a la droga y al estrés (Kruyer & Kalivas, 2020; Orellana y col., 2015). Por todo esto podemos plantear que el aumento de glutamato extracelular que observamos en nuestros experimentos, luego del estrés y durante la re-exposición al contexto asociado a cocaína, puede ser atribuido a una suma de efectos entre la liberación de glutamato desde astrocitos reactivos (probablemente mediada por los CB₁Rs y los mGluR-5 astrogliales) y desde las terminales neuronales glutamatérgicas que llegan desde la CPf. Por otro lado, existe evidencia de que los CB₁R astrogliales podrían tener un papel específico en

los procesos de selección de circuitos (R. Martin y col., 2015). Por lo tanto, al determinar la actividad selectiva de circuitos particulares y la formación de "dominios" neuronales funcionales, se pueda identificar probablemente la contribución fina de los CB₁R astrogliales sobre las respuestas conductuales. Futuros estudios son necesarios para entender el rol de los CB₁R de astrocitos en el comportamiento de búsqueda de droga. En la [Figura 1](#) de esta sección, que muestra los posibles mecanismos mediante los cuales AM251 y ACEA pueden regular los niveles de glutamato extracelular y el comportamiento, también se incluye a los CB₁R de astrocitos.

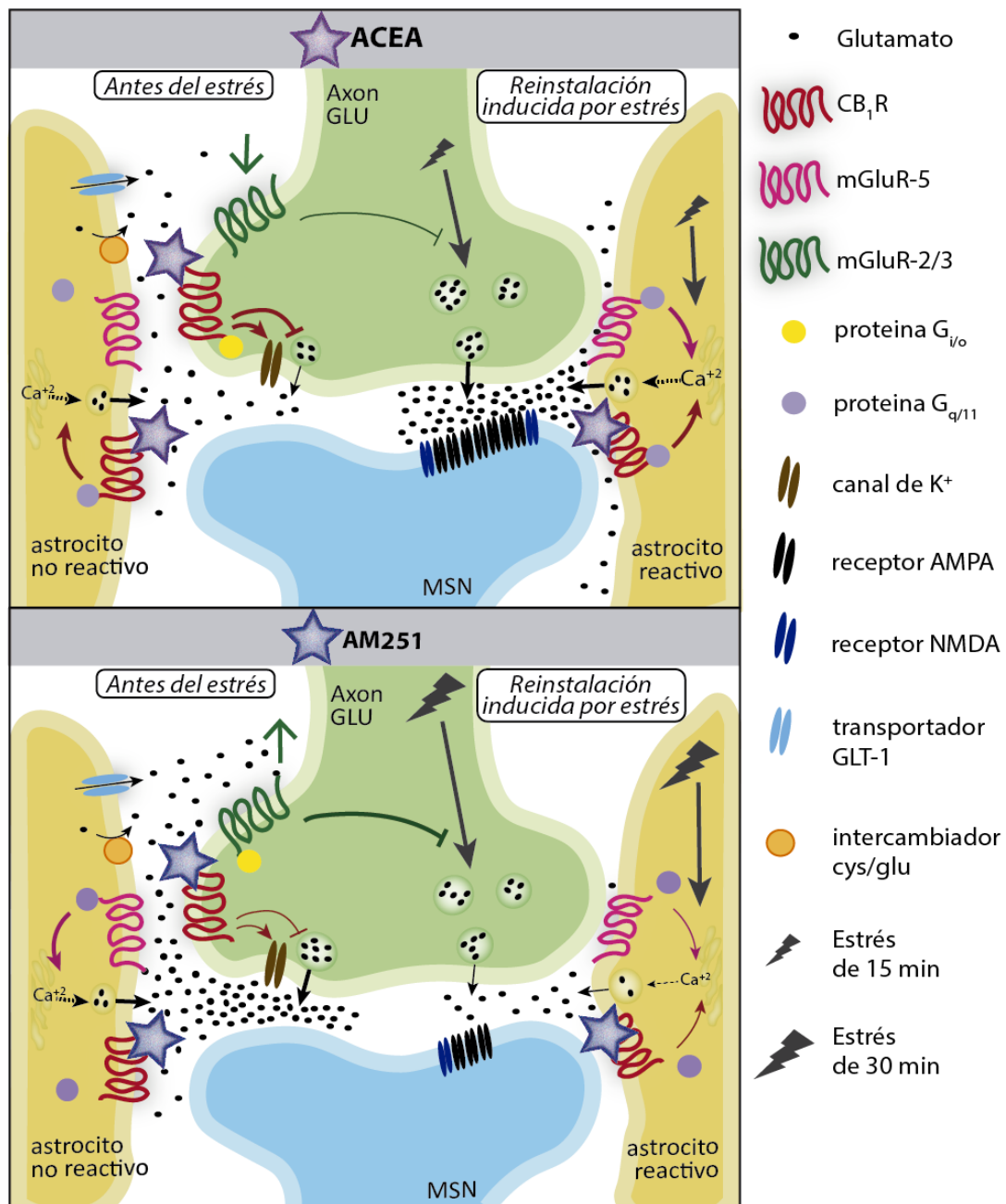


Figura 16. Resumen esquemático de la hipótesis planteada para explicar los mecanismos que subyacen la acción de ACEA (panel superior) y de AM251 (panel inferior) en la modulación de los niveles de glutamato extracelular de NAc Core, antes y después de la aplicación del estrés por inmovilización en ratas que previamente extinguieron la preferencia condicionada a cocaína. Dado que los CB₁Rs están inhibiendo tónicamente la liberación espontánea de glutamato, al administrar ACEA se potencia y al administrar AM251 se suprime esta función, lo cual resulta en una disminución o en un aumento de los niveles basales de glutamato extracelular, respectivamente. La disminución de estos niveles, inducida por ACEA, produce una menor actividad de los receptores metabotrópicos auto-inhibitorios mGluR-2/3. El aumento de los niveles basales de glutamato extracelular, inducido por AM251, incrementa la actividad inhibitoria de los auto-receptores mGluR-2/3. En condiciones libres de ligandos para CB₁R (no se muestra en la figura), el estrés por inmovilización de 30 min, pero no el de 15 min, junto con la re-exposición al contexto del CPP asociado a cocaína produce un incremento de la liberación presináptica de glutamato en NAc Core, lo cual se asocia con la reinstalación de la conducta de búsqueda de droga. Esta liberación de glutamato evocada por el estrés y el contexto puede ser suprimida por el aumento de la actividad de los receptores auto-inhibitorios mGluR-2/3, inducido previamente por AM251 a través del aumento de los niveles basales de glutamato extracelular. La liberación presináptica de glutamato luego de un estrés por inmovilización de 15 min, que no induce reinstalación por sí solo, puede ser potenciada por una disminución de la actividad de los receptores auto-inhibitorios mGluR-2/3, lo cual se logra administrando ACEA previamente. Esta liberación también podría ser potenciada al activar los CB₁Rs presentes en astrocitos reactivos que liberan glutamato en respuesta al estrés y al contexto asociado a la droga. En esta figura también se representa la hipótesis relacionada a la capacidad de los CB₁R de secuestrar las proteínas Gi/Go e inhibir el funcionamiento de otros receptores acoplados a proteína G (ver más detalles en el texto).

Al momento de analizar y comparar resultados de diversos trabajos sostenemos que también es importante considerar “la historia previa” de los animales, es decir, tener en cuenta si los individuos bajo estudio han recibido o no previamente algún tratamiento prolongado con alguna droga, o si las observaciones provienen de animales naïve. El énfasis que hacemos en este aspecto deriva del conocimiento de que tanto los procedimientos de exposición crónica a cocaína como los de extinción del aprendizaje condicionado a la droga pueden alterar la homeostasis de glutamato y la transmisión endocannabinoide en el NAc (ver detalles y citas [más arriba](#)). Estos cambios neuroadaptativos inducidos por la cocaína en NAc pueden tener sus consecuencias funcionales. En este sentido, en el trabajo de McCutcheon y col. (2011) se mostró que después de un largo período de abstinencia de la AA prolongada de cocaína, la magnitud de la depresión sináptica en el NAc inducida por el agonista de CB₁R, WIN 55,212-2, fue significativamente más pronunciada que la observada en los animales del grupo control tratado con salina. Los autores sugieren que esta observación puede deberse a una interacción anormal entre estos receptores y sus ligandos endógenos. Además, se sabe que la administración aguda de cocaína y el período de abstinencia anula la depresión a largo plazo mediada por endocannabinoides (ecb-LTD) en las sinapsis del NAc (Fourgeaud y col., 2004). Todo esto significa que el consumo de cocaína puede reducir

la probabilidad de plasticidad sináptica mediada por endocannabinoides en el NAc, lo cual sugerimos que puede alterar el procesamiento de la información motivacionalmente relevante en esta estructura cerebral. Es probable que estos procesos también contribuyan a la desregulación de la respuesta frente al estrés.

El estrés como potenciador de las claves contextuales asociadas a cocaína

En el presente trabajo fuimos más allá de las manipulaciones farmacológicas convencionales y nos planteamos la posibilidad de estudiar el curso temporal de la liberación de glutamato *in vivo* y de explorar un posible componente dependiente del contexto. Con nuestros resultados podemos concluir que los CB₁Rs podrían estar mediando el impacto de la exposición no solo al estrés, sino también al contexto asociado a cocaína, en la transmisión glutamatérgica de NAc Core, para influir en el comportamiento de búsqueda de droga durante la reinstalación del CPP. Tal como ya se describió, el aumento de glutamato en NAc Core después del estrés, en ratas previamente sometidas a la extinción del CPP, ocurre solamente mientras los animales permanecen en el contexto asociado a la droga, pero no en el no asociado ([Experimento X](#)). Estas observaciones pueden sugerir lo siguiente: que el aumento de glutamato no es una simple respuesta al estresor sino que depende de la subsecuente presentación de un contexto con significancia motivacional; que el estrés podría estar potenciando la respuesta neuroquímica al contexto asociado a cocaína; y que este aumento de glutamato contexto-dependiente se asocia al comportamiento de búsqueda de droga en nuestro modelo de CPP.

Hay trabajos que reportan que estresores como la inmovilización, pinchazo en la cola o *handling* inducen el aumento de liberación de glutamato en CPf y NAc por sí solos (Bagley & Moghaddam, 1997; Deutch & Roth, 1990; Gilad y col., 1990; Gresch y col., 1994; Imperato y col., 1992; Kalivas & Duffy, 1995; Moghaddam, 1993). Si bien en los experimentos de esta tesis no se recolectaron muestras de microdiálisis en el mismo momento en que los animales estaban siendo inmovilizados, este es el primer trabajo que reporta que, una vez finalizado el estrés, el aumento de glutamato es contexto-dependiente. En este sentido hacemos hincapié en que nuestros animales tienen una

historia previa con la cocaína (condicionamiento y extinción) y que el estresor es aplicado en el mismo ambiente de contacto con la droga (corredor central del aparato de CPP), por lo tanto, el incremento de glutamato contexto-dependiente en NAc Core puede estar reflejando principalmente que la activación de mecanismos conductuales en respuesta al estrés está influenciada por las memorias relacionadas a la droga. Además, el diseño experimental de nuestros estudios se basaron en el trabajo de McFarland y col. (2004), en el cual el aumento en los niveles de glutamato en NAc Core se detecta después y no durante la aplicación del estresor, y que este aumento se produce principalmente durante el momento en que el animal realiza más presiones sobre la palanca activa, con lo cual los autores sugieren que se correlaciona más con la conducta de búsqueda de droga que con el efecto del estrés *per se*.

Las principales hipótesis que intentan explicar el rol del estrés en la reinstalación se basan en las similitudes y diferencias que existen, a nivel neurobiológico, con la reinstalación inducida por otros estímulos, como una dosis desafío de la droga y claves asociadas al consumo de la misma. En este sentido, los mecanismos conocidos hasta la fecha ya fueron expuestos [en la Introducción](#) de esta tesis. Desde una perspectiva “más cognitiva o comportamental”, se ha planteado que el estrés logra inducir la reinstalación de búsqueda de droga debido a la capacidad que posee para mimetizar ciertas claves interoceptivas, o estados internos, provocados por la cocaína durante el condicionamiento induciendo un estado motivacional incentivo. De esta manera, el cerebro asigna un valor incentivo aumentado a las claves extinguidas previamente apareadas con los efectos reforzantes de la droga (Ahmed & Koob, 1997). De hecho, diversos trabajos reportan que el estrés potencia la reinstalación a la AA de cocaína o alcohol inducida por presentación de claves (Buffalari & See, 2009; X. Liu & Weiss, 2002), es decir que no actúa solo. Principalmente, y junto con la evidencia de este trabajo de tesis, numerosos autores establecen que los eventos estresantes actúan preparando la escena (*setting the stage*, en inglés) para que los efectos generados por otros estímulos asociados a la droga se vean potenciados, probablemente al aumentar la sensibilidad de los circuitos cerebrales encargados de procesar los efectos reforzantes de estos estímulos (Mantsch y col., 2014). Los datos aquí presentados apoyan la idea de que la activación del sistema endocannabinoide contribuye a esta potenciación.

Las claves contextuales son importantes tanto en el mantenimiento como en la reinstalación a la búsqueda de droga, ya que están relacionadas con una mayor anticipación de los efectos gratificantes de cocaína, evocando la memoria de un aprendizaje condicionado (Perry y col., 2014). Desde la neurobiología, esta función puede ser explicada en parte por una hiperreactividad de las áreas involucradas en los procesos de recompensa (Wolf, 2016). La investigación clínica reporta que las personas con antecedentes de consumo de drogas muestran respuestas fisiológicas exacerbadas ante distintos tipos de claves asociadas a la droga (Chiamulera, 2005; Drummond, 2000; Foltin & Haney, 2000), lo cual se acompaña con un incremento del deseo por la droga y predice, hasta cierto punto, la recaída en consumidores de cocaína (Back y col., 2010). En nuestro trabajo, por primera vez se demuestra la estrecha relación que existe entre la expresión del CPP y el aumento en los niveles de glutamato de NAc Core, mediante la recolección de muestras del espacio extracelular por la técnica de microdiálisis *in vivo* ([Experimento VII](#)). Además, nuestro estudio no solo realiza un aporte importante a la identificación de un mecanismo glutamatérgico dependiente del contexto, sino que también aporta evidencia robusta de que el aumento de glutamato se da ante claves condicionadas solamente y no ante contextos “más preferidos” simplemente, como sucede después del test basal (en ratas naïve) en donde no se observa ningún cambio en la concentración de glutamato ([Experimento VI](#)). En la bibliografía podemos encontrar otros estudios, que también utilizaron la técnica de microdiálisis *in vivo*, en los cuales la presentación de contextos o señales asociados de manera previa con la administración de cocaína o heroína provocaron un incremento en la liberación de glutamato de NAc (Bell y col., 2000; Hotsenpiller y col., 2001; LaLumiere & Kalivas, 2008; Suto y col., 2010). Es interesante que la omisión de una clave olfativa estrechamente relacionada con la AA de cocaína resultó en una disminución de glutamato en NAc Core (Suto y col., 2013), indicando que los cambios transitorios de glutamato en esta área modulan de forma bidireccional la expectativa por la droga. Por último, nuestro trabajo también es el primero en demostrar los efectos supresores del proceso de extinción del CPP sobre el aumento de glutamato extracelular en NAc Core en respuesta a la re-exposición al contexto asociado a la cocaína ([Experimento VIII](#)). Estos resultados son consistentes a los obtenidos bajo el paradigma de AA (Miguens y col., 2008; Suto y col.,

2010; Suto y col., 2013) y aportan evidencia a la hipótesis de que las propiedades de reforzamiento secundario son modulados en parte por la transmisión glutamatérgica de NAc Core. La importancia de las claves contextuales durante la recaída inducida por estrés radica en que esta última es potenciada o requiere de la presentación conjunta de claves apareadas en modelos animales (Buffalari & See, 2009; Feltenstein & See, 2006; Graf y col., 2013; Shelton & Beardsley, 2005). En seres humanos, se ha observado una mayor reactividad a las claves apareadas con una droga luego de la exposición a memorias traumáticas o a estímulos aversivos (Back y col., 2010; Coffey y col., 2002; Duncan y col., 2007; Fox y col., 2005).

CONCLUSIONES

En conclusión, los hallazgos presentados en este trabajo de tesis apoyan la hipótesis de que la exposición al estrés y la activación de CB₁R pueden interactuar en NAc Core para promover la recaída a la búsqueda de cocaína al modular la transmisión glutamatérgica en esta área. Específicamente, los cambios en los niveles de glutamato extracelular de NAc Core, dependientes del contexto e inducidos por un estresor, junto con el efecto supresor de AM251 y facilitador de ACEA, demuestran claramente que un mecanismo glutamatérgico dependiente de CB₁R subyace a la influencia del estrés en el procesamiento del significado motivacional de las claves contextuales asociadas a la droga para inducir la reinstalación del CPP.

Adicionalmente, este estudio proporciona una plataforma para continuar investigando los mecanismos que subyacen a la participación de los CB₁Rs en la reinstalación de la búsqueda de droga inducida por estrés. Además, suma evidencia acerca de que, si bien ambas subregiones de NAc participan de los procesos de aprendizaje y el control sobre las conductas apetitivas, sería el NAc Core, pero no NAc Shell, el área crítica para la regulación límbica de la conducta en respuesta a un estresor y a claves contextuales asociadas con la búsqueda de droga.

Cabe destacar que los estudios de microdiálisis *in vivo* como el nuestro, en combinación con técnicas farmacológicas y comportamentales, resultan de gran importancia para el estudio de los mecanismos de neuroplasticidad relacionados con la adicción, y significan un medio valioso en el descubrimiento de nuevas estrategias de

prevención y tratamiento de los cambios inducidos por las drogas y eventos estresantes. Además, nuestros hallazgos son consistentes con la idea de que los estudios preclínicos que incorporan la variable “contexto asociado a una droga” tienen un gran valor traslacional.

Teniendo en cuenta que una desregulación en la respuesta o reactividad al estrés es una de las consecuencias más adversas del consumo crónico de cocaína, nuestra principal contribución se relaciona con el mayor entendimiento de la importancia del estrés como factor disparador de la recaída y de la función de los CB₁Rs en este fenómeno, lo cual puede contribuir al desarrollo de terapias farmacológicas más efectivas para el tratamiento de pacientes con una patología dual de trastornos relacionados a la adicción a drogas de abuso y al estrés.



BIBLIOGRAFÍA

- A.P.A. (2013). *Diagnostic and statistical manual of mental disorders* (5th ed.). Washinton, D.C.: American Psychiatric Association.
- Adamczyk, P., Faron-Gorecka, A., Kusmider, M., Dziedzicka-Wasylewska, M., Papp, M., & Filip, M. (2012). Long-lasting increase in [(3)H]CP55,940 binding to CB1 receptors following cocaine self-administration and its withdrawal in rats. *Brain Res*, *1451*, 34-43. doi: 10.1016/j.brainres.2012.02.052
- Adamczyk, P., Miszkiel, J., McCreary, A. C., Filip, M., Papp, M., & Przegalinski, E. (2012). The effects of cannabinoid CB1, CB2 and vanilloid TRPV1 receptor antagonists on cocaine addictive behavior in rats. *Brain Res*, *1444*, 45-54. doi: 10.1016/j.brainres.2012.01.030
- Agilent-Technologies. (Estados Unidos). EZChrom Elite Software (Version 4.0). Pleasanton, CA. Retrieved from <http://www.agilent.com>
- Aguilar, M. A., Rodriguez-Arias, M., & Minarro, J. (2009). Neurobiological mechanisms of the reinstatement of drug-conditioned place preference. *Brain Res Rev*, *59*(2), 253-277. doi: 10.1016/j.brainresrev.2008.08.002
- Ahmed, S. H., & Koob, G. F. (1997). Cocaine- but not food-seeking behavior is reinstated by stress after extinction. *Psychopharmacology (Berl)*, *132*(3), 289-295. doi: 10.1007/s002130050347
- Alger, B. E. (2002). Retrograde signaling in the regulation of synaptic transmission: focus on endocannabinoids. *Prog Neurobiol*, *68*(4), 247-286. doi: 10.1016/s0301-0082(02)00080-1
- Altman, J., Everitt, B. J., Glautier, S., Markou, A., Nutt, D., Oretti, R., . . . Robbins, T. W. (1996). The biological, social and clinical bases of drug addiction: commentary and debate. *Psychopharmacology (Berl)*, *125*(4), 285-345. doi: 10.1007/BF02246016
- Alvarez-Jaimes, L., Polis, I., & Parsons, L. H. (2008). Attenuation of cue-induced heroin-seeking behavior by cannabinoid CB1 antagonist infusions into the nucleus accumbens core and prefrontal cortex, but not basolateral amygdala. *Neuropsychopharmacology*, *33*(10), 2483-2493. doi: 10.1038/sj.npp.1301630
- An, D., Peigneur, S., Hendrickx, L. A., & Tytgat, J. (2020). Targeting Cannabinoid Receptors: Current Status and Prospects of Natural Products. *Int J Mol Sci*, *21*(14). doi: 10.3390/ijms21145064
- Anderson, A. L., Reid, M. S., Li, S. H., Holmes, T., Shemanski, L., Slee, A., . . . Elkashef, A. M. (2009). Modafinil for the treatment of cocaine dependence. *Drug Alcohol Depend*, *104*(1-2), 133-139. doi: 10.1016/j.drugalcdep.2009.04.015
- Anderson, S. M., Schmidt, H. D., & Pierce, R. C. (2006). Administration of the D2 dopamine receptor antagonist sulpiride into the shell, but not the core, of the nucleus accumbens attenuates cocaine priming-induced reinstatement of drug seeking. *Neuropsychopharmacology*, *31*(7), 1452-1461. doi: 10.1038/sj.npp.1300922
- Androvicova, R., Horacek, J., Stark, T., Drago, F., & Micale, V. (2017). Endocannabinoid system in sexual motivational processes: Is it a novel therapeutic horizon? *Pharmacol Res*, *115*, 200-208. doi: 10.1016/j.phrs.2016.11.021
- 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*(8), 1470-1478. doi: 10.1038/sj.npp.1300454
- Anthony, J. C., Warner, L. A., & Kessler, R. C. (1997). Comparative epidemiology of dependence on tobacco, alcohol, controlled substances, and inhalants: basic findings from the National Comorbidity Survey.
- Anwyl, R. (2009). Metabotropic glutamate receptor-dependent long-term potentiation. *Neuropharmacology*, *56*(4), 735-740. doi: 10.1016/j.neuropharm.2009.01.002
- Araujo, D. J., Tjoa, K., & Saijo, K. (2019). The Endocannabinoid System as a Window Into Microglial Biology and Its Relationship to Autism. *Front Cell Neurosci*, *13*, 424. doi: 10.3389/fncel.2019.00424
- Aso, E., Palomer, E., Juves, S., Maldonado, R., Munoz, F. J., & Ferrer, I. (2012). CB1 agonist ACEA protects neurons and reduces the cognitive impairment of AbetaPP/PS1 mice. *J Alzheimers Dis*, *30*(2), 439-459. doi: 10.3233/JAD-2012-111862
- Back, S. E., Hartwell, K., DeSantis, S. M., Saladin, M., McRae-Clark, A. L., Price, K. L., . . . Brady, K. T. (2010). Reactivity to laboratory stress provocation predicts relapse to cocaine. *Drug Alcohol Depend*, *106*(1), 21-27. doi: 10.1016/j.drugalcdep.2009.07.016

- Backstrom, P., & Hyytia, P. (2007). Involvement of AMPA/kainate, NMDA, and mGlu5 receptors in the nucleus accumbens core in cue-induced reinstatement of cocaine seeking in rats. *Psychopharmacology (Berl)*, *192*(4), 571-580. doi: 10.1007/s00213-007-0753-8
- Bachtell, R. K., Whisler, K., Karanian, D., & Self, D. W. (2005). Effects of intra-nucleus accumbens shell administration of dopamine agonists and antagonists on cocaine-taking and cocaine-seeking behaviors in the rat. *Psychopharmacology (Berl)*, *183*(1), 41-53. doi: 10.1007/s00213-005-0133-1
- Bagley, J., & Moghaddam, B. (1997). Temporal dynamics of glutamate efflux in the prefrontal cortex and in the hippocampus following repeated stress: effects of pretreatment with saline or diazepam. *Neuroscience*, *77*(1), 65-73. doi: 10.1016/s0306-4522(96)00435-6
- Baik, J. H. (2020). Stress and the dopaminergic reward system. *Exp Mol Med*, *52*(12), 1879-1890. doi: 10.1038/s12276-020-00532-4
- Baker, D. A., McFarland, K., Lake, R. W., Shen, H., Tang, X. C., Toda, S., & Kalivas, P. W. (2003). Neuroadaptations in cystine-glutamate exchange underlie cocaine relapse. *Nat Neurosci*, *6*(7), 743-749. doi: 10.1038/nn1069
- Baker, D. A., Xi, Z. X., Shen, H., Swanson, C. J., & Kalivas, P. W. (2002). The origin and neuronal function of in vivo nonsynaptic glutamate. *J Neurosci*, *22*(20), 9134-9141.
- Bardo, M. T., & Bevins, R. A. (2000). Conditioned place preference: what does it add to our preclinical understanding of drug reward? *Psychopharmacology (Berl)*, *153*(1), 31-43. doi: 10.1007/s002130000569
- Barna, I., Zelena, D., Arszovszki, A. C., & Ledent, C. (2004). The role of endogenous cannabinoids in the hypothalamo-pituitary-adrenal axis regulation: in vivo and in vitro studies in CB1 receptor knockout mice. *Life Sci*, *75*(24), 2959-2970. doi: 10.1016/j.lfs.2004.06.006
- Barrientos, C., Knowland, D., Wu, M. M. J., Lilascharoen, V., Huang, K. W., Malenka, R. C., & Lim, B. K. (2018). Cocaine-Induced Structural Plasticity in Input Regions to Distinct Cell Types in Nucleus Accumbens. *Biol Psychiatry*, *84*(12), 893-904. doi: 10.1016/j.biopsych.2018.04.019
- Basavarajappa, B. S. (2007). Critical enzymes involved in endocannabinoid metabolism. *Protein Pept Lett*, *14*(3), 237-246. doi: 10.2174/092986607780090829
- Beltramo, M., Stella, N., Calignano, A., Lin, S. Y., Makriyannis, A., & Piomelli, D. (1997). Functional role of high-affinity anandamide transport, as revealed by selective inhibition. *Science*, *277*(5329), 1094-1097. doi: 10.1126/science.277.5329.1094
- Bell, K., Duffy, P., & Kalivas, P. W. (2000). Context-specific enhancement of glutamate transmission by cocaine. *Neuropsychopharmacology*, *23*(3), 335-344. doi: 10.1016/S0893-133X(00)00100-7
- Bellocchio, L., Soria-Gomez, E., Quarta, C., Metna-Laurent, M., Cardinal, P., Binder, E., . . . Marsicano, G. (2013). Activation of the sympathetic nervous system mediates hypophagic and anxiety-like effects of CB(1) receptor blockade. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *110*(12), 4786-4791. doi: 10.1073/pnas.1218573110
- Benard, G., Massa, F., Puente, N., Lourenco, J., Bellocchio, L., Soria-Gomez, E., . . . Marsicano, G. (2012). Mitochondrial CB(1) receptors regulate neuronal energy metabolism. *Nat Neurosci*, *15*(4), 558-564. doi: 10.1038/nn.3053
- Berridge, K. C., & Robinson, T. E. (1998). What is the role of dopamine in reward: hedonic impact, reward learning, or incentive salience? *Brain Res Brain Res Rev*, *28*(3), 309-369. doi: 10.1016/s0165-0173(98)00019-8
- Bertran-Gonzalez, J., Bosch, C., Maroteaux, M., Matamales, M., Herve, D., Valjent, E., & Girault, J. A. (2008). Opposing patterns of signaling activation in dopamine D1 and D2 receptor-expressing striatal neurons in response to cocaine and haloperidol. *J Neurosci*, *28*(22), 5671-5685. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1039-08.2008
- Bespalov, A. Y., Dravolina, O. A., Sukhanov, I., Zakharova, E., Blokhina, E., Zvartau, E., . . . Markou, A. (2005). Metabotropic glutamate receptor (mGluR5) antagonist MPEP attenuated cue- and schedule-induced reinstatement of nicotine self-administration behavior in rats. *Neuropharmacology*, *49 Suppl 1*, 167-178. doi: 10.1016/j.neuropharm.2005.06.007
- Biala, G., & Budzynska, B. (2008). Calcium-dependent mechanisms of the reinstatement of nicotine-conditioned place preference by drug priming in rats. *Pharmacol Biochem Behav*, *89*(1), 116-125. doi: 10.1016/j.pbb.2007.12.005

- Bock, R., Shin, J. H., Kaplan, A. R., Dobi, A., Markey, E., Kramer, P. F., . . . Alvarez, V. A. (2013). Strengthening the accumbal indirect pathway promotes resilience to compulsive cocaine use. *Nat Neurosci*, *16*(5), 632-638. doi: 10.1038/nn.3369
- Bonhaus, D. W., Chang, L. K., Kwan, J., & Martin, G. R. (1998). Dual activation and inhibition of adenylyl cyclase by cannabinoid receptor agonists: evidence for agonist-specific trafficking of intracellular responses. *J Pharmacol Exp Ther*, *287*(3), 884-888.
- Bossert, J. M., Marchant, N. J., Calu, D. J., & Shaham, Y. (2013). The reinstatement model of drug relapse: recent neurobiological findings, emerging research topics, and translational research. *Psychopharmacology (Berl)*, *229*(3), 453-476. doi: 10.1007/s00213-013-3120-y
- Bossert, J. M., Poles, G. C., Wihbey, K. A., Koya, E., & Shaham, Y. (2007). Differential effects of blockade of dopamine D1-family receptors in nucleus accumbens core or shell on reinstatement of heroin seeking induced by contextual and discrete cues. *J Neurosci*, *27*(46), 12655-12663. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3926-07.2007
- Bouton, M. E. (1988). Context and ambiguity in the extinction of emotional learning: implications for exposure therapy. *Behav Res Ther*, *26*(2), 137-149. doi: 10.1016/0005-7967(88)90113-1
- Bouton, M. E. (2002). Context, ambiguity, and unlearning: sources of relapse after behavioral extinction. *Biol Psychiatry*, *52*(10), 976-986. doi: 10.1016/s0006-3223(02)01546-9
- Braida, D., Pozzi, M., Cavallini, R., & Sala, M. (2001). Conditioned place preference induced by the cannabinoid agonist CP 55,940: interaction with the opioid system. *Neuroscience*, *104*(4), 923-926. doi: 10.1016/s0306-4522(01)00210-x
- Breiter, H. C., Gollub, R. L., Weisskoff, R. M., Kennedy, D. N., Makris, N., Berke, J. D., . . . Hyman, S. E. (1997). Acute effects of cocaine on human brain activity and emotion. *Neuron*, *19*(3), 591-611. doi: 10.1016/s0896-6273(00)80374-8
- Bremner, J. D., Krystal, J. H., Southwick, S. M., & Charney, D. S. (1996). Noradrenergic mechanisms in stress and anxiety: I. Preclinical studies. *Synapse*, *23*(1), 28-38. doi: 10.1002/(SICI)1098-2396(199605)23:1<28::AID-SYN4>3.0.CO;2-J
- Brenhouse, H. C., & Andersen, S. L. (2008). Delayed extinction and stronger reinstatement of cocaine conditioned place preference in adolescent rats, compared to adults. *Behav Neurosci*, *122*(2), 460-465. doi: 10.1037/0735-7044.122.2.460
- Briand, L. A., & Blendy, J. A. (2013). Not all stress is equal: CREB is not necessary for restraint stress reinstatement of cocaine-conditioned reward. *Behav Brain Res*, *246*, 63-68. doi: 10.1016/j.bbr.2013.02.026
- Britt, J. P., Benaliouad, F., McDevitt, R. A., Stuber, G. D., Wise, R. A., & Bonci, A. (2012). Synaptic and behavioral profile of multiple glutamatergic inputs to the nucleus accumbens. *Neuron*, *76*(4), 790-803. doi: 10.1016/j.neuron.2012.09.040
- Brown, S. A., Vik, P. W., Patterson, T. L., Grant, I., & Schuckit, M. A. (1995). Stress, vulnerability and adult alcohol relapse. *J Stud Alcohol*, *56*(5), 538-545. doi: 10.15288/jsa.1995.56.538
- Brown, S. P., Brenowitz, S. D., & Regehr, W. G. (2003). Brief presynaptic bursts evoke synapse-specific retrograde inhibition mediated by endogenous cannabinoids. *Nat Neurosci*, *6*(10), 1048-1057. doi: 10.1038/nn1126
- Brown, T. M., Brotchie, J. M., & Fitzjohn, S. M. (2003). Cannabinoids decrease corticostriatal synaptic transmission via an effect on glutamate uptake. *J Neurosci*, *23*(35), 11073-11077.
- Buchta, W. C., & Riegel, A. C. (2015). Chronic cocaine disrupts mesocortical learning mechanisms. *Brain Res*, *1628*(Pt A), 88-103. doi: 10.1016/j.brainres.2015.02.003
- Buffalari, D. M., & See, R. E. (2009). Footshock stress potentiates cue-induced cocaine-seeking in an animal model of relapse. *Physiol Behav*, *98*(5), 614-617. doi: 10.1016/j.physbeh.2009.09.013
- Busquets-Garcia, A., Bains, J., & Marsicano, G. (2018). CB1 Receptor Signaling in the Brain: Extracting Specificity from Ubiquity. *Neuropsychopharmacology*, *43*(1), 4-20. doi: 10.1038/npp.2017.206
- Busquets-Garcia, A., Gomis-Gonzalez, M., Srivastava, R. K., Cutando, L., Ortega-Alvaro, A., Ruehle, S., . . . Ozaita, A. (2016). Peripheral and central CB1 cannabinoid receptors control stress-induced impairment of memory consolidation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *113*(35), 9904-9909. doi: 10.1073/pnas.1525066113
- Bystrowska, B., Frankowska, M., Smaga, I., Niedzielska-Andres, E., Pomierny-Chamiolo, L., & Filip, M. (2019). Cocaine-Induced Reinstatement of Cocaine Seeking Provokes Changes in the

- Endocannabinoid and N-Acylethanolamine Levels in Rat Brain Structures. *Molecules*, 24(6). doi: 10.3390/molecules24061125
- Bystrowska, B., Smaga, I., Frankowska, M., & Filip, M. (2014). Changes in endocannabinoid and N-acylethanolamine levels in rat brain structures following cocaine self-administration and extinction training. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 50, 1-10. doi: 10.1016/j.pnpbp.2013.12.002
- Caille, S., Alvarez-Jaimes, L., Polis, I., Stouffer, D. G., & Parsons, L. H. (2007). Specific alterations of extracellular endocannabinoid levels in the nucleus accumbens by ethanol, heroin, and cocaine self-administration. *J Neurosci*, 27(14), 3695-3702. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4403-06.2007
- Calipari, E. S., Bagot, R. C., Purushothaman, I., Davidson, T. J., Yorgason, J. T., Pena, C. J., . . . Nestler, E. J. (2016). In vivo imaging identifies temporal signature of D1 and D2 medium spiny neurons in cocaine reward. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 113(10), 2726-2731. doi: 10.1073/pnas.1521238113
- Cami, J., & Farre, M. (2003). Drug addiction. *N Engl J Med*, 349(10), 975-986. doi: 10.1056/NEJMra023160
- Canals, M., & Milligan, G. (2008). Constitutive activity of the cannabinoid CB1 receptor regulates the function of co-expressed Mu opioid receptors. *J Biol Chem*, 283(17), 11424-11434. doi: 10.1074/jbc.M710300200
- Cannon, W. (1935). STRESSES AND STRAINS OF HOMEOSTASIS. *The American Journal of the Medical Sciences*, 189, 13-14.
- 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 (Berl)*, 168(1-2), 66-74. doi: 10.1007/s00213-002-1283-z
- Carlezon, W. A., Jr., & Thomas, M. J. (2009). Biological substrates of reward and aversion: a nucleus accumbens activity hypothesis. *Neuropharmacology*, 56 Suppl 1, 122-132. doi: 10.1016/j.neuropharm.2008.06.075
- Castillo, P. E., Younts, T. J., Chavez, A. E., & Hashimoto, Y. (2012). Endocannabinoid signaling and synaptic function. *Neuron*, 76(1), 70-81. doi: 10.1016/j.neuron.2012.09.020
- Cenni, G., Blandina, P., Mackie, K., Nosi, D., Formigli, L., Giannoni, P., . . . Passani, M. B. (2006). Differential effect of cannabinoid agonists and endocannabinoids on histamine release from distinct regions of the rat brain. *Eur J Neurosci*, 24(6), 1633-1644. doi: 10.1111/j.1460-9568.2006.05046.x
- Centonze, D., Rossi, S., Prosperetti, C., Gasperi, V., De Chiara, V., Bari, M., . . . Maccarrone, M. (2007). Endocannabinoids limit metabotropic glutamate 5 receptor-mediated synaptic inhibition of striatal principal neurons. *Mol Cell Neurosci*, 35(2), 302-310. doi: 10.1016/j.mcn.2007.03.005
- Clarke, J. R., Rossato, J. I., Monteiro, S., Bevilaqua, L. R., Izquierdo, I., & Cammarota, M. (2008). Posttraining activation of CB1 cannabinoid receptors in the CA1 region of the dorsal hippocampus impairs object recognition long-term memory. *Neurobiol Learn Mem*, 90(2), 374-381. doi: 10.1016/j.nlm.2008.04.009
- Cleland, J. G., Ghosh, J., Freemantle, N., Kaye, G. C., Nasir, M., Clark, A. L., & Coletta, A. P. (2004). Clinical trials update and cumulative meta-analyses from the American College of Cardiology: WATCH, SCD-HeFT, DINAMIT, CASINO, INSPIRE, STRATUS-US, RIO-Lipids and cardiac resynchronisation therapy in heart failure. *Eur J Heart Fail*, 6(4), 501-508. doi: 10.1016/j.ejheart.2004.04.014
- Coffey, S. F., Saladin, M. E., Drobos, D. J., Brady, K. T., Dansky, B. S., & Kilpatrick, D. G. (2002). Trauma and substance cue reactivity in individuals with comorbid posttraumatic stress disorder and cocaine or alcohol dependence. *Drug Alcohol Depend*, 65(2), 115-127. doi: 10.1016/s0376-8716(01)00157-0
- Cohen, S., Evans, G. W., Stokols, D., & Krantz, D. S. (2013). *Behavior, health, and environmental stress*: Springer Science & Business Media.
- Comings, D. E., Muhleman, D., Gade, R., Johnson, P., Verde, R., Saucier, G., & MacMurray, J. (1997). Cannabinoid receptor gene (CNR1): association with i.v. drug use. *Mol Psychiatry*, 2(2), 161-168. doi: 10.1038/sj.mp.4000247
- Conn, P. J., & Pin, J. P. (1997). Pharmacology and functions of metabotropic glutamate receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 37, 205-237. doi: 10.1146/annurev.pharmtox.37.1.205

- Conrad, K. L., McCutcheon, J. E., Cotterly, L. M., Ford, K. A., Beales, M., & Marinelli, M. (2010). Persistent increases in cocaine-seeking behavior after acute exposure to cold swim stress. *Biol Psychiatry*, *68*(3), 303-305. doi: 10.1016/j.biopsych.2010.03.030
- Conway, K. P., Swendsen, J. D., Rounsaville, B. J., & Merikangas, K. R. (2002). Personality, drug of choice, and comorbid psychopathology among substance abusers. *Drug Alcohol Depend*, *65*(3), 225-234. doi: 10.1016/s0376-8716(01)00168-5
- Cools, R., Sheridan, M., Jacobs, E., & D'Esposito, M. (2007). Impulsive personality predicts dopamine-dependent changes in frontostriatal activity during component processes of working memory. *J Neurosci*, *27*(20), 5506-5514. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0601-07.2007
- Coplan, J. D., Mathew, S. J., Smith, E. L., Trost, R. C., Scharf, B. A., Martinez, J., . . . Rosenblum, L. A. (2001). Effects of LY354740, a novel glutamatergic metabotropic agonist, on nonhuman primate hypothalamic-pituitary-adrenal axis and noradrenergic function. *CNS Spectr*, *6*(7), 607-612, 617. doi: 10.1017/s1092852900002157
- Corbit, L. H., & Balleine, B. W. (2011). The general and outcome-specific forms of Pavlovian-instrumental transfer are differentially mediated by the nucleus accumbens core and shell. *J Neurosci*, *31*(33), 11786-11794. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2711-11.2011
- Corbit, L. H., Muir, J. L., & Balleine, B. W. (2001). The role of the nucleus accumbens in instrumental conditioning: Evidence of a functional dissociation between accumbens core and shell. *J Neurosci*, *21*(9), 3251-3260.
- Cornish, J. L., & Kalivas, P. W. (2000). Glutamate transmission in the nucleus accumbens mediates relapse in cocaine addiction. *J Neurosci*, *20*(15), RC89.
- 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*(1), 61-65. doi: 10.1016/s0166-4328(00)00311-9
- Cota, D. (2008). The role of the endocannabinoid system in the regulation of hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity. *J Neuroendocrinol*, *20 Suppl 1*, 35-38. doi: 10.1111/j.1365-2826.2008.01673.x
- Crabbe, J. C. (2002). Genetic contributions to addiction. *Annu Rev Psychol*, *53*, 435-462. doi: 10.1146/annurev.psych.53.100901.135142
- Creed, M., Ntamati, N. R., Chandra, R., Lobo, M. K., & Luscher, C. (2016). Convergence of Reinforcing and Anhedonic Cocaine Effects in the Ventral Pallidum. *Neuron*, *92*(1), 214-226. doi: 10.1016/j.neuron.2016.09.001
- Cristino, L., de Petrocellis, L., Pryce, G., Baker, D., Guglielmotti, V., & Di Marzo, V. (2006). Immunohistochemical localization of cannabinoid type 1 and vanilloid transient receptor potential vanilloid type 1 receptors in the mouse brain. *Neuroscience*, *139*(4), 1405-1415. doi: 10.1016/j.neuroscience.2006.02.074
- Crombag, H. S., Bossert, J. M., Koya, E., & Shaham, Y. (2008). Review. Context-induced relapse to drug seeking: a review. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, *363*(1507), 3233-3243. doi: 10.1098/rstb.2008.0090
- Crombag, H. S., & Shaham, Y. (2002). Renewal of drug seeking by contextual cues after prolonged extinction in rats. *Behav Neurosci*, *116*(1), 169-173. doi: 10.1037//0735-7044.116.1.169
- Chambers, A. P., Sharkey, K. A., & Koopmans, H. S. (2004). Cannabinoid (CB)1 receptor antagonist, AM 251, causes a sustained reduction of daily food intake in the rat. *Physiol Behav*, *82*(5), 863-869. doi: 10.1016/j.physbeh.2004.07.004
- 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 (Berl)*, *135*(4), 324-332. doi: 10.1007/s002130050518
- Chavez, A. E., Chiu, C. Q., & Castillo, P. E. (2010). TRPV1 activation by endogenous anandamide triggers postsynaptic long-term depression in dentate gyrus. *Nat Neurosci*, *13*(12), 1511-1518. doi: 10.1038/nn.2684
- Cheer, J. F., Kendall, D. A., & Marsden, C. A. (2000). Cannabinoid receptors and reward in the rat: a conditioned place preference study. *Psychopharmacology (Berl)*, *151*(1), 25-30. doi: 10.1007/s002130000481

- Cheer, J. F., Wassum, K. M., Sombers, L. A., Heien, M. L., Ariansen, J. L., Aragona, B. J., . . . Wightman, R. M. (2007). Phasic dopamine release evoked by abused substances requires cannabinoid receptor activation. *J Neurosci*, *27*(4), 791-795. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4152-06.2007
- Chefer, V. I., Thompson, A. C., Zapata, A., & Shippenberg, T. S. (2009). Overview of brain microdialysis. *Curr Protoc Neurosci*, Chapter 7, Unit 7 1. doi: 10.1002/0471142301.ns0701s47
- Chen, B. T., Hopf, F. W., & Bonci, A. (2010). Synaptic plasticity in the mesolimbic system: therapeutic implications for substance abuse. *Ann N Y Acad Sci*, *1187*, 129-139. doi: 10.1111/j.1749-6632.2009.05154.x
- Cherif, H., Argaw, A., Cecyre, B., Bouchard, A., Gagnon, J., Javadi, P., . . . Bouchard, J. F. (2015). Role of GPR55 during Axon Growth and Target Innervation. *eNeuro*, *2*(5). doi: 10.1523/ENEURO.0011-15.2015
- Chevaleyre, V., & Castillo, P. E. (2003). Heterosynaptic LTD of hippocampal GABAergic synapses: a novel role of endocannabinoids in regulating excitability. *Neuron*, *38*(3), 461-472. doi: 10.1016/s0896-6273(03)00235-6
- Chevaleyre, V., Takahashi, K. A., & Castillo, P. E. (2006). Endocannabinoid-mediated synaptic plasticity in the CNS. *Annu Rev Neurosci*, *29*, 37-76. doi: 10.1146/annurev.neuro.29.051605.112834
- Chiamulera, C. (2005). Cue reactivity in nicotine and tobacco dependence: a "multiple-action" model of nicotine as a primary reinforcement and as an enhancer of the effects of smoking-associated stimuli. *Brain Res Brain Res Rev*, *48*(1), 74-97. doi: 10.1016/j.brainresrev.2004.08.005
- Childress, A. R., Mozley, P. D., McElgin, W., Fitzgerald, J., Reivich, M., & O'Brien, C. P. (1999). Limbic activation during cue-induced cocaine craving. *Am J Psychiatry*, *156*(1), 11-18. doi: 10.1176/ajp.156.1.11
- Chorvat, R. J., Berbaum, J., Seriacki, K., & McElroy, J. F. (2012). JD-5006 and JD-5037: peripherally restricted (PR) cannabinoid-1 receptor blockers related to SLV-319 (Ibipinabant) as metabolic disorder therapeutics devoid of CNS liabilities. *Bioorg Med Chem Lett*, *22*(19), 6173-6180. doi: 10.1016/j.bmcl.2012.08.004
- Christakou, A., Robbins, T. W., & Everitt, B. J. (2004). Prefrontal cortical-ventral striatal interactions involved in affective modulation of attentional performance: implications for corticostriatal circuit function. *J Neurosci*, *24*(4), 773-780. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0949-03.2004
- Christensen, R., Kristensen, P. K., Bartels, E. M., Bliddal, H., & Astrup, A. (2007). Efficacy and safety of the weight-loss drug rimonabant: a meta-analysis of randomised trials. *Lancet*, *370*(9600), 1706-1713. doi: 10.1016/S0140-6736(07)61721-8
- Chrousos, G. P., & Gold, P. W. (1992). The concepts of stress and stress system disorders. Overview of physical and behavioral homeostasis. *JAMA*, *267*(9), 1244-1252.
- Churchill, L., Swanson, C. J., Urbina, M., & Kalivas, P. W. (1999). Repeated cocaine alters glutamate receptor subunit levels in the nucleus accumbens and ventral tegmental area of rats that develop behavioral sensitization. *J Neurochem*, *72*(6), 2397-2403. doi: 10.1046/j.1471-4159.1999.0722397.x
- D'Ascenzo, M., Fellin, T., Terunuma, M., Revilla-Sanchez, R., Meaney, D. F., Auberson, Y. P., . . . Haydon, P. G. (2007). mGluR5 stimulates gliotransmission in the nucleus accumbens. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *104*(6), 1995-2000. doi: 10.1073/pnas.0609408104
- D'Souza, M. S. (2015). Glutamatergic transmission in drug reward: implications for drug addiction. *Front Neurosci*, *9*, 404. doi: 10.3389/fnins.2015.00404
- Dackis, C. A., Kampman, K. M., Lynch, K. G., Pettinati, H. M., & O'Brien, C. P. (2005). A double-blind, placebo-controlled trial of modafinil for cocaine dependence. *Neuropsychopharmacology*, *30*(1), 205-211. doi: 10.1038/sj.npp.1300600
- Danbolt, N. C. (2001). Glutamate uptake. *Prog Neurobiol*, *65*(1), 1-105. doi: 10.1016/s0301-0082(00)00067-8
- Dayas, C. V., Buller, K. M., Crane, J. W., Xu, Y., & Day, T. A. (2001). Stressor categorization: acute physical and psychological stressors elicit distinctive recruitment patterns in the amygdala and in medullary noradrenergic cell groups. *Eur J Neurosci*, *14*(7), 1143-1152. doi: 10.1046/j.0953-816x.2001.01733.x
- Daza-Losada, M., Minarro, J., Aguilar, M. A., Valverde, O., & Rodriguez-Arias, M. (2011). Acute blockade of CB1 receptor leads to reinstatement of MDMA-induced conditioned place preference. *Pharmacol Biochem Behav*, *100*(1), 33-39. doi: 10.1016/j.pbb.2011.07.011

- De Giovanni, L. N., Guzman, A. S., Virgolini, M. B., & Cancela, L. M. (2016). NMDA antagonist MK 801 in nucleus accumbens core but not shell disrupts the restraint stress-induced reinstatement of extinguished cocaine-conditioned place preference in rats. *Behav Brain Res*, *315*, 150-159. doi: 10.1016/j.bbr.2016.08.011
- de Lange, E. C. M. (2013). Recovery and Calibration Techniques: Toward Quantitative Microdialysis. In M. M. (Ed.), *Microdialysis in Drug Development* (Vol. 4, pp. 13-33). New York: Springer.
- De Luca, M. A., Bimpisidis, Z., Melis, M., Marti, M., Caboni, P., Valentini, V., . . . Di Chiara, G. (2015). Stimulation of in vivo dopamine transmission and intravenous self-administration in rats and mice by JWH-018, a Spice cannabinoid. *Neuropharmacology*, *99*, 705-714. doi: 10.1016/j.neuropharm.2015.08.041
- De Luca, M. A., Valentini, V., Bimpisidis, Z., Cacciapaglia, F., Caboni, P., & Di Chiara, G. (2014). Endocannabinoid 2-Arachidonoylglycerol Self-Administration by Sprague-Dawley Rats and Stimulation of in vivo Dopamine Transmission in the Nucleus Accumbens Shell. *Front Psychiatry*, *5*, 140. doi: 10.3389/fpsy.2014.00140
- de Olmos, J. S., & Heimer, L. (1999). The concepts of the ventral striatopallidal system and extended amygdala. *Ann N Y Acad Sci*, *877*, 1-32. doi: 10.1111/j.1749-6632.1999.tb09258.x
- De Vries, T. J., Homberg, J. R., Binnekade, R., Raaso, H., & Schoffelmeer, A. N. M. (2003). Cannabinoid modulation of the reinforcing and motivational properties of heroin and heroin-associated cues in rats. *Psychopharmacology (Berl)*, *168*(1-2), 164-169. doi: 10.1007/s00213-003-1422-1
- De Vries, T. J., & Schoffelmeer, A. N. (2005). Cannabinoid CB1 receptors control conditioned drug seeking. *Trends Pharmacol Sci*, *26*(8), 420-426. doi: 10.1016/j.tips.2005.06.002
- De Vries, T. J., Shaham, Y., Homberg, J. R., Crombag, H., Schuurman, K., Dieben, J., . . . Schoffelmeer, A. N. (2001). A cannabinoid mechanism in relapse to cocaine seeking. *Nat Med*, *7*(10), 1151-1154. doi: 10.1038/nm1001-1151
- De Vry, J., Schreiber, R., Eckel, G., & Jentsch, K. R. (2004). Behavioral mechanisms underlying inhibition of food-maintained responding by the cannabinoid receptor antagonist/inverse agonist SR141716A. *Eur J Pharmacol*, *483*(1), 55-63. doi: 10.1016/j.ejphar.2003.10.012
- de Wit, H., & Stewart, J. (1981). Reinstatement of cocaine-reinforced responding in the rat. *Psychopharmacology (Berl)*, *75*(2), 134-143. doi: 10.1007/BF00432175
- Deak, T., Bordner, K. A., McElderry, N. K., Barnum, C. J., Blandino, P., Jr., Deak, M. M., & Tammariello, S. P. (2005). Stress-induced increases in hypothalamic IL-1: a systematic analysis of multiple stressor paradigms. *Brain Res Bull*, *64*(6), 541-556. doi: 10.1016/j.brainresbull.2004.11.003
- Demuth, D. G., & Molleman, A. (2006). Cannabinoid signalling. *Life Sci*, *78*(6), 549-563. doi: 10.1016/j.lfs.2005.05.055
- Deroche, M. A., Lassalle, O., Castell, L., Valjent, E., & Manzoni, O. J. (2020). Cell-Type- and Endocannabinoid-Specific Synapse Connectivity in the Adult Nucleus Accumbens Core. *J Neurosci*, *40*(5), 1028-1041. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1100-19.2019
- Deutch, A. Y., Lee, M. C., Gillham, M. H., Cameron, D. A., Goldstein, M., & Iadarola, M. J. (1991). Stress selectively increases fos protein in dopamine neurons innervating the prefrontal cortex. *Cereb Cortex*, *1*(4), 273-292. doi: 10.1093/cercor/1.4.273
- Deutch, A. Y., & Roth, R. H. (1990). The determinants of stress-induced activation of the prefrontal cortical dopamine system. *Prog Brain Res*, *85*, 367-402; discussion 402-363. doi: 10.1016/s0079-6123(08)62691-6
- Devane, W. A., Dysarz, F. A., 3rd, Johnson, M. R., Melvin, L. S., & Howlett, A. C. (1988). Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. *Mol Pharmacol*, *34*(5), 605-613.
- Devane, W. A., Hanus, L., Breuer, A., Pertwee, R. G., Stevenson, L. A., Griffin, G., . . . Mechoulam, R. (1992). Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science*, *258*(5090), 1946-1949. doi: 10.1126/science.1470919
- Dewart, T., Frank, B., & Schmeidler, J. (2006). The impact of 9/11 on patients in New York City's substance abuse treatment programs. *Am J Drug Alcohol Abuse*, *32*(4), 665-672. doi: 10.1080/00952990600919435
- Di Ciano, P., Blaha, C. D., & Phillips, A. G. (1996). Changes in dopamine oxidation currents in the nucleus accumbens during unlimited-access self-administration of d-amphetamine by rats. *Behav Pharmacol*, *7*(7), 714-729. doi: 10.1097/00008877-199611000-00016

- Di Ciano, P., & Everitt, B. J. (2001). Dissociable effects of antagonism of NMDA and AMPA/KA receptors in the nucleus accumbens core and shell on cocaine-seeking behavior. *Neuropsychopharmacology*, 25(3), 341-360. doi: 10.1016/S0893-133X(01)00235-4
- Di Ciano, P., & Everitt, B. J. (2003). Differential control over drug-seeking behavior by drug-associated conditioned reinforcers and discriminative stimuli predictive of drug availability. *Behav Neurosci*, 117(5), 952-960. doi: 10.1037/0735-7044.117.5.952
- Di Ciano, P., Robbins, T. W., & Everitt, B. J. (2008). Differential effects of nucleus accumbens core, shell, or dorsal striatal inactivations on the persistence, reacquisition, or reinstatement of responding for a drug-paired conditioned reinforcer. *Neuropsychopharmacology*, 33(6), 1413-1425. doi: 10.1038/sj.npp.1301522
- Di Chiara, G. (2002). Nucleus accumbens shell and core dopamine: differential role in behavior and addiction. *Behav Brain Res*, 137(1-2), 75-114. doi: 10.1016/s0166-4328(02)00286-3
- 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(14), 5274-5278. doi: 10.1073/pnas.85.14.5274
- Di Chiara, G., Tanda, G., Frau, R., & Carboni, E. (1993). On the preferential release of dopamine in the nucleus accumbens by amphetamine: further evidence obtained by vertically implanted concentric dialysis probes. *Psychopharmacology (Berl)*, 112(2-3), 398-402. doi: 10.1007/bf02244939
- Di, S., Itoga, C. A., Fisher, M. O., Solomonow, J., Roltsch, E. A., Gilpin, N. W., & Tasker, J. G. (2016). Acute Stress Suppresses Synaptic Inhibition and Increases Anxiety via Endocannabinoid Release in the Basolateral Amygdala. *J Neurosci*, 36(32), 8461-8470. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2279-15.2016
- Diana, M. A., & Marty, A. (2004). Endocannabinoid-mediated short-term synaptic plasticity: depolarization-induced suppression of inhibition (DSI) and depolarization-induced suppression of excitation (DSE). *Br J Pharmacol*, 142(1), 9-19. doi: 10.1038/sj.bjp.0705726
- DiPatrizio, N. V., Astarita, G., Schwartz, G., Li, X., & Piomelli, D. (2011). Endocannabinoid signal in the gut controls dietary fat intake. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108(31), 12904-12908. doi: 10.1073/pnas.1104675108
- Donzanti, B. A., & Yamamoto, B. K. (1988). An improved and rapid HPLC-EC method for the isocratic separation of amino acid neurotransmitters from brain tissue and microdialysis perfusates. *Life Sci*, 43(11), 913-922. doi: 10.1016/0024-3205(88)90267-6
- Drummond, D. C. (2000). What does cue-reactivity have to offer clinical research? *Addiction*, 95 Suppl 2, S129-144. doi: 10.1080/09652140050111708
- Duailibi, M. S., Cordeiro, Q., Brietzke, E., Ribeiro, M., LaRowe, S., Berk, M., & Trevizol, A. P. (2017). N-acetylcysteine in the treatment of craving in substance use disorders: Systematic review and meta-analysis. *Am J Addict*, 26(7), 660-666. doi: 10.1111/ajad.12620
- Duncan, E., Boshoven, W., Harenski, K., Fiallos, A., Tracy, H., Jovanovic, T., . . . Kilts, C. (2007). An fMRI study of the interaction of stress and cocaine cues on cocaine craving in cocaine-dependent men. *Am J Addict*, 16(3), 174-182. doi: 10.1080/10550490701375285
- Dunn, A. J. (1988). Stress-related activation of cerebral dopaminergic systems. *Ann N Y Acad Sci*, 537, 188-205. doi: 10.1111/j.1749-6632.1988.tb42106.x
- Egertova, M., Cravatt, B. F., & Elphick, M. R. (2003). Comparative analysis of fatty acid amide hydrolase and cb(1) cannabinoid receptor expression in the mouse brain: evidence of a widespread role for fatty acid amide hydrolase in regulation of endocannabinoid signaling. *Neuroscience*, 119(2), 481-496. doi: 10.1016/s0306-4522(03)00145-3
- Epstein, D. H., & Preston, K. L. (2003). The reinstatement model and relapse prevention: a clinical perspective. *Psychopharmacology (Berl)*, 168(1-2), 31-41. doi: 10.1007/s00213-003-1470-6
- Erb, S., Salmaso, N., Rodaros, D., & Stewart, J. (2001). A role for the CRF-containing pathway from central nucleus of the amygdala to bed nucleus of the stria terminalis in the stress-induced reinstatement of cocaine seeking in rats. *Psychopharmacology (Berl)*, 158(4), 360-365. doi: 10.1007/s002130000642
- Erb, S., Shaham, Y., & Stewart, J. (1996). Stress reinstates cocaine-seeking behavior after prolonged extinction and a drug-free period. *Psychopharmacology (Berl)*, 128(4), 408-412. doi: 10.1007/s002130050150

- Erb, S., Shaham, Y., & Stewart, J. (1998). The role of corticotropin-releasing factor and corticosterone in stress- and cocaine-induced relapse to cocaine seeking in rats. *J Neurosci*, *18*(14), 5529-5536.
- Esparza, M. A., Bollati, F., Garcia-Keller, C., Virgolini, M. B., Lopez, L. M., Brusco, A., . . . Cancela, L. M. (2012). Stress-induced sensitization to cocaine: actin cytoskeleton remodeling within mesocorticolimbic nuclei. *Eur J Neurosci*, *36*(8), 3103-3117. doi: 10.1111/j.1460-9568.2012.08239.x
- Everitt, B. J., Dickinson, A., & Robbins, T. W. (2001). The neuropsychological basis of addictive behaviour. *Brain Res Brain Res Rev*, *36*(2-3), 129-138. doi: 10.1016/s0165-0173(01)00088-1
- Fagerstrom, K., & Balfour, D. J. (2006). Neuropharmacology and potential efficacy of new treatments for tobacco dependence. *Expert Opin Investig Drugs*, *15*(2), 107-116. doi: 10.1517/13543784.15.2.107
- 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 (Berl)*, *156*(4), 410-416. doi: 10.1007/s002130100734
- Fattore, L., Spano, M., Melis, V., Fadda, P., & Fratta, W. (2011). Differential effect of opioid and cannabinoid receptor blockade on heroin-seeking reinstatement and cannabinoid substitution in heroin-abstinent rats. *Br J Pharmacol*, *163*(7), 1550-1562. doi: 10.1111/j.1476-5381.2011.01459.x
- Fattore, L., Spano, M. S., Deiana, S., Melis, V., Cossu, G., Fadda, P., & Fratta, W. (2007). An endocannabinoid mechanism in relapse to drug seeking: a review of animal studies and clinical perspectives. *Brain Res Rev*, *53*(1), 1-16. doi: 10.1016/j.brainresrev.2006.05.003
- Feltenstein, M. W., & See, R. E. (2006). Potentiation of cue-induced reinstatement of cocaine-seeking in rats by the anxiogenic drug yohimbine. *Behav Brain Res*, *174*(1), 1-8. doi: 10.1016/j.bbr.2006.06.039
- Ferraguti, F., & Shigemoto, R. (2006). Metabotropic glutamate receptors. *Cell Tissue Res*, *326*(2), 483-504. doi: 10.1007/s00441-006-0266-5
- Filip, M., Golda, A., Zaniowska, M., McCreary, A. C., Nowak, E., Kolasiewicz, W., & Przegalinski, E. (2006). Involvement of cannabinoid CB1 receptors in drug addiction: effects of rimonabant on behavioral responses induced by cocaine. *Pharmacol Rep*, *58*(6), 806-819.
- Fioravanti, B., De Felice, M., Stucky, C. L., Medler, K. A., Luo, M. C., Gardell, L. R., . . . Vanderah, T. W. (2008). Constitutive activity at the cannabinoid CB1 receptor is required for behavioral response to noxious chemical stimulation of TRPV1: antinociceptive actions of CB1 inverse agonists. *J Neurosci*, *28*(45), 11593-11602. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3322-08.2008
- Fischer-Smith, K. D., Houston, A. C., & Rebec, G. V. (2012). Differential effects of cocaine access and withdrawal on glutamate type 1 transporter expression in rat nucleus accumbens core and shell. *Neuroscience*, *210*, 333-339. doi: 10.1016/j.neuroscience.2012.02.049
- Fischer, K. D., Houston, A. C., & Rebec, G. V. (2013). Role of the major glutamate transporter GLT1 in nucleus accumbens core versus shell in cue-induced cocaine-seeking behavior. *J Neurosci*, *33*(22), 9319-9327. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3278-12.2013
- Floresco, S. B. (2015). The nucleus accumbens: an interface between cognition, emotion, and action. *Annu Rev Psychol*, *66*, 25-52. doi: 10.1146/annurev-psych-010213-115159
- Floresco, S. B., Braaksmá, D. N., & Phillips, A. G. (1999). Thalamic-cortical-striatal circuitry subserves working memory during delayed responding on a radial arm maze. *J Neurosci*, *19*(24), 11061-11071.
- Foltin, R. W., & Haney, M. (2000). Conditioned effects of environmental stimuli paired with smoked cocaine in humans. *Psychopharmacology (Berl)*, *149*(1), 24-33. doi: 10.1007/s002139900340
- 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*(31), 6939-6945. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0671-04.2004
- Fox, H. C., Taliq, M., Malison, R., Anderson, G. M., Kreek, M. J., & Sinha, R. (2005). Frequency of recent cocaine and alcohol use affects drug craving and associated responses to stress and drug-related cues. *Psychoneuroendocrinology*, *30*(9), 880-891. doi: 10.1016/j.psyneuen.2005.05.002
- Freund, T. F., Katona, I., & Piomelli, D. (2003). Role of endogenous cannabinoids in synaptic signaling. *Physiol Rev*, *83*(3), 1017-1066. doi: 10.1152/physrev.00004.2003

- Fuchs, R. A., Eaddy, J. L., Su, Z. I., & Bell, G. H. (2007). Interactions of the basolateral amygdala with the dorsal hippocampus and dorsomedial prefrontal cortex regulate drug context-induced reinstatement of cocaine-seeking in rats. *Eur J Neurosci*, *26*(2), 487-498. doi: 10.1111/j.1460-9568.2007.05674.x
- 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*(2), 296-309. doi: 10.1038/sj.npp.1300579
- Fuchs, R. A., Evans, K. A., Parker, M. C., & See, R. E. (2004). Differential involvement of the core and shell subregions of the nucleus accumbens in conditioned cue-induced reinstatement of cocaine seeking in rats. *Psychopharmacology (Berl)*, *176*(3-4), 459-465. doi: 10.1007/s00213-004-1895-6
- Fuchs, R. A., Ramirez, D. R., & Bell, G. H. (2008). Nucleus accumbens shell and core involvement in drug context-induced reinstatement of cocaine seeking in rats. *Psychopharmacology (Berl)*, *200*(4), 545-556. doi: 10.1007/s00213-008-1234-4
- Funk, D., Li, Z., & Le, A. D. (2006). Effects of environmental and pharmacological stressors on c-fos and corticotropin-releasing factor mRNA in rat brain: Relationship to the reinstatement of alcohol seeking. *Neuroscience*, *138*(1), 235-243. doi: 10.1016/j.neuroscience.2005.10.062
- Gamaledin, I., Wertheim, C., Zhu, A. Z., Coen, K. M., Vemuri, K., Makryannis, A., . . . Le Foll, B. (2012). Cannabinoid receptor stimulation increases motivation for nicotine and nicotine seeking. *Addict Biol*, *17*(1), 47-61. doi: 10.1111/j.1369-1600.2011.00314.x
- Gaoni, Y., & Mechoulam, R. (1964). Isolation, Structure, and Partial Synthesis of an Active Constituent of Hashish. *Journal of the American Chemical Society*, *86*(8), 1646-1647. doi: 10.1021/ja01062a046
- Garcia-Keller, C., Kupchik, Y. M., Gipson, C. D., Brown, R. M., Spencer, S., Bollati, F., . . . Kalivas, P. W. (2016). Glutamatergic mechanisms of comorbidity between acute stress and cocaine self-administration. *Mol Psychiatry*, *21*(8), 1063-1069. doi: 10.1038/mp.2015.151
- Garcia-Keller, C., Martinez, S. A., Esparza, M. A., Bollati, F., Kalivas, P. W., & Cancela, L. M. (2013). Cross-sensitization between cocaine and acute restraint stress is associated with sensitized dopamine but not glutamate release in the nucleus accumbens. *Eur J Neurosci*, *37*(6), 982-995. doi: 10.1111/ejn.12121
- Garcia-Keller, C., Smiley, C., Monforton, C., Melton, S., Kalivas, P. W., & Gass, J. (2020). N-Acetylcysteine treatment during acute stress prevents stress-induced augmentation of addictive drug use and relapse. *Addict Biol*, *25*(5), e12798. doi: 10.1111/adb.12798
- Gass, J. T., Osborne, M. P., Watson, N. L., Brown, J. L., & Olive, M. F. (2009). mGluR5 antagonism attenuates methamphetamine reinforcement and prevents reinstatement of methamphetamine-seeking behavior in rats. *Neuropsychopharmacology*, *34*(4), 820-833. doi: 10.1038/npp.2008.140
- Gerdeman, G. L., Ronesi, J., & Lovinger, D. M. (2002). Postsynaptic endocannabinoid release is critical to long-term depression in the striatum. *Nat Neurosci*, *5*(5), 446-451. doi: 10.1038/nn832
- Gerdeman, G. L., Schechter, J. B., & French, E. D. (2008). Context-specific reversal of cocaine sensitization by the CB1 cannabinoid receptor antagonist rimonabant. *Neuropsychopharmacology*, *33*(11), 2747-2759. doi: 10.1038/sj.npp.1301648
- Gerfen, C. R., Engber, T. M., Mahan, L. C., Susel, Z., Chase, T. N., Monsma, F. J., Jr., & Sibley, D. R. (1990). D1 and D2 dopamine receptor-regulated gene expression of striatonigral and striatopallidal neurons. *Science*, *250*(4986), 1429-1432. doi: 10.1126/science.2147780
- Gerfen, C. R., & Surmeier, D. J. (2011). Modulation of striatal projection systems by dopamine. *Annu Rev Neurosci*, *34*, 441-466. doi: 10.1146/annurev-neuro-061010-113641
- Ghi, P., Ferretti, C., & Blengio, M. (1995). Effects of different types of stress on histamine-H3 receptors in the rat cortex. *Brain Res*, *690*(1), 104-107. doi: 10.1016/0006-8993(95)00542-x
- Ghitza, U. E., Fabbicatore, A. T., Prokopenko, V., Pawlak, A. P., & West, M. O. (2003). Persistent cue-evoked activity of accumbens neurons after prolonged abstinence from self-administered cocaine. *J Neurosci*, *23*(19), 7239-7245.
- Gibson, H. E., Edwards, J. G., Page, R. S., Van Hook, M. J., & Kauer, J. A. (2008). TRPV1 channels mediate long-term depression at synapses on hippocampal interneurons. *Neuron*, *57*(5), 746-759. doi: 10.1016/j.neuron.2007.12.027

- Gilad, G. M., Gilad, V. H., Wyatt, R. J., & Tizabi, Y. (1990). Region-selective stress-induced increase of glutamate uptake and release in rat forebrain. *Brain Res*, *525*(2), 335-338. doi: 10.1016/0006-8993(90)90886-g
- Gipson, C. D., Kupchik, Y. M., Shen, H., Reissner, K. J., Thomas, C. A., & Kalivas, P. W. (2013). Relapse induced by cues predicting cocaine depends on rapid, transient synaptic potentiation. *Neuron*, *77*(5), 867-872. doi: 10.1016/j.neuron.2013.01.005
- Gipson, C. D., Reissner, K. J., Kupchik, Y. M., Smith, A. C., Stankeviciute, N., Hensley-Simon, M. E., & Kalivas, P. W. (2013). Reinstatement of nicotine seeking is mediated by glutamatergic plasticity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *110*(22), 9124-9129. doi: 10.1073/pnas.1220591110
- Glaser, S. T., Kaczocha, M., & Deutsch, D. G. (2005). Anandamide transport: a critical review. *Life Sci*, *77*(14), 1584-1604. doi: 10.1016/j.lfs.2005.05.007
- Gnegy, M. E. (2000). Ca²⁺/calmodulin signaling in NMDA-induced synaptic plasticity. *Crit Rev Neurobiol*, *14*(2), 91-129.
- Gomez, R., Navarro, M., Ferrer, B., Trigo, J. M., Bilbao, A., Del Arco, I., . . . Rodriguez de Fonseca, F. (2002). A peripheral mechanism for CB1 cannabinoid receptor-dependent modulation of feeding. *J Neurosci*, *22*(21), 9612-9617.
- Gonzalez, S., Cascio, M. G., Fernandez-Ruiz, J., Fezza, F., Di Marzo, V., & Ramos, J. A. (2002). Changes in endocannabinoid contents in the brain of rats chronically exposed to nicotine, ethanol or cocaine. *Brain Res*, *954*(1), 73-81. doi: 10.1016/s0006-8993(02)03344-9
- Gorzalka, B. B., Hill, M. N., & Hillard, C. J. (2008). Regulation of endocannabinoid signaling by stress: implications for stress-related affective disorders. *Neurosci Biobehav Rev*, *32*(6), 1152-1160. doi: 10.1016/j.neubiorev.2008.03.004
- Goto, Y., & Grace, A. A. (2008). Limbic and cortical information processing in the nucleus accumbens. *Trends Neurosci*, *31*(11), 552-558. doi: 10.1016/j.tins.2008.08.002
- Graf, E. N., Wheeler, R. A., Baker, D. A., Ebben, A. L., Hill, J. E., McReynolds, J. R., . . . Gasser, P. J. (2013). Corticosterone acts in the nucleus accumbens to enhance dopamine signaling and potentiate reinstatement of cocaine seeking. *J Neurosci*, *33*(29), 11800-11810. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1969-13.2013
- Grant, B. F., Stinson, F. S., Dawson, D. A., Chou, S. P., Dufour, M. C., Compton, W., . . . Kaplan, K. (2004). Prevalence and co-occurrence of substance use disorders and independent mood and anxiety disorders: results from the National Epidemiologic Survey on Alcohol and Related Conditions. *Arch Gen Psychiatry*, *61*(8), 807-816. doi: 10.1001/archpsyc.61.8.807
- GraphPad. (Estados Unidos). Prism (Version 8). La Jolla, CA. Retrieved from <https://www.graphpad.com/>
- Gresch, P. J., Sved, A. F., Zigmond, M. J., & Finlay, J. M. (1994). Stress-induced sensitization of dopamine and norepinephrine efflux in medial prefrontal cortex of the rat. *J Neurochem*, *63*(2), 575-583. doi: 10.1046/j.1471-4159.1994.63020575.x
- Grimm, J. W., Shaham, Y., & Hope, B. T. (2002). Effect of cocaine and sucrose withdrawal period on extinction behavior, cue-induced reinstatement, and protein levels of the dopamine transporter and tyrosine hydroxylase in limbic and cortical areas in rats. *Behav Pharmacol*, *13*(5-6), 379-388. doi: 10.1097/00008877-200209000-00011
- Groenewegen, H. J., & Trimble, M. (2007). The ventral striatum as an interface between the limbic and motor systems. *CNS Spectr*, *12*(12), 887-892. doi: 10.1017/s1092852900015650
- Groenewegen, H. J., Wright, C. I., & Beijer, A. V. (1996). The nucleus accumbens: gateway for limbic structures to reach the motor system? *Prog Brain Res*, *107*, 485-511. doi: 10.1016/s0079-6123(08)61883-x
- Grueter, B. A., Brasnjo, G., & Malenka, R. C. (2010). Postsynaptic TRPV1 triggers cell type-specific long-term depression in the nucleus accumbens. *Nat Neurosci*, *13*(12), 1519-1525. doi: 10.1038/nn.2685
- Hammad, A. M., Alasmari, F., Althobaiti, Y. S., & Sari, Y. (2017). Modulatory effects of Ampicillin/Sulbactam on glial glutamate transporters and metabotropic glutamate receptor 1 as well as reinstatement to cocaine-seeking behavior. *Behav Brain Res*, *332*, 288-298. doi: 10.1016/j.bbr.2017.06.017
- Han, W. Y., Du, P., Fu, S. Y., Wang, F., Song, M., Wu, C. F., & Yang, J. Y. (2014). Oxytocin via its receptor affects restraint stress-induced methamphetamine CPP reinstatement in mice: Involvement of

- the medial prefrontal cortex and dorsal hippocampus glutamatergic system. *Pharmacol Biochem Behav*, 119, 80-87. doi: 10.1016/j.pbb.2013.11.014
- Harris, R. T., Waters, W., & McLendon, D. (1974). Evaluation of reinforcing capability of delta-9-tetrahydrocannabinol in rhesus monkeys. *Psychopharmacologia*, 37(1), 23-29. doi: 10.1007/BF00426679
- Hart, C. L., Haney, M., Vosburg, S. K., Comer, S. D., & Foltin, R. W. (2005). Reinforcing effects of oral Delta9-THC in male marijuana smokers in a laboratory choice procedure. *Psychopharmacology (Berl)*, 181(2), 237-243. doi: 10.1007/s00213-005-2234-2
- Hart, C. L., Haney, M., Vosburg, S. K., Rubin, E., & Foltin, R. W. (2008). Smoked cocaine self-administration is decreased by modafinil. *Neuropsychopharmacology*, 33(4), 761-768. doi: 10.1038/sj.npp.1301472
- Heifets, B. D., & Castillo, P. E. (2009). Endocannabinoid signaling and long-term synaptic plasticity. *Annu Rev Physiol*, 71, 283-306. doi: 10.1146/annurev.physiol.010908.163149
- Heimer, L., Alheid, G. F., de Olmos, J. S., Groenewegen, H. J., Haber, S. N., Harlan, R. E., & Zahm, D. S. (1997). The accumbens: beyond the core-shell dichotomy. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci*, 9(3), 354-381. doi: 10.1176/jnp.9.3.354
- Heinsbroek, J. A., Neuhofer, D. N., Griffin, W. C., 3rd, Siegel, G. S., Bobadilla, A. C., Kupchik, Y. M., & Kalivas, P. W. (2017). Loss of Plasticity in the D2-Accumbens Pallidal Pathway Promotes Cocaine Seeking. *J Neurosci*, 37(4), 757-767. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2659-16.2016
- 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 (Berl)*, 133(1), 7-16. doi: 10.1007/s002130050365
- Hemby, S. E., Tang, W., Muly, E. C., Kuhar, M. J., Howell, L., & Mash, D. C. (2005). Cocaine-induced alterations in nucleus accumbens ionotropic glutamate receptor subunits in human and non-human primates. *J Neurochem*, 95(6), 1785-1793. doi: 10.1111/j.1471-4159.2005.03517.x
- Hendershot, C. S., Witkiewitz, K., George, W. H., & Marlatt, G. A. (2011). Relapse prevention for addictive behaviors. *Subst Abuse Treat Prev Policy*, 6, 17. doi: 10.1186/1747-597X-6-17
- 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(2), 563-583.
- Herkenham, M., Lynn, A. B., Little, M. D., Johnson, M. R., Melvin, L. S., de Costa, B. R., & Rice, K. C. (1990). Cannabinoid receptor localization in brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87(5), 1932-1936. doi: 10.1073/pnas.87.5.1932
- Herman, J. P., McKlveen, J. M., Ghosal, S., Kopp, B., Wulsin, A., Makinson, R., . . . Myers, B. (2016). Regulation of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenocortical Stress Response. *Compr Physiol*, 6(2), 603-621. doi: 10.1002/cphy.c150015
- Hernandez, L., & Hoebel, B. G. (1988). Food reward and cocaine increase extracellular dopamine in the nucleus accumbens as measured by microdialysis. *Life Sci*, 42(18), 1705-1712. doi: 10.1016/0024-3205(88)90036-7
- Herrick, C. J. (1926). Brains of rats and men.
- Highfield, D., Clements, A., Shalev, U., McDonald, R., Featherstone, R., Stewart, J., & Shaham, Y. (2000). Involvement of the medial septum in stress-induced relapse to heroin seeking in rats. *Eur J Neurosci*, 12(5), 1705-1713. doi: 10.1046/j.1460-9568.2000.00037.x
- Hikida, T., Kimura, K., Wada, N., Funabiki, K., & Nakanishi, S. (2010). Distinct roles of synaptic transmission in direct and indirect striatal pathways to reward and aversive behavior. *Neuron*, 66(6), 896-907. doi: 10.1016/j.neuron.2010.05.011
- Hikida, T., Morita, M., & Macpherson, T. (2016). Neural mechanisms of the nucleus accumbens circuit in reward and aversive learning. *Neurosci Res*, 108, 1-5. doi: 10.1016/j.neures.2016.01.004
- Hikida, T., Yawata, S., Yamaguchi, T., Danjo, T., Sasaoka, T., Wang, Y., & Nakanishi, S. (2013). Pathway-specific modulation of nucleus accumbens in reward and aversive behavior via selective transmitter receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110(1), 342-347. doi: 10.1073/pnas.1220358110

- Hill, M. N., Hillard, C. J., & McEwen, B. S. (2011). Alterations in corticolimbic dendritic morphology and emotional behavior in cannabinoid CB1 receptor-deficient mice parallel the effects of chronic stress. *Cereb Cortex*, *21*(9), 2056-2064. doi: 10.1093/cercor/bhq280
- Hill, M. N., & McEwen, B. S. (2010). Involvement of the endocannabinoid system in the neurobehavioural effects of stress and glucocorticoids. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, *34*(5), 791-797. doi: 10.1016/j.pnpbp.2009.11.001
- Hill, M. N., Miller, G. E., Carrier, E. J., Gorzalka, B. B., & Hillard, C. J. (2009). Circulating endocannabinoids and N-acyl ethanolamines are differentially regulated in major depression and following exposure to social stress. *Psychoneuroendocrinology*, *34*(8), 1257-1262. doi: 10.1016/j.psyneuen.2009.03.013
- Hillard, C. J. (2014). Stress regulates endocannabinoid-CB1 receptor signaling. *Semin Immunol*, *26*(5), 380-388. doi: 10.1016/j.smim.2014.04.001
- Hillard, C. J., Edgmond, W. S., Jarrahian, A., & Campbell, W. B. (1997). Accumulation of N-arachidonylethanolamine (anandamide) into cerebellar granule cells occurs via facilitated diffusion. *J Neurochem*, *69*(2), 631-638. doi: 10.1046/j.1471-4159.1997.69020631.x
- Hillard, C. J., Manna, S., Greenberg, M. J., DiCamelli, R., Ross, R. A., Stevenson, L. A., . . . Campbell, W. B. (1999). Synthesis and characterization of potent and selective agonists of the neuronal cannabinoid receptor (CB1). *J Pharmacol Exp Ther*, *289*(3), 1427-1433.
- Hocht, C., Opezzo, J. A., & Taira, C. A. (2007). Applicability of reverse microdialysis in pharmacological and toxicological studies. *J Pharmacol Toxicol Methods*, *55*(1), 3-15. doi: 10.1016/j.vascn.2006.02.007
- 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*(1), 72-83. doi: 10.1152/jn.2001.85.1.72
- Hollander, J. A., & Carelli, R. M. (2007). Cocaine-associated stimuli increase cocaine seeking and activate accumbens core neurons after abstinence. *J Neurosci*, *27*(13), 3535-3539. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3667-06.2007
- Hotsenpiller, G., Giorgetti, M., & Wolf, M. E. (2001). Alterations in behaviour and glutamate transmission following presentation of stimuli previously associated with cocaine exposure. *Eur J Neurosci*, *14*(11), 1843-1855. doi: 10.1046/j.0953-816x.2001.01804.x
- Howlett, A. C., Reggio, P. H., Childers, S. R., Hampson, R. E., Ulloa, N. M., & Deutsch, D. G. (2011). Endocannabinoid tone versus constitutive activity of cannabinoid receptors. *Br J Pharmacol*, *163*(7), 1329-1343. doi: 10.1111/j.1476-5381.2011.01364.x
- Hsieh, C., Brown, S., Derleth, C., & Mackie, K. (1999). Internalization and recycling of the CB1 cannabinoid receptor. *J Neurochem*, *73*(2), 493-501. doi: 10.1046/j.1471-4159.1999.0730493.x
- Hu, S. S., Liu, Y. W., & Yu, L. (2015). Medial prefrontal cannabinoid CB1 receptors modulate consolidation and extinction of cocaine-associated memory in mice. *Psychopharmacology (Berl)*, *232*(10), 1803-1815. doi: 10.1007/s00213-014-3812-y
- Hu, S. S., & Mackie, K. (2015). Distribution of the Endocannabinoid System in the Central Nervous System. *Handb Exp Pharmacol*, *231*, 59-93. doi: 10.1007/978-3-319-20825-1_3
- Hu, X. T. (2007). Cocaine withdrawal and neuro-adaptations in ion channel function. *Mol Neurobiol*, *35*(1), 95-112. doi: 10.1007/BF02700626
- Hyman, S. E., Malenka, R. C., & Nestler, E. J. (2006). Neural mechanisms of addiction: the role of reward-related learning and memory. *Annu Rev Neurosci*, *29*, 565-598. doi: 10.1146/annurev.neuro.29.051605.113009
- Ilyasov, A. A., Milligan, C. E., Pharr, E. P., & Howlett, A. C. (2018). The Endocannabinoid System and Oligodendrocytes in Health and Disease. *Front Neurosci*, *12*, 733. doi: 10.3389/fnins.2018.00733
- Imperato, A., Angelucci, L., Casolini, P., Zocchi, A., & Puglisi-Allegra, S. (1992). Repeated stressful experiences differently affect limbic dopamine release during and following stress. *Brain Res*, *577*(2), 194-199. doi: 10.1016/0006-8993(92)90274-d
- Ito, R., Dalley, J. W., Robbins, T. W., & Everitt, B. J. (2002). Dopamine release in the dorsal striatum during cocaine-seeking behavior under the control of a drug-associated cue. *J Neurosci*, *22*(14), 6247-6253. doi: 20026606

- Ito, R., & Hayden, A. (2011). Opposing roles of nucleus accumbens core and shell dopamine in the modulation of limbic information processing. *J Neurosci*, *31*(16), 6001-6007. doi: 10.1523/JNEUROSCI.6588-10.2011
- Itzhak, Y., & Anderson, K. L. (2012). Changes in the magnitude of drug-unconditioned stimulus during conditioning modulate cocaine-induced place preference in mice. *Addict Biol*, *17*(4), 706-716. doi: 10.1111/j.1369-1600.2011.00334.x
- Jacobsen, L. K., Southwick, S. M., & Kosten, T. R. (2001). Substance use disorders in patients with posttraumatic stress disorder: a review of the literature. *Am J Psychiatry*, *158*(8), 1184-1190. doi: 10.1176/appi.ajp.158.8.1184
- Jaffe, J. H. (1990). Drug addiction and drug abuse. *Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics*, 522-573.
- Jaffe, J. H., Cascella, N. G., Kumor, K. M., & Sherer, M. A. (1989). Cocaine-induced cocaine craving. *Psychopharmacology (Berl)*, *97*(1), 59-64. doi: 10.1007/BF00443414
- Jager, G., & Witkamp, R. F. (2014). The endocannabinoid system and appetite: relevance for food reward. *Nutr Res Rev*, *27*(1), 172-185. doi: 10.1017/S0954422414000080
- Janero, D. R., & Makriyannis, A. (2009). Cannabinoid receptor antagonists: pharmacological opportunities, clinical experience, and translational prognosis. *Expert Opin Emerg Drugs*, *14*(1), 43-65. doi: 10.1517/14728210902736568
- Jedema, H. P., & Moghaddam, B. (1994). Glutamatergic control of dopamine release during stress in the rat prefrontal cortex. *J Neurochem*, *63*(2), 785-788. doi: 10.1046/j.1471-4159.1994.63020785.x
- Jimenez-Blasco, D., Busquets-Garcia, A., Hebert-Chatelain, E., Serrat, R., Vicente-Gutierrez, C., Ioannidou, C., . . . Marsicano, G. (2020). Glucose metabolism links astroglial mitochondria to cannabinoid effects. *Nature*, *583*(7817), 603-608. doi: 10.1038/s41586-020-2470-y
- Jing, L., Qiu, Y., Zhang, Y., & Li, J. X. (2014). Effects of the cannabinoid CB(1) receptor allosteric modulator ORG 27569 on reinstatement of cocaine- and methamphetamine-seeking behavior in rats. *Drug Alcohol Depend*, *143*, 251-256. doi: 10.1016/j.drugalcdep.2014.08.004
- Justinova, Z., Goldberg, S. R., Heishman, S. J., & Tanda, G. (2005). Self-administration of cannabinoids by experimental animals and human marijuana smokers. *Pharmacol Biochem Behav*, *81*(2), 285-299. doi: 10.1016/j.pbb.2005.01.026
- 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*(23), 5645-5650. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0951-05.2005
- Justinova, Z., Tanda, G., Redhi, G. H., & Goldberg, S. R. (2003). Self-administration of delta9-tetrahydrocannabinol (THC) by drug naive squirrel monkeys. *Psychopharmacology (Berl)*, *169*(2), 135-140. doi: 10.1007/s00213-003-1484-0
- Kalivas, P. W. (2007). Neurobiology of cocaine addiction: implications for new pharmacotherapy. *Am J Addict*, *16*(2), 71-78. doi: 10.1080/10550490601184142
- Kalivas, P. W. (2009). The glutamate homeostasis hypothesis of addiction. *Nat Rev Neurosci*, *10*(8), 561-572. doi: 10.1038/nrn2515
- Kalivas, P. W., Churchill, L., & Klitenick, M. A. (1993). The circuitry mediating the translation of motivational stimuli into adaptive motor responses. In Kalivas & Barnes (Eds.), *Limbic Motor Circuits and Neuropsychiatry* (pp. 237-287). Boca Raton, FL: CRC.
- Kalivas, P. W., & Duffy, P. (1995). Selective activation of dopamine transmission in the shell of the nucleus accumbens by stress. *Brain Res*, *675*(1-2), 325-328. doi: 10.1016/0006-8993(95)00013-g
- Kalivas, P. W., Lalumiere, R. T., Knackstedt, L., & Shen, H. (2009). Glutamate transmission in addiction. *Neuropharmacology*, *56 Suppl 1*, 169-173. doi: 10.1016/j.neuropharm.2008.07.011
- Kalivas, P. W., & O'Brien, C. (2008). Drug addiction as a pathology of staged neuroplasticity. *Neuropsychopharmacology*, *33*(1), 166-180. doi: 10.1038/sj.npp.1301564
- Kalivas, P. W., Volkow, N., & Seamans, J. (2005). Unmanageable motivation in addiction: a pathology in prefrontal-accumbens glutamate transmission. *Neuron*, *45*(5), 647-650. doi: 10.1016/j.neuron.2005.02.005
- Kalivas, P. W., & Volkow, N. D. (2011). New medications for drug addiction hiding in glutamatergic neuroplasticity. *Mol Psychiatry*, *16*(10), 974-986. doi: 10.1038/mp.2011.46

- Kampman, K. M. (2019). The treatment of cocaine use disorder. *Sci Adv*, 5(10), eaax1532. doi: 10.1126/sciadv.aax1532
- Kano, M. (2014). Control of synaptic function by endocannabinoid-mediated retrograde signaling. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci*, 90(7), 235-250. doi: 10.2183/pjab.90.235
- Kano, M., Ohno-Shosaku, T., Hashimotodani, Y., Uchigashima, M., & Watanabe, M. (2009). Endocannabinoid-mediated control of synaptic transmission. *Physiol Rev*, 89(1), 309-380. doi: 10.1152/physrev.00019.2008
- Karimi, S., Azizi, P., Shamsizadeh, A., & Haghparast, A. (2013). Role of intra-accumbal cannabinoid CB1 receptors in the potentiation, acquisition and expression of morphine-induced conditioned place preference. *Behav Brain Res*, 247, 125-131. doi: 10.1016/j.bbr.2013.03.022
- Katona, I., & Freund, T. F. (2012). Multiple functions of endocannabinoid signaling in the brain. *Annu Rev Neurosci*, 35, 529-558. doi: 10.1146/annurev-neuro-062111-150420
- Katona, I., Urban, G. M., Wallace, M., Ledent, C., Jung, K. M., Piomelli, D., . . . Freund, T. F. (2006). Molecular composition of the endocannabinoid system at glutamatergic synapses. *J Neurosci*, 26(21), 5628-5637. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0309-06.2006
- Kau, K. S., Madayag, A., Mantsch, J. R., Grier, M. D., Abdulhameed, O., & Baker, D. A. (2008). Blunted cystine-glutamate antiporter function in the nucleus accumbens promotes cocaine-induced drug seeking. *Neuroscience*, 155(2), 530-537. doi: 10.1016/j.neuroscience.2008.06.010
- Kelley, A. E. (2004). Ventral striatal control of appetitive motivation: role in ingestive behavior and reward-related learning. *Neurosci Biobehav Rev*, 27(8), 765-776. doi: 10.1016/j.neubiorev.2003.11.015
- Keramati, M., Durand, A., Girardeau, P., Gutkin, B., & Ahmed, S. H. (2017). Cocaine addiction as a homeostatic reinforcement learning disorder. *Psychol Rev*, 124(2), 130-153. doi: 10.1037/rev0000046
- Kessler, R. C., Berglund, P., Demler, O., Jin, R., Merikangas, K. R., & Walters, E. E. (2005). Lifetime prevalence and age-of-onset distributions of DSM-IV disorders in the National Comorbidity Survey Replication. *Archives of general psychiatry*, 62(6), 593-602. doi: 10.1003-0990X
- Khaleghzadeh-Ahangar, H., & Haghparast, A. (2015). Intra-accumbal CB1 receptor blockade reduced extinction and reinstatement of morphine. *Physiol Behav*, 149, 212-219. doi: 10.1016/j.physbeh.2015.06.005
- Khaleghzadeh-Ahangar, H., & Haghparast, A. (2020). Cannabinoid receptor modulation changes the accumbal neuronal responses to morphine in the reinstatement of morphine-induced conditioned place preference. *Addict Biol*, 25(6), e12817. doi: 10.1111/adb.12817
- Klawonn, A. M., & Malenka, R. C. (2018). Nucleus Accumbens Modulation in Reward and Aversion. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 83, 119-129. doi: 10.1101/sqb.2018.83.037457
- Klein, T. W., Newton, C., Larsen, K., Lu, L., Perkins, I., Nong, L., & Friedman, H. (2003). The cannabinoid system and immune modulation. *J Leukoc Biol*, 74(4), 486-496. doi: 10.1189/jlb.0303101
- Knackstedt, L. A., Melendez, R. I., & Kalivas, P. W. (2010). Ceftriaxone restores glutamate homeostasis and prevents relapse to cocaine seeking. *Biol Psychiatry*, 67(1), 81-84. doi: 10.1016/j.biopsych.2009.07.018
- Knackstedt, L. A., Trantham-Davidson, H. L., & Schwendt, M. (2014). The role of ventral and dorsal striatum mGluR5 in relapse to cocaine-seeking and extinction learning. *Addict Biol*, 19(1), 87-101. doi: 10.1111/adb.12061
- Kodas, E., Cohen, C., Louis, C., & Griebel, G. (2007). Cortico-limbic circuitry for conditioned nicotine-seeking behavior in rats involves endocannabinoid signaling. *Psychopharmacology (Berl)*, 194(2), 161-171. doi: 10.1007/s00213-007-0813-0
- Kofalvi, A., Rodrigues, R. J., Ledent, C., Mackie, K., Vizi, E. S., Cunha, R. A., & Sperlagh, B. (2005). Involvement of cannabinoid receptors in the regulation of neurotransmitter release in the rodent striatum: a combined immunochemical and pharmacological analysis. *J Neurosci*, 25(11), 2874-2884. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4232-04.2005
- Koob, G. F., & Le Moal, M. (2001). Drug addiction, dysregulation of reward, and allostasis. *Neuropsychopharmacology*, 24(2), 97-129. doi: 10.1016/S0893-133X(00)00195-0
- Korpi, E. R., den Hollander, B., Farooq, U., Vashchinkina, E., Rajkumar, R., Nutt, D. J., . . . Dawe, G. S. (2015). Mechanisms of Action and Persistent Neuroplasticity by Drugs of Abuse. *Pharmacol Rev*, 67(4), 872-1004. doi: 10.1124/pr.115.010967

- Kosten, T. R., Rounsaville, B. J., & Kleber, H. D. (1986). A 2.5-year follow-up of depression, life crises, and treatment effects on abstinence among opioid addicts. *Archives of general psychiatry*, *43*(8), 733-738 %@ 0003-0990X.
- Kreek, M. J., & Koob, G. F. (1998). Drug dependence: stress and dysregulation of brain reward pathways. *Drug Alcohol Depend*, *51*(1-2), 23-47. doi: 10.1016/s0376-8716(98)00064-7
- Kreek, M. J., Nielsen, D. A., Butelman, E. R., & LaForge, K. S. (2005). Genetic influences on impulsivity, risk taking, stress responsivity and vulnerability to drug abuse and addiction. *Nat Neurosci*, *8*(11), 1450-1457. doi: 10.1038/nn1583
- Kreitzer, A. C., & Regehr, W. G. (2001). Retrograde inhibition of presynaptic calcium influx by endogenous cannabinoids at excitatory synapses onto Purkinje cells. *Neuron*, *29*(3), 717-727. doi: 10.1016/s0896-6273(01)00246-x
- Kruyer, A., & Kalivas, P. W. (2020). Astrocytes as cellular mediators of cue reactivity in addiction. *Curr Opin Pharmacol*, *56*, 1-6. doi: 10.1016/j.coph.2020.07.009
- Kuhn, B. N., Kalivas, P. W., & Bobadilla, A. C. (2019). Understanding Addiction Using Animal Models. *Front Behav Neurosci*, *13*, 262. doi: 10.3389/fnbeh.2019.00262
- Kumaresan, V., Yuan, M., Yee, J., Famous, K. R., Anderson, S. M., Schmidt, H. D., & Pierce, R. C. (2009). Metabotropic glutamate receptor 5 (mGluR5) antagonists attenuate cocaine priming- and cue-induced reinstatement of cocaine seeking. *Behav Brain Res*, *202*(2), 238-244. doi: 10.1016/j.bbr.2009.03.039
- Kunos, G., Osei-Hyiaman, D., Batkai, S., Sharkey, K. A., & Makriyannis, A. (2009). Should peripheral CB(1) cannabinoid receptors be selectively targeted for therapeutic gain? *Trends Pharmacol Sci*, *30*(1), 1-7. doi: 10.1016/j.tips.2008.10.001
- Kupchik, Y. M., Brown, R. M., Heinsbroek, J. A., Lobo, M. K., Schwartz, D. J., & Kalivas, P. W. (2015). Coding the direct/indirect pathways by D1 and D2 receptors is not valid for accumbens projections. *Nat Neurosci*, *18*(9), 1230-1232. doi: 10.1038/nn.4068
- Kupchik, Y. M., & Kalivas, P. W. (2017). The Direct and Indirect Pathways of the Nucleus Accumbens are not What You Think. *Neuropsychopharmacology*, *42*(1), 369-370. doi: 10.1038/npp.2016.160
- Kupchik, Y. M., Moussawi, K., Tang, X. C., Wang, X., Kalivas, B. C., Kolokithas, R., . . . Kalivas, P. W. (2012). The effect of N-acetylcysteine in the nucleus accumbens on neurotransmission and relapse to cocaine. *Biol Psychiatry*, *71*(11), 978-986. doi: 10.1016/j.biopsych.2011.10.024
- Kupferschmidt, D. A., Klas, P. G., & Erb, S. (2012). Cannabinoid CB1 receptors mediate the effects of corticotropin-releasing factor on the reinstatement of cocaine seeking and expression of cocaine-induced behavioural sensitization. *Br J Pharmacol*, *167*(1), 196-206. doi: 10.1111/j.1476-5381.2012.01983.x
- L.I.A.D.E. (Argentina). CPP Software (Version 1.2). Córdoba, Argentina. Retrieved from <http://www.liade.inv.efn.uncor.edu/>
- LaCrosse, A. L., Hill, K., & Knackstedt, L. A. (2016). Ceftriaxone attenuates cocaine relapse after abstinence through modulation of nucleus accumbens AMPA subunit expression. *Eur Neuropsychopharmacol*, *26*(2), 186-194. doi: 10.1016/j.euroneuro.2015.12.022
- LaLumiere, R. T., & Kalivas, P. W. (2008). Glutamate release in the nucleus accumbens core is necessary for heroin seeking. *J Neurosci*, *28*(12), 3170-3177. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5129-07.2008
- Lan, R., Liu, Q., Fan, P., Lin, S., Fernando, S. R., McCallion, D., . . . Makriyannis, A. (1999). Structure-activity relationships of pyrazole derivatives as cannabinoid receptor antagonists. *J Med Chem*, *42*(4), 769-776. doi: 10.1021/jm980363y
- LaRowe, S. D., Myrick, H., Hedden, S., Mardikian, P., Saladin, M., McRae, A., . . . Malcolm, R. (2007). Is cocaine desire reduced by N-acetylcysteine? *Am J Psychiatry*, *164*(7), 1115-1117. doi: 10.1176/ajp.2007.164.7.1115
- Lauckner, J. E., Jensen, J. B., Chen, H. Y., Lu, H. C., Hille, B., & Mackie, K. (2008). GPR55 is a cannabinoid receptor that increases intracellular calcium and inhibits M current. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *105*(7), 2699-2704. doi: 10.1073/pnas.0711278105
- Le Foll, B., & Goldberg, S. R. (2005). Cannabinoid CB1 receptor antagonists as promising new medications for drug dependence. *J Pharmacol Exp Ther*, *312*(3), 875-883. doi: 10.1124/jpet.104.077974
- Le Moal, M., & Simon, H. (1991). Mesocorticolimbic dopaminergic network: functional and regulatory roles. *Physiol Rev*, *71*(1), 155-234. doi: 10.1152/physrev.1991.71.1.155

- Leao, R. M., Cruz, F. C., & Planeta, C. S. (2009). Exposure to acute restraint stress reinstates nicotine-induced place preference in rats. *Behav Pharmacol*, *20*(1), 109-113. doi: 10.1097/FBP.0b013e3283242f41
- Lecca, S., Melis, M., Luchicchi, A., Muntoni, A. L., & Pistis, M. (2012). Inhibitory inputs from rostromedial tegmental neurons regulate spontaneous activity of midbrain dopamine cells and their responses to drugs of abuse. *Neuropsychopharmacology*, *37*(5), 1164-1176. doi: 10.1038/npp.2011.302
- LeDoux, J. E. (1993). Emotional memory systems in the brain. *Behav Brain Res*, *58*(1-2), 69-79. doi: 10.1016/0166-4328(93)90091-4
- Lee, B., Tiefenbacher, S., Platt, D. M., & Spealman, R. D. (2004). Pharmacological blockade of alpha2-adrenoceptors induces reinstatement of cocaine-seeking behavior in squirrel monkeys. *Neuropsychopharmacology*, *29*(4), 686-693. doi: 10.1038/sj.npp.1300391
- Lefever, T. W., Marusich, J. A., Antonazzo, K. R., & Wiley, J. L. (2014). Evaluation of WIN 55,212-2 self-administration in rats as a potential cannabinoid abuse liability model. *Pharmacol Biochem Behav*, *118*, 30-35. doi: 10.1016/j.pbb.2014.01.002
- Lepore, M., Vorel, S. R., Lowinson, J., & Gardner, E. L. (1995). Conditioned place preference induced by delta 9-tetrahydrocannabinol: comparison with cocaine, morphine, and food reward. *Life Sci*, *56*(23-24), 2073-2080. doi: 10.1016/0024-3205(95)00191-8
- Lesscher, H. M., Hoogveld, E., Burbach, J. P., van Ree, J. M., & Gerrits, M. A. (2005). Endogenous cannabinoids are not involved in cocaine reinforcement and development of cocaine-induced behavioural sensitization. *Eur Neuropsychopharmacol*, *15*(1), 31-37. doi: 10.1016/j.euroneuro.2004.04.003
- Letierrier, C., Bonnard, D., Carrel, D., Rossier, J., & Lenkei, Z. (2004). Constitutive endocytic cycle of the CB1 cannabinoid receptor. *J Biol Chem*, *279*(34), 36013-36021. doi: 10.1074/jbc.M403990200
- Li, X., Peng, X. Q., Jordan, C. J., Li, J., Bi, G. H., He, Y., . . . Xi, Z. X. (2018). mGluR5 antagonism inhibits cocaine reinforcement and relapse by elevation of extracellular glutamate in the nucleus accumbens via a CB1 receptor mechanism. *Sci Rep*, *8*(1), 3686. doi: 10.1038/s41598-018-22087-1
- Liu, P., Che, X., Yu, L., Yang, X., An, N., Song, W., . . . Yang, J. (2017). Uridine attenuates morphine-induced conditioned place preference and regulates glutamate/GABA levels in mPFC of mice. *Pharmacol Biochem Behav*, *163*, 74-82. doi: 10.1016/j.pbb.2017.10.004
- Liu, X., & Weiss, F. (2002). Additive effect of stress and drug cues on reinstatement of ethanol seeking: exacerbation by history of dependence and role of concurrent activation of corticotropin-releasing factor and opioid mechanisms. *J Neurosci*, *22*(18), 7856-7861.
- Liu, Y., Le Foll, B., Liu, Y., Wang, X., & Lu, L. (2008). Conditioned place preference induced by licit drugs: establishment, extinction, and reinstatement. *ScientificWorldJournal*, *8*, 1228-1245. doi: 10.1100/tsw.2008.154
- Lobo, M. K., Covington, H. E., 3rd, Chaudhury, D., Friedman, A. K., Sun, H., Damez-Werno, D., . . . Nestler, E. J. (2010). Cell type-specific loss of BDNF signaling mimics optogenetic control of cocaine reward. *Science*, *330*(6002), 385-390. doi: 10.1126/science.1188472
- Lobo, M. K., & Nestler, E. J. (2011). The striatal balancing act in drug addiction: distinct roles of direct and indirect pathway medium spiny neurons. *Front Neuroanat*, *5*, 41. doi: 10.3389/fnana.2011.00041
- Lopes, J. B., Bastos, J. R., Costa, R. B., Aguiar, D. C., & Moreira, F. A. (2020). The roles of cannabinoid CB1 and CB2 receptors in cocaine-induced behavioral sensitization and conditioned place preference in mice. *Psychopharmacology (Berl)*, *237*(2), 385-394. doi: 10.1007/s00213-019-05370-5
- Lopez-Moreno, J. A., Gonzalez-Cuevas, G., Moreno, G., & Navarro, M. (2008). The pharmacology of the endocannabinoid system: functional and structural interactions with other neurotransmitter systems and their repercussions in behavioral addiction. *Addict Biol*, *13*(2), 160-187. doi: 10.1111/j.1369-1600.2008.00105.x
- Lovinger, D. M. (2008). Presynaptic modulation by endocannabinoids. *Handb Exp Pharmacol*(184), 435-477. doi: 10.1007/978-3-540-74805-2_14

- Lu, L., Grimm, J. W., Shaham, Y., & Hope, B. T. (2003). Molecular neuroadaptations in the accumbens and ventral tegmental area during the first 90 days of forced abstinence from cocaine self-administration in rats. *J Neurochem*, *85*(6), 1604-1613. doi: 10.1046/j.1471-4159.2003.01824.x
- Lu, L., Shepard, J. D., Hall, F. S., & Shaham, Y. (2003). Effect of environmental stressors on opiate and psychostimulant reinforcement, reinstatement and discrimination in rats: a review. *Neurosci Biobehav Rev*, *27*(5), 457-491. doi: 10.1016/s0149-7634(03)00073-3
- Lu, X. Y., Ghasemzadeh, M. B., & Kalivas, P. W. (1998). Expression of D1 receptor, D2 receptor, substance P and enkephalin messenger RNAs in the neurons projecting from the nucleus accumbens. *Neuroscience*, *82*(3), 767-780. doi: 10.1016/s0306-4522(97)00327-8
- Luscher, C., & Malenka, R. C. (2011). Drug-evoked synaptic plasticity in addiction: from molecular changes to circuit remodeling. *Neuron*, *69*(4), 650-663. doi: 10.1016/j.neuron.2011.01.017
- Luszczki, J. J., Patrzybas, P., Zagaja, M., Andres-Mach, M., Zaluska, K., Kondrat-Wrobel, M. W., . . . Florek-Luszczki, M. (2017). Effects of arachidonyl-2'-chloroethylamide (ACEA) on the protective action of various antiepileptic drugs in the 6-Hz corneal stimulation model in mice. *PLoS One*, *12*(8), e0183873. doi: 10.1371/journal.pone.0183873
- Lutz, B. (2020). Neurobiology of cannabinoid receptor signaling. *Dialogues Clin Neurosci*, *22*(3), 207-222. doi: 10.31887/DCNS.2020.22.3/blutz
- Lutz, B., Marsicano, G., Maldonado, R., & Hillard, C. J. (2015). The endocannabinoid system in guarding against fear, anxiety and stress. *Nat Rev Neurosci*, *16*(12), 705-718. doi: 10.1038/nrn4036
- Ma, Y. Y., Chu, N. N., Guo, C. Y., Han, J. S., & Cui, C. L. (2007). NR2B-containing NMDA receptor is required for morphine-but not stress-induced reinstatement. *Exp Neurol*, *203*(2), 309-319. doi: 10.1016/j.expneurol.2006.08.014
- Ma, Y. Y., Lee, B. R., Wang, X., Guo, C., Liu, L., Cui, R., . . . Dong, Y. (2014). Bidirectional modulation of incubation of cocaine craving by silent synapse-based remodeling of prefrontal cortex to accumbens projections. *Neuron*, *83*(6), 1453-1467. doi: 10.1016/j.neuron.2014.08.023
- MacAskill, A. F., Little, J. P., Cassel, J. M., & Carter, A. G. (2012). Subcellular connectivity underlies pathway-specific signaling in the nucleus accumbens. *Nat Neurosci*, *15*(12), 1624-1626. doi: 10.1038/nn.3254
- Maccarrone, M., Bab, I., Biro, T., Cabral, G. A., Dey, S. K., Di Marzo, V., . . . Zimmer, A. (2015). Endocannabinoid signaling at the periphery: 50 years after THC. *Trends Pharmacol Sci*, *36*(5), 277-296. doi: 10.1016/j.tips.2015.02.008
- Mackie, K. (2005). Distribution of cannabinoid receptors in the central and peripheral nervous system. *Handb Exp Pharmacol*(168), 299-325. doi: 10.1007/3-540-26573-2_10
- Madayag, A., Lobner, D., Kau, K. S., Mantsch, J. R., Abdulhameed, O., Hearing, M., . . . Baker, D. A. (2007). Repeated N-acetylcysteine administration alters plasticity-dependent effects of cocaine. *J Neurosci*, *27*(51), 13968-13976. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2808-07.2007
- Maejima, T., Hashimoto, K., Yoshida, T., Aiba, A., & Kano, M. (2001). Presynaptic inhibition caused by retrograde signal from metabotropic glutamate to cannabinoid receptors. *Neuron*, *31*(3), 463-475. doi: 10.1016/s0896-6273(01)00375-0
- Mahler, S. V., Hensley-Simon, M., Tahsili-Fahadan, P., LaLumiere, R. T., Thomas, C., Fallon, R. V., . . . Aston-Jones, G. (2014). Modafinil attenuates reinstatement of cocaine seeking: role for cystine-glutamate exchange and metabotropic glutamate receptors. *Addict Biol*, *19*(1), 49-60. doi: 10.1111/j.1369-1600.2012.00506.x
- Mailleux, P., & Vanderhaeghen, J. J. (1992). Distribution of neuronal cannabinoid receptor in the adult rat brain: a comparative receptor binding radioautography and in situ hybridization histochemistry. *Neuroscience*, *48*(3), 655-668. doi: 10.1016/0306-4522(92)90409-u
- Mallet, P. E., & Beninger, R. J. (1998). Delta9-tetrahydrocannabinol, but not the endogenous cannabinoid receptor ligand anandamide, produces conditioned place avoidance. *Life Sci*, *62*(26), 2431-2439. doi: 10.1016/s0024-3205(98)00226-4
- Mannella, F., Gurney, K., & Baldassarre, G. (2013). The nucleus accumbens as a nexus between values and goals in goal-directed behavior: a review and a new hypothesis. *Front Behav Neurosci*, *7*, 135. doi: 10.3389/fnbeh.2013.00135
- Mantsch, J. R., Baker, D. A., Funk, D., Le, A. D., & Shaham, Y. (2016). Stress-Induced Reinstatement of Drug Seeking: 20 Years of Progress. *Neuropsychopharmacology*, *41*(1), 335-356. doi: 10.1038/npp.2015.142

- Mantsch, J. R., Vranjkovic, O., Twining, R. C., Gasser, P. J., McReynolds, J. R., & Blacktop, J. M. (2014). Neurobiological mechanisms that contribute to stress-related cocaine use. *Neuropharmacology*, *76 Pt B*, 383-394. doi: 10.1016/j.neuropharm.2013.07.021
- Marinelli, S., Di Marzo, V., Berretta, N., Matias, I., Maccarrone, M., Bernardi, G., & Mercuri, N. B. (2003). Presynaptic facilitation of glutamatergic synapses to dopaminergic neurons of the rat substantia nigra by endogenous stimulation of vanilloid receptors. *J Neurosci*, *23*(8), 3136-3144.
- Marinelli, S., Di Marzo, V., Florenzano, F., Fezza, F., Viscomi, M. T., van der Stelt, M., . . . Mercuri, N. B. (2007). N-arachidonoyl-dopamine tunes synaptic transmission onto dopaminergic neurons by activating both cannabinoid and vanilloid receptors. *Neuropsychopharmacology*, *32*(2), 298-308. doi: 10.1038/sj.npp.1301118
- Marlatt, G. A. (1996). Models of relapse and relapse prevention: A commentary. *Experimental and Clinical Psychopharmacology*, *4*(1), 55-60. doi: <https://doi.org/10.1037/1064-1297.4.1.55>
- Marlatt, G. A., & Donovan, D. M. (2005). *Relapse Prevention: Maintenance Strategies in the Treatment of Addictive Behaviors*: Guilford Publications.
- Marrs, W. R., Blankman, J. L., Horne, E. A., Thomazeau, A., Lin, Y. H., Coy, J., . . . Stella, N. (2010). The serine hydrolase ABHD6 controls the accumulation and efficacy of 2-AG at cannabinoid receptors. *Nat Neurosci*, *13*(8), 951-957. doi: 10.1038/nn.2601
- Marsicano, G., & Lafenetre, P. (2009). Roles of the endocannabinoid system in learning and memory. *Curr Top Behav Neurosci*, *1*, 201-230. doi: 10.1007/978-3-540-88955-7_8
- 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*(2), 327-330. doi: 10.1016/s0306-4522(98)00052-9
- Martin-Fardon, R., & Weiss, F. (2012). (-)-2-oxa-4-aminobicyclo[3.1.0]hexane-4,6-dicarboxylic acid (LY379268) and 3-[(2-methyl-1,3-thiazol-4-yl)ethyl]piperidine (MTEP) similarly attenuate stress-induced reinstatement of cocaine seeking. *Addict Biol*, *17*(3), 557-564. doi: 10.1111/j.1369-1600.2011.00345.x
- 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*(11), 4038-4046. doi: 10.1046/j.1460-9568.2000.00287.x
- Martin, R., Bajo-Graneras, R., Moratalla, R., Perea, G., & Araque, A. (2015). Circuit-specific signaling in astrocyte-neuron networks in basal ganglia pathways. *Science*, *349*(6249), 730-734. doi: 10.1126/science.aaa7945
- Mateo, Y., Johnson, K. A., Covey, D. P., Atwood, B. K., Wang, H. L., Zhang, S., . . . Lovinger, D. M. (2017). Endocannabinoid Actions on Cortical Terminals Orchestrate Local Modulation of Dopamine Release in the Nucleus Accumbens. *Neuron*, *96*(5), 1112-1126 e1115. doi: 10.1016/j.neuron.2017.11.012
- 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*(6), 585-586. doi: 10.1038/nn1251
- Mato, S., Robbe, D., Puente, N., Grandes, P., & Manzoni, O. J. (2005). Presynaptic homeostatic plasticity rescues long-term depression after chronic Delta 9-tetrahydrocannabinol exposure. *J Neurosci*, *25*(50), 11619-11627. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2294-05.2005
- Matsuda, L. A., Bonner, T. I., & Lolait, S. J. (1993). Localization of cannabinoid receptor mRNA in rat brain. *J Comp Neurol*, *327*(4), 535-550. doi: 10.1002/cne.903270406
- 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*(6284), 561-564. doi: 10.1038/346561a0
- Matyas, F., Yanovsky, Y., Mackie, K., Kelsch, W., Misgeld, U., & Freund, T. F. (2006). Subcellular localization of type 1 cannabinoid receptors in the rat basal ganglia. *Neuroscience*, *137*(1), 337-361. doi: 10.1016/j.neuroscience.2005.09.005
- McCabe, S. E., Cranford, J. A., & Boyd, C. J. (2016). Stressful Events and Other Predictors of Remission from Drug Dependence in the United States: Longitudinal Results from a National Survey. *J Subst Abuse Treat*, *71*, 41-47. doi: 10.1016/j.jsat.2016.08.008
- McCutcheon, J. E., Wang, X., Tseng, K. Y., Wolf, M. E., & Marinelli, M. (2011). Calcium-permeable AMPA receptors are present in nucleus accumbens synapses after prolonged withdrawal from cocaine

- self-administration but not experimenter-administered cocaine. *J Neurosci*, *31*(15), 5737-5743. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0350-11.2011
- McDowell, T. S., Wang, Z. Y., Singh, R., & Bjorling, D. (2013). CB1 cannabinoid receptor agonist prevents NGF-induced sensitization of TRPV1 in sensory neurons. *Neurosci Lett*, *551*, 34-38. doi: 10.1016/j.neulet.2013.06.066
- 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*(7), 1551-1560. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4177-03.2004
- McFarland, K., & Kalivas, P. W. (2001). The circuitry mediating cocaine-induced reinstatement of drug-seeking behavior. *J Neurosci*, *21*(21), 8655-8663.
- McFarland, K., Lapish, C. C., & Kalivas, P. W. (2003). Prefrontal glutamate release into the core of the nucleus accumbens mediates cocaine-induced reinstatement of drug-seeking behavior. *J Neurosci*, *23*(8), 3531-3537.
- McGlinchey, E. M., James, M. H., Mahler, S. V., Pantazis, C., & Aston-Jones, G. (2016). Prelimbic to Accumbens Core Pathway Is Recruited in a Dopamine-Dependent Manner to Drive Cued Reinstatement of Cocaine Seeking. *J Neurosci*, *36*(33), 8700-8711. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1291-15.2016
- McIntosh, S., Howell, L., & Hemby, S. E. (2013). Dopaminergic dysregulation in prefrontal cortex of rhesus monkeys following cocaine self-administration. *Front Psychiatry*, *4*, 88. doi: 10.3389/fpsy.2013.00088
- McLaughlin, J., & See, R. E. (2003). Selective inactivation of the dorsomedial prefrontal cortex and the basolateral amygdala attenuates conditioned-cued reinstatement of extinguished cocaine-seeking behavior in rats. *Psychopharmacology (Berl)*, *168*(1-2), 57-65. doi: 10.1007/s00213-002-1196-x
- McLaughlin, R. J., Hill, M. N., Bambico, F. R., Stuhr, K. L., Gobbi, G., Hillard, C. J., & Gorzalka, B. B. (2012). Prefrontal cortical anandamide signaling coordinates coping responses to stress through a serotonergic pathway. *Eur Neuropsychopharmacol*, *22*(9), 664-671. doi: 10.1016/j.euroneuro.2012.01.004
- McReynolds, J. R., Doncheck, E. M., Li, Y., Vranjkovic, O., Graf, E. N., Ogasawara, D., . . . Mantsch, J. R. (2018). Stress Promotes Drug Seeking Through Glucocorticoid-Dependent Endocannabinoid Mobilization in the Prelimbic Cortex. *Biol Psychiatry*, *84*(2), 85-94. doi: 10.1016/j.biopsych.2017.09.024
- McReynolds, J. R., Doncheck, E. M., Vranjkovic, O., Ganzman, G. S., Baker, D. A., Hillard, C. J., & Mantsch, J. R. (2016). CB1 receptor antagonism blocks stress-potentiated reinstatement of cocaine seeking in rats. *Psychopharmacology (Berl)*, *233*(1), 99-109. doi: 10.1007/s00213-015-4092-x
- Mechoulam, R., Ben-Shabat, S., Hanus, L., Ligumsky, M., Kaminski, N. E., Schatz, A. R., . . . et al. (1995). Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochem Pharmacol*, *50*(1), 83-90. doi: 10.1016/0006-2952(95)00109-d
- Mechoulam, R., & Parker, L. A. (2013). The endocannabinoid system and the brain. *Annu Rev Psychol*, *64*, 21-47. doi: 10.1146/annurev-psych-113011-143739
- Mechoulam, R., Shani, A., Edery, H., & Grunfeld, Y. (1970). Chemical basis of hashish activity. *Science*, *169*(3945), 611-612. doi: 10.1126/science.169.3945.611
- Meil, W. M., & See, R. E. (1996). Conditioned cued recovery of responding following prolonged withdrawal from self-administered cocaine in rats: an animal model of relapse. *Behav Pharmacol*, *7*(8), 754-763.
- Melis, M. R., & Argiolas, A. (1995). Dopamine and sexual behavior. *Neurosci Biobehav Rev*, *19*(1), 19-38. doi: 10.1016/0149-7634(94)00020-2
- Mercier, S., Frederic, Canini, Buguet, A., Cespuglio, R., Martin, S., & Bourdon, L. (2003). Behavioural changes after an acute stress: stressor and test types influences. *Behav Brain Res*, *139*(1-2), 167-175. doi: 10.1016/s0166-4328(02)00265-6
- Meredith, G. E. (1999). The synaptic framework for chemical signaling in nucleus accumbens. *Ann N Y Acad Sci*, *877*, 140-156. doi: 10.1111/j.1749-6632.1999.tb09266.x
- Meredith, G. E., Baldo, B. A., Andrezjewski, M. E., & Kelley, A. E. (2008). The structural basis for mapping behavior onto the ventral striatum and its subdivisions. *Brain Struct Funct*, *213*(1-2), 17-27. doi: 10.1007/s00429-008-0175-3

- Miguens, M., Del Olmo, N., Higuera-Matas, A., Torres, I., Garcia-Lecumberri, C., & Ambrosio, E. (2008). Glutamate and aspartate levels in the nucleus accumbens during cocaine self-administration and extinction: a time course microdialysis study. *Psychopharmacology (Berl)*, *196*(2), 303-313. doi: 10.1007/s00213-007-0958-x
- Miller, W. R., & Hester, R. K. (1986). The effectiveness of alcoholism treatment *Treating addictive behaviors* (pp. 121-174): Springer.
- Mizuno, I., & Matsuda, S. (2021). The role of endocannabinoids in consolidation, retrieval, reconsolidation, and extinction of fear memory. *Pharmacol Rep*. doi: 10.1007/s43440-021-00246-y
- Mogenson, G. J., Jones, D. L., & Yim, C. Y. (1980). From motivation to action: functional interface between the limbic system and the motor system. *Prog Neurobiol*, *14*(2-3), 69-97. doi: 10.1016/0301-0082(80)90018-0
- Moghaddam, B. (1993). Stress preferentially increases extraneuronal levels of excitatory amino acids in the prefrontal cortex: comparison to hippocampus and basal ganglia. *J Neurochem*, *60*(5), 1650-1657. doi: 10.1111/j.1471-4159.1993.tb13387.x
- Mongi-Bragato, B., Avalos, M. P., Guzman, A. S., Bollati, F. A., & Cancela, L. M. (2018). Enkephalin as a Pivotal Player in Neuroadaptations Related to Psychostimulant Addiction. *Front Psychiatry*, *9*, 222. doi: 10.3389/fpsyt.2018.00222
- Morales, P., Goya, P., Jagerovic, N., & Hernandez-Folgado, L. (2016). Allosteric Modulators of the CB1 Cannabinoid Receptor: A Structural Update Review. *Cannabis Cannabinoid Res*, *1*(1), 22-30. doi: 10.1089/can.2015.0005
- Moran, M. M., McFarland, K., Melendez, R. I., Kalivas, P. W., & Seamans, J. K. (2005). Cystine/glutamate exchange regulates metabotropic glutamate receptor presynaptic inhibition of excitatory transmission and vulnerability to cocaine seeking. *J Neurosci*, *25*(27), 6389-6393. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1007-05.2005
- Moreira, F. A., Jupp, B., Belin, D., & Dalley, J. W. (2015). Endocannabinoids and striatal function: implications for addiction-related behaviours. *Behav Pharmacol*, *26*(1-2), 59-72. doi: 10.1097/FBP.000000000000109
- Morena, M., Patel, S., Bains, J. S., & Hill, M. N. (2016). Neurobiological Interactions Between Stress and the Endocannabinoid System. *Neuropsychopharmacology*, *41*(1), 80-102. doi: 10.1038/npp.2015.166
- Moussawi, K., & Kalivas, P. W. (2010). Group II metabotropic glutamate receptors (mGlu2/3) in drug addiction. *Eur J Pharmacol*, *639*(1-3), 115-122. doi: 10.1016/j.ejphar.2010.01.030
- Moussawi, K., Pacchioni, A., Moran, M., Olive, M. F., Gass, J. T., Lavin, A., & Kalivas, P. W. (2009). N-Acetylcysteine reverses cocaine-induced metaplasticity. *Nat Neurosci*, *12*(2), 182-189. doi: 10.1038/nn.2250
- Moussawi, K., Zhou, W., Shen, H., Reichel, C. M., See, R. E., Carr, D. B., & Kalivas, P. W. (2011). Reversing cocaine-induced synaptic potentiation provides enduring protection from relapse. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *108*(1), 385-390. doi: 10.1073/pnas.1011265108
- Mueller, D., & Stewart, J. (2000). Cocaine-induced conditioned place preference: reinstatement by priming injections of cocaine after extinction. *Behav Brain Res*, *115*(1), 39-47. doi: 10.1016/s0166-4328(00)00239-4
- Mulholland, P. J., Chandler, L. J., & Kalivas, P. W. (2016). Signals from the Fourth Dimension Regulate Drug Relapse. *Trends Neurosci*, *39*(7), 472-485. doi: 10.1016/j.tins.2016.04.007
- Munro, S., Thomas, K. L., & Abu-Shaar, M. (1993). Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature*, *365*(6441), 61-65. doi: 10.1038/365061a0
- Musella, A., De Chiara, V., Rossi, S., Prosperetti, C., Bernardi, G., Maccarrone, M., & Centonze, D. (2009). TRPV1 channels facilitate glutamate transmission in the striatum. *Mol Cell Neurosci*, *40*(1), 89-97. doi: 10.1016/j.mcn.2008.09.001
- Navarrete, M., & Araque, A. (2008). Endocannabinoids mediate neuron-astrocyte communication. *Neuron*, *57*(6), 883-893. doi: 10.1016/j.neuron.2008.01.029
- Navarrete, M., Diez, A., & Araque, A. (2014). Astrocytes in endocannabinoid signalling. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, *369*(1654), 20130599. doi: 10.1098/rstb.2013.0599
- Nestler, E. J. (2005). The neurobiology of cocaine addiction. *Sci Pract Perspect*, *3*(1), 4-10. doi: 10.1151/spp05314

- Neuhofe, D., & Kalivas, P. (2018). Metaplasticity at the addicted tetrapartite synapse: A common denominator of drug induced adaptations and potential treatment target for addiction. *Neurobiol Learn Mem*, *154*, 97-111. doi: 10.1016/j.nlm.2018.02.007
- Neumeister, A., Normandin, M. D., Pietrzak, R. H., Piomelli, D., Zheng, M. Q., Gujarró-Anton, A., . . . Huang, Y. (2013). Elevated brain cannabinoid CB1 receptor availability in post-traumatic stress disorder: a positron emission tomography study. *Mol Psychiatry*, *18*(9), 1034-1040. doi: 10.1038/mp.2013.61
- Nie, J., & Lewis, D. L. (2001). Structural domains of the CB1 cannabinoid receptor that contribute to constitutive activity and G-protein sequestration. *J Neurosci*, *21*(22), 8758-8764.
- Nielsen, D. A., Utrankar, A., Reyes, J. A., Simons, D. D., & Kosten, T. R. (2012). Epigenetics of drug abuse: predisposition or response. *Pharmacogenomics*, *13*(10), 1149-1160. doi: 10.2217/pgs.12.94
- Nocito Echevarria, M. A., Andrade Reis, T., Ruffo Capatti, G., Siciliano Soares, V., da Silveira, D. X., & Fidalgo, T. M. (2017). N-acetylcysteine for treating cocaine addiction - A systematic review. *Psychiatry Res*, *251*, 197-203. doi: 10.1016/j.psychres.2017.02.024
- Nogueras-Ortiz, C., & Yudowski, G. A. (2016). The Multiple Waves of Cannabinoid 1 Receptor Signaling. *Mol Pharmacol*, *90*(5), 620-626. doi: 10.1124/mol.116.104539
- O'Brien, C. P., Childress, A. R., McLellan, A. T., & Ehrman, R. (1992). Classical conditioning in drug-dependent humans. *Ann N Y Acad Sci*, *654*, 400-415. doi: 10.1111/j.1749-6632.1992.tb25984.x
- O'Brien, M. S., & Anthony, J. C. (2005). Risk of becoming cocaine dependent: epidemiological estimates for the United States, 2000-2001. *Neuropsychopharmacology*, *30*(5), 1006-1018. doi: 10.1038/sj.npp.1300681
- O.M.S. (1992). *Décima Revisión de la Clasificación Internacional de las Enfermedades. Descripciones Clínicas y pautas para el diagnóstico*: Organización Mundial de la Salud.
- Ohno-Shosaku, T., & Kano, M. (2014). Endocannabinoid-mediated retrograde modulation of synaptic transmission. *Curr Opin Neurobiol*, *29*, 1-8. doi: 10.1016/j.conb.2014.03.017
- Ohno-Shosaku, T., Maejima, T., & Kano, M. (2001). Endogenous cannabinoids mediate retrograde signals from depolarized postsynaptic neurons to presynaptic terminals. *Neuron*, *29*(3), 729-738. doi: 10.1016/s0896-6273(01)00247-1
- Ohno-Shosaku, T., Tanimura, A., Hashimoto-dani, Y., & Kano, M. (2012). Endocannabinoids and retrograde modulation of synaptic transmission. *Neuroscientist*, *18*(2), 119-132. doi: 10.1177/1073858410397377
- Okamoto, Y., Tsuboi, K., & Ueda, N. (2009). Enzymatic formation of anandamide. *Vitam Horm*, *81*, 1-24. doi: 10.1016/S0083-6729(09)81001-7
- Oleson, E. B., Beckert, M. V., Morra, J. T., Lansink, C. S., Cachepe, R., Abdullah, R. A., . . . Cheer, J. F. (2012). Endocannabinoids shape accumbal encoding of cue-motivated behavior via CB1 receptor activation in the ventral tegmentum. *Neuron*, *73*(2), 360-373. doi: 10.1016/j.neuron.2011.11.018
- Oliere, S., Joliette-Riopel, A., Potvin, S., & Jutras-Aswad, D. (2013). Modulation of the endocannabinoid system: vulnerability factor and new treatment target for stimulant addiction. *Front Psychiatry*, *4*, 109. doi: 10.3389/fpsy.2013.00109
- Orellana, J. A., Moraga-Amaro, R., Díaz-Galarce, R., Rojas, S., Maturana, C. J., Stehberg, J., & Saez, J. C. (2015). Restraint stress increases hemichannel activity in hippocampal glial cells and neurons. *Front Cell Neurosci*, *9*, 102. doi: 10.3389/fncel.2015.00102
- Orio, L., Edwards, S., George, O., Parsons, L. H., & Koob, G. F. (2009). A role for the endocannabinoid system in the increased motivation for cocaine in extended-access conditions. *J Neurosci*, *29*(15), 4846-4857. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0563-09.2009
- Quimette, P., Coolhart, D., Funderburk, J. S., Wade, M., & Brown, P. J. (2007). Precipitants of first substance use in recently abstinent substance use disorder patients with PTSD. *Addict Behav*, *32*(8), 1719-1727. doi: 10.1016/j.addbeh.2006.11.020
- Pacchioni, A. M., Cador, M., Bregonzio, C., & Cancela, L. M. (2007). A glutamate-dopamine interaction in the persistent enhanced response to amphetamine in nucleus accumbens core but not shell following a single restraint stress. *Neuropsychopharmacology*, *32*(3), 682-692. doi: 10.1038/sj.npp.1301080
- Pacchioni, A. M., Gioino, G., Assis, A., & Cancela, L. M. (2002). A single exposure to restraint stress induces behavioral and neurochemical sensitization to stimulating effects of amphetamine:

- involvement of NMDA receptors. *Ann N Y Acad Sci*, 965, 233-246. doi: 10.1111/j.1749-6632.2002.tb04165.x
- Panagis, G., Mackey, B., & Vlachou, S. (2014). Cannabinoid Regulation of Brain Reward Processing with an Emphasis on the Role of CB1 Receptors: A Step Back into the Future. *Front Psychiatry*, 5, 92. doi: 10.3389/fpsy.2014.00092
- Panlilio, L. V., & Justinova, Z. (2018). Preclinical Studies of Cannabinoid Reward, Treatments for Cannabis Use Disorder, and Addiction-Related Effects of Cannabinoid Exposure. *Neuropsychopharmacology*, 43(1), 116-141. doi: 10.1038/npp.2017.193
- Parent, M., Bush, D., Rauw, G., Master, S., Vaccarino, F., & Baker, G. (2001). Analysis of amino acids and catecholamines, 5-hydroxytryptamine and their metabolites in brain areas in the rat using in vivo microdialysis. *Methods*, 23(1), 11-20. doi: 10.1006/meth.2000.1102
- Park, K., Volkow, N. D., Pan, Y., & Du, C. (2013). Chronic cocaine dampens dopamine signaling during cocaine intoxication and unbalances D1 over D2 receptor signaling. *J Neurosci*, 33(40), 15827-15836. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1935-13.2013
- Park, W. K., Bari, A. A., Jey, A. R., Anderson, S. M., Spealman, R. D., Rowlett, J. K., & Pierce, R. C. (2002). Cocaine administered into the medial prefrontal cortex reinstates cocaine-seeking behavior by increasing AMPA receptor-mediated glutamate transmission in the nucleus accumbens. *J Neurosci*, 22(7), 2916-2925. doi: 20026235
- Parkinson, J. A., Willoughby, P. J., Robbins, T. W., & Everitt, B. J. (2000). Disconnection of the anterior cingulate cortex and nucleus accumbens core impairs Pavlovian approach behavior: further evidence for limbic cortical-ventral striatopallidal systems. *Behav Neurosci*, 114(1), 42-63.
- Parsons, L. H., & Hurd, Y. L. (2015). Endocannabinoid signalling in reward and addiction. *Nat Rev Neurosci*, 16(10), 579-594. doi: 10.1038/nrn4004
- Patel, S., & Hillard, C. J. (2008). Adaptations in endocannabinoid signaling in response to repeated homotypic stress: a novel mechanism for stress habituation. *Eur J Neurosci*, 27(11), 2821-2829. doi: 10.1111/j.1460-9568.2008.06266.x
- Patel, S., Roelke, C. T., Rademacher, D. J., Cullinan, W. E., & Hillard, C. J. (2004). Endocannabinoid signaling negatively modulates stress-induced activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Endocrinology*, 145(12), 5431-5438. doi: 10.1210/en.2004-0638
- Patel, S., Roelke, C. T., Rademacher, D. J., & Hillard, C. J. (2005). Inhibition of restraint stress-induced neural and behavioural activation by endogenous cannabinoid signalling. *Eur J Neurosci*, 21(4), 1057-1069. doi: 10.1111/j.1460-9568.2005.03916.x
- Pavlov, I. P., & Anrep, G. V. (1927). *Conditioned reflexes: an investigation of the physiological activity of the cerebral cortex* (Vol. 220): london: oxford University Press.
- Paxinos, G., & Watson, C. (2007). *The rat brain in stereotaxic coordinates* (6th ed.). Amsterdam ; Boston ;: Academic Press/Elsevier.
- Pennartz, C. M., Ameerun, R. F., Groenewegen, H. J., & Lopes da Silva, F. H. (1993). Synaptic plasticity in an in vitro slice preparation of the rat nucleus accumbens. *Eur J Neurosci*, 5(2), 107-117. doi: 10.1111/j.1460-9568.1993.tb00475.x
- Perry, C. J., Zbukvic, I., Kim, J. H., & Lawrence, A. J. (2014). Role of cues and contexts on drug-seeking behaviour. *Br J Pharmacol*, 171(20), 4636-4672. doi: 10.1111/bph.12735
- Pertwee, R. G. (2005). Inverse agonism and neutral antagonism at cannabinoid CB1 receptors. *Life Sci*, 76(12), 1307-1324. doi: 10.1016/j.lfs.2004.10.025
- Pertwee, R. G. (2010). Receptors and channels targeted by synthetic cannabinoid receptor agonists and antagonists. *Curr Med Chem*, 17(14), 1360-1381. doi: 10.2174/092986710790980050
- Pertwee, R. G., Howlett, A. C., Abood, M. E., Alexander, S. P., Di Marzo, V., Elphick, M. R., . . . Ross, R. A. (2010). International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXIX. Cannabinoid receptors and their ligands: beyond CB(1) and CB(2). *Pharmacol Rev*, 62(4), 588-631. doi: 10.1124/pr.110.003004
- Peters, J., & Kalivas, P. W. (2006). The group II metabotropic glutamate receptor agonist, LY379268, inhibits both cocaine- and food-seeking behavior in rats. *Psychopharmacology (Berl)*, 186(2), 143-149. doi: 10.1007/s00213-006-0372-9
- Pfaus, J. G. (1999). Neurobiology of sexual behavior. *Curr Opin Neurobiol*, 9(6), 751-758. doi: 10.1016/s0959-4388(99)00034-3

- Phillips, P. E., Stuber, G. D., Heien, M. L., Wightman, R. M., & Carelli, R. M. (2003). Subsecond dopamine release promotes cocaine seeking. *Nature*, *422*(6932), 614-618. doi: 10.1038/nature01476
- Piazza, P. V., Deroche, V., Rouge-Pont, F., & Le Moal, M. (1998). Behavioral and biological factors associated with individual vulnerability to psychostimulant abuse. *NIDA Res Monogr*, *169*, 105-133.
- Piazza, P. V., & Le Moal, M. (1998). The role of stress in drug self-administration. *Trends Pharmacol Sci*, *19*(2), 67-74. doi: 10.1016/s0165-6147(97)01115-2
- Pickel, V. M., Chan, J., Kash, T. L., Rodriguez, J. J., & MacKie, K. (2004). Compartment-specific localization of cannabinoid 1 (CB1) and mu-opioid receptors in rat nucleus accumbens. *Neuroscience*, *127*(1), 101-112. doi: 10.1016/j.neuroscience.2004.05.015
- Pickel, V. M., Chan, J., Kearn, C. S., & Mackie, K. (2006). Targeting dopamine D2 and cannabinoid-1 (CB1) receptors in rat nucleus accumbens. *J Comp Neurol*, *495*(3), 299-313. doi: 10.1002/cne.20881
- Pierce, R. C., Bell, K., Duffy, P., & Kalivas, P. W. (1996). Repeated cocaine augments excitatory amino acid transmission in the nucleus accumbens only in rats having developed behavioral sensitization. *J Neurosci*, *16*(4), 1550-1560.
- Polissidis, A., Galanopoulos, A., Naxakis, G., Papahatjis, D., Papadopoulou-Daifoti, Z., & Antoniou, K. (2013). The cannabinoid CB1 receptor biphasically modulates motor activity and regulates dopamine and glutamate release region dependently. *Int J Neuropsychopharmacol*, *16*(2), 393-403. doi: 10.1017/S1461145712000156
- Pontieri, F. E., Tanda, G., & Di Chiara, G. (1995). Intravenous cocaine, morphine, and amphetamine preferentially increase extracellular dopamine in the "shell" as compared with the "core" of the rat nucleus accumbens. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *92*(26), 12304-12308. doi: 10.1073/pnas.92.26.12304
- Popoli, M., Yan, Z., McEwen, B. S., & Sanacora, G. (2011). The stressed synapse: the impact of stress and glucocorticoids on glutamate transmission. *Nat Rev Neurosci*, *13*(1), 22-37. doi: 10.1038/nrn3138
- Pulvirenti, L., Swerdlow, N. R., & Koob, G. F. (1991). Nucleus accumbens NMDA antagonist decreases locomotor activity produced by cocaine, heroin or accumbens dopamine, but not caffeine. *Pharmacol Biochem Behav*, *40*(4), 841-845. doi: 10.1016/0091-3057(91)90095-j
- Qi, J., Yang, J. Y., Wang, F., Zhao, Y. N., Song, M., & Wu, C. F. (2009). Effects of oxytocin on methamphetamine-induced conditioned place preference and the possible role of glutamatergic neurotransmission in the medial prefrontal cortex of mice in reinstatement. *Neuropharmacology*, *56*(5), 856-865. doi: 10.1016/j.neuropharm.2009.01.010
- Rademacher, D. J., & Hillard, C. J. (2007). Interactions between endocannabinoids and stress-induced decreased sensitivity to natural reward. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, *31*(3), 633-641. doi: 10.1016/j.pnpbp.2006.12.013
- Rademacher, D. J., Meier, S. E., Shi, L., Ho, W. S., Jarrhian, A., & Hillard, C. J. (2008). Effects of acute and repeated restraint stress on endocannabinoid content in the amygdala, ventral striatum, and medial prefrontal cortex in mice. *Neuropharmacology*, *54*(1), 108-116. doi: 10.1016/j.neuropharm.2007.06.012
- Ramiro-Fuentes, S., Ortiz, O., Moratalla, R., & Fernandez-Espejo, E. (2010). Intra-accumbens rimonabant is rewarding but induces aversion to cocaine in cocaine-treated rats, as does in vivo accumbal cannabinoid CB1 receptor silencing: critical role for glutamate receptors. *Neuroscience*, *167*(2), 205-215. doi: 10.1016/j.neuroscience.2010.02.019
- Reissner, K. J., Gipson, C. D., Tran, P. K., Knackstedt, L. A., Scofield, M. D., & Kalivas, P. W. (2015). Glutamate transporter GLT-1 mediates N-acetylcysteine inhibition of cocaine reinstatement. *Addict Biol*, *20*(2), 316-323. doi: 10.1111/adb.12127
- Ribeiro Do Couto, B., Aguilar, M. A., Manzanedo, C., Rodriguez-Arias, M., Armario, A., & Minarro, J. (2006). Social stress is as effective as physical stress in reinstating morphine-induced place preference in mice. *Psychopharmacology (Berl)*, *185*(4), 459-470. doi: 10.1007/s00213-006-0345-z
- Riegel, A. C., & Lupica, C. R. (2004). Independent presynaptic and postsynaptic mechanisms regulate endocannabinoid signaling at multiple synapses in the ventral tegmental area. *J Neurosci*, *24*(49), 11070-11078. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3695-04.2004

- 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*(1), 109-116.
- Robbe, D., Alonso, G., & Manzoni, O. J. (2003). Exogenous and endogenous cannabinoids control synaptic transmission in mice nucleus accumbens. *Ann N Y Acad Sci*, *1003*, 212-225. doi: 10.1196/annals.1300.013
- 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*(12), 8384-8388. doi: 10.1073/pnas.122149199
- Robbins, T. W., & Everitt, B. J. (1996). Neurobehavioural mechanisms of reward and motivation. *Curr Opin Neurobiol*, *6*(2), 228-236. doi: 10.1016/s0959-4388(96)80077-8
- Roberts-Wolfe, D. J., & Kalivas, P. W. (2015). Glutamate Transporter GLT-1 as a Therapeutic Target for Substance Use Disorders. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, *14*(6), 745-756. doi: 10.2174/1871527314666150529144655
- Roberts, C. J., Stuhr, K. L., & Hillard, C. J. (2012). Swim stress differentially affects limbic contents of 2-arachidonoylglycerol and 2-oleoylglycerol. *Neuroscience*, *204*, 74-82. doi: 10.1016/j.neuroscience.2011.11.065
- Robertson, G. S., & Jian, M. (1995). D1 and D2 dopamine receptors differentially increase Fos-like immunoreactivity in accumbal projections to the ventral pallidum and midbrain. *Neuroscience*, *64*(4), 1019-1034. doi: 10.1016/0306-4522(94)00426-6
- 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*(3), 247-291. doi: 10.1016/0165-0173(93)90013-p
- Robinson, T. E., & Berridge, K. C. (2000). The psychology and neurobiology of addiction: an incentive-sensitization view. *Addiction*, *95 Suppl 2*, S91-117. doi: 10.1080/09652140050111681
- Rodaros, D., Caruana, D. A., Amir, S., & Stewart, J. (2007). Corticotropin-releasing factor projections from limbic forebrain and paraventricular nucleus of the hypothalamus to the region of the ventral tegmental area. *Neuroscience*, *150*(1), 8-13. doi: 10.1016/j.neuroscience.2007.09.043
- Rom, S., & Persidsky, Y. (2013). Cannabinoid receptor 2: potential role in immunomodulation and neuroinflammation. *J Neuroimmune Pharmacol*, *8*(3), 608-620. doi: 10.1007/s11481-013-9445-9
- Roset, P. N., Farre, M., de la Torre, R., Mas, M., Menoyo, E., Hernandez, C., & Cami, J. (2001). Modulation of rate of onset and intensity of drug effects reduces abuse potential in healthy males. *Drug Alcohol Depend*, *64*(3), 285-298. doi: 10.1016/s0376-8716(01)00127-2
- Ross, R. A. (2003). Anandamide and vanilloid TRPV1 receptors. *Br J Pharmacol*, *140*(5), 790-801. doi: 10.1038/sj.bjp.0705467
- Rothstein, J. D., Martin, L., Levey, A. I., Dykes-Hoberg, M., Jin, L., Wu, D., . . . Kuncl, R. W. (1994). Localization of neuronal and glial glutamate transporters. *Neuron*, *13*(3), 713-725. doi: 10.1016/0896-6273(94)90038-8
- Rozenfeld, R. (2011). Type I cannabinoid receptor trafficking: all roads lead to lysosome. *Traffic*, *12*(1), 12-18. doi: 10.1111/j.1600-0854.2010.01130.x
- Russo, S. J., Dietz, D. M., Dumitriu, D., Morrison, J. H., Malenka, R. C., & Nestler, E. J. (2010). The addicted synapse: mechanisms of synaptic and structural plasticity in nucleus accumbens. *Trends Neurosci*, *33*(6), 267-276. doi: 10.1016/j.tins.2010.02.002
- Ryberg, E., Larsson, N., Sjogren, S., Hjorth, S., Hermansson, N. O., Leonova, J., . . . Greasley, P. J. (2007). The orphan receptor GPR55 is a novel cannabinoid receptor. *Br J Pharmacol*, *152*(7), 1092-1101. doi: 10.1038/sj.bjp.0707460
- Salamone, J. D., & Correa, M. (2002). Motivational views of reinforcement: implications for understanding the behavioral functions of nucleus accumbens dopamine. *Behav Brain Res*, *137*(1-2), 3-25. doi: 10.1016/s0166-4328(02)00282-6
- Sanchez, C. J., Bailie, T. M., Wu, W. R., Li, N., & Sorg, B. A. (2003). Manipulation of dopamine d1-like receptor activation in the rat medial prefrontal cortex alters stress- and cocaine-induced reinstatement of conditioned place preference behavior. *Neuroscience*, *119*(2), 497-505. doi: 10.1016/s0306-4522(03)00078-2

- Sanchez, C. J., & Sorg, B. A. (2001). Conditioned fear stimuli reinstate cocaine-induced conditioned place preference. *Brain Res*, *908*(1), 86-92. doi: 10.1016/s0006-8993(01)02638-5
- Sano, K., Mishima, K., Koushi, E., Orito, K., Egashira, N., Irie, K., . . . Fujiwara, M. (2008). Delta 9-tetrahydrocannabinol-induced catalepsy-like immobilization is mediated by decreased 5-HT neurotransmission in the nucleus accumbens due to the action of glutamate-containing neurons. *Neuroscience*, *151*(2), 320-328. doi: 10.1016/j.neuroscience.2007.10.026
- Sari, Y., Sakai, M., Weedman, J. M., Rebec, G. V., & Bell, R. L. (2011). Ceftriaxone, a beta-lactam antibiotic, reduces ethanol consumption in alcohol-preferring rats. *Alcohol Alcohol*, *46*(3), 239-246. doi: 10.1093/alcalc/agr023
- Scaccianoce, S., Lombardo, K., & Angelucci, L. (2000). Nerve growth factor brain concentration and stress: changes depend on type of stressor and age. *Int J Dev Neurosci*, *18*(4-5), 469-479. doi: 10.1016/s0736-5748(00)00014-9
- Scofield, M. D., Heinsbroek, J. A., Gipson, C. D., Kupchik, Y. M., Spencer, S., Smith, A. C., . . . Kalivas, P. W. (2016). The Nucleus Accumbens: Mechanisms of Addiction across Drug Classes Reflect the Importance of Glutamate Homeostasis. *Pharmacol Rev*, *68*(3), 816-871. doi: 10.1124/pr.116.012484
- Scherma, M., Panlilio, L. V., Fadda, P., Fattore, L., Gamaledin, I., Le Foll, B., . . . Goldberg, S. R. (2008). Inhibition of anandamide hydrolysis by cyclohexyl carbamic acid 3'-carbamoyl-3-yl ester (URB597) reverses abuse-related behavioral and neurochemical effects of nicotine in rats. *J Pharmacol Exp Ther*, *327*(2), 482-490. doi: 10.1124/jpet.108.142224
- Schlicker, E., & Kathmann, M. (2001). Modulation of transmitter release via presynaptic cannabinoid receptors. *Trends Pharmacol Sci*, *22*(11), 565-572. doi: 10.1016/s0165-6147(00)01805-8
- Schmidt, H. D., Anderson, S. M., & Pierce, R. C. (2006). Stimulation of D1-like or D2 dopamine receptors in the shell, but not the core, of the nucleus accumbens reinstates cocaine-seeking behaviour in the rat. *Eur J Neurosci*, *23*(1), 219-228. doi: 10.1111/j.1460-9568.2005.04524.x
- Schmidt, H. D., & Pierce, R. C. (2006). Cooperative activation of D1-like and D2-like dopamine receptors in the nucleus accumbens shell is required for the reinstatement of cocaine-seeking behavior in the rat. *Neuroscience*, *142*(2), 451-461. doi: 10.1016/j.neuroscience.2006.06.004
- Schoepp, D. D., Wright, R. A., Levine, L. R., Gaydos, B., & Potter, W. Z. (2003). LY354740, an mGlu2/3 receptor agonist as a novel approach to treat anxiety/stress. *Stress*, *6*(3), 189-197. doi: 10.1080/1025389031000146773
- Schoffemeer, A. N., Hogenboom, F., Wardeh, G., & De Vries, T. J. (2006). Interactions between CB1 cannabinoid and mu opioid receptors mediating inhibition of neurotransmitter release in rat nucleus accumbens core. *Neuropharmacology*, *51*(4), 773-781. doi: 10.1016/j.neuropharm.2006.05.019
- Schroeder, J. P., Spanos, M., Stevenson, J. R., Besheer, J., Salling, M., & Hodge, C. W. (2008). Cue-induced reinstatement of alcohol-seeking behavior is associated with increased ERK1/2 phosphorylation in specific limbic brain regions: blockade by the mGluR5 antagonist MPEP. *Neuropharmacology*, *55*(4), 546-554. doi: 10.1016/j.neuropharm.2008.06.057
- Schultz, W. (1998). Predictive reward signal of dopamine neurons. *J Neurophysiol*, *80*(1), 1-27. doi: 10.1152/jn.1998.80.1.1
- Schultz, W. (2016). Dopamine reward prediction-error signalling: a two-component response. *Nat Rev Neurosci*, *17*(3), 183-195. doi: 10.1038/nrn.2015.26
- SEDRONAR. (2017a). Consumo de cocaína. *Estudio Nacional en población de 12 a 65 años, sobre Consumo de Sustancias Psicoactivas*: Dirección Nacional del Observatorio Argentino de Drogas.
- SEDRONAR. (2017b). Informe de los principales resultados sobre demanda de tratamiento. *Estudio Nacional en población de 12 a 65 años, sobre Consumo de Sustancias Psicoactivas*: : Dirección Nacional del Observatorio Argentino de Drogas.
- SEDRONAR. (2017c). Magnitud del consumo de sustancias a nivel nacional. *Estudio Nacional en población de 12 a 65 años, sobre Consumo de Sustancias Psicoactivas*: Dirección Nacional del Observatorio Argentino de Drogas.
- See, R. E. (2002). Neural substrates of conditioned-cued relapse to drug-seeking behavior. *Pharmacol Biochem Behav*, *71*(3), 517-529. doi: 10.1016/s0091-3057(01)00682-7
- Self, D. W., & Nestler, E. J. (1998). Relapse to drug-seeking: neural and molecular mechanisms. *Drug Alcohol Depend*, *51*(1-2), 49-60. doi: 10.1016/s0376-8716(98)00065-9

- Selye, H. (1998). A syndrome produced by diverse nocuous agents. 1936. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci*, *10*(2), 230-231. doi: 10.1176/jnp.10.2.230a
- Sellings, L. H., & Clarke, P. B. (2003). Segregation of amphetamine reward and locomotor stimulation between nucleus accumbens medial shell and core. *J Neurosci*, *23*(15), 6295-6303.
- Sellings, L. H., McQuade, L. E., & Clarke, P. B. (2006). Evidence for multiple sites within rat ventral striatum mediating cocaine-conditioned place preference and locomotor activation. *J Pharmacol Exp Ther*, *317*(3), 1178-1187. doi: 10.1124/jpet.105.100339
- Sesack, S. R., & Grace, A. A. (2010). Cortico-Basal Ganglia reward network: microcircuitry. *Neuropsychopharmacology*, *35*(1), 27-47. doi: 10.1038/npp.2009.93
- Shaham, Y., Erb, S., & Stewart, J. (2000). Stress-induced relapse to heroin and cocaine seeking in rats: a review. *Brain Res Brain Res Rev*, *33*(1), 13-33. doi: 10.1016/s0165-0173(00)00024-2
- Shalev, U., Erb, S., & Shaham, Y. (2010). Role of CRF and other neuropeptides in stress-induced reinstatement of drug seeking. *Brain Res*, *1314*, 15-28. doi: 10.1016/j.brainres.2009.07.028
- Shalev, U., Highfield, D., Yap, J., & Shaham, Y. (2000). Stress and relapse to drug seeking in rats: studies on the generality of the effect. *Psychopharmacology (Berl)*, *150*(3), 337-346. doi: 10.1007/s002130000441
- Shalev, U., Marinelli, M., Baumann, M. H., Piazza, P. V., & Shaham, Y. (2003). The role of corticosterone in food deprivation-induced reinstatement of cocaine seeking in the rat. *Psychopharmacology (Berl)*, *168*(1-2), 170-176. doi: 10.1007/s00213-002-1200-5
- Sharkey, K. A., Cristino, L., Oland, L. D., Van Sickle, M. D., Starowicz, K., Pittman, Q. J., . . . Di Marzo, V. (2007). Arvanil, anandamide and N-arachidonoyl-dopamine (NADA) inhibit emesis through cannabinoid CB1 and vanilloid TRPV1 receptors in the ferret. *Eur J Neurosci*, *25*(9), 2773-2782. doi: 10.1111/j.1460-9568.2007.05521.x
- Shelton, K. L., & Beardsley, P. M. (2005). Interaction of extinguished cocaine-conditioned stimuli and footshock on reinstatement in rats. *International journal of comparative psychology*, *18*(2 %@ 0889-3667).
- Shen, H., Moussawi, K., Zhou, W., Toda, S., & Kalivas, P. W. (2011). Heroin relapse requires long-term potentiation-like plasticity mediated by NMDA2b-containing receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *108*(48), 19407-19412. doi: 10.1073/pnas.1112052108
- Shen, H. W., Scofield, M. D., Boger, H., Hensley, M., & Kalivas, P. W. (2014). Synaptic glutamate spillover due to impaired glutamate uptake mediates heroin relapse. *J Neurosci*, *34*(16), 5649-5657. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4564-13.2014
- Shepard, J. D., Bossert, J. M., Liu, S. Y., & Shaham, Y. (2004). The anxiogenic drug yohimbine reinstates methamphetamine seeking in a rat model of drug relapse. *Biol Psychiatry*, *55*(11), 1082-1089. doi: 10.1016/j.biopsych.2004.02.032
- Shi, Q. X., Yang, L. K., Shi, W. L., Wang, L., Zhou, S. M., Guan, S. Y., . . . Yang, Q. (2017). The novel cannabinoid receptor GPR55 mediates anxiolytic-like effects in the medial orbital cortex of mice with acute stress. *Mol Brain*, *10*(1), 38. doi: 10.1186/s13041-017-0318-7
- Sidhpura, N., & Parsons, L. H. (2011). Endocannabinoid-mediated synaptic plasticity and addiction-related behavior. *Neuropharmacology*, *61*(7), 1070-1087. doi: 10.1016/j.neuropharm.2011.05.034
- Sinha, R. (2001). How does stress increase risk of drug abuse and relapse? *Psychopharmacology (Berl)*, *158*(4), 343-359. doi: 10.1007/s002130100917
- Sipe, J. C., Chiang, K., Gerber, A. L., Beutler, E., & Cravatt, B. F. (2002). A missense mutation in human fatty acid amide hydrolase associated with problem drug use. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *99*(12), 8394-8399. doi: 10.1073/pnas.082235799
- Skaper, S. D., & Di Marzo, V. (2012). Endocannabinoids in nervous system health and disease: the big picture in a nutshell. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, *367*(1607), 3193-3200. doi: 10.1098/rstb.2012.0313
- Sloan, M. E., Gowin, J. L., Ramchandani, V. A., Hurd, Y. L., & Le Foll, B. (2017). The endocannabinoid system as a target for addiction treatment: Trials and tribulations. *Neuropharmacology*, *124*, 73-83. doi: 10.1016/j.neuropharm.2017.05.031
- Smaga, I., Sanak, M., & Filip, M. (2019). Cocaine-induced Changes in the Expression of NMDA Receptor Subunits. *Curr Neuropharmacol*, *17*(11), 1039-1055. doi: 10.2174/1570159X17666190617101726

- Smart, D., Gunthorpe, M. J., Jerman, J. C., Nasir, S., Gray, J., Muir, A. I., . . . Davis, J. B. (2000). The endogenous lipid anandamide is a full agonist at the human vanilloid receptor (hVR1). *Br J Pharmacol*, *129*(2), 227-230. doi: 10.1038/sj.bjp.0703050
- Smith, A. C. W., Scofield, M. D., Heinsbroek, J. A., Gipson, C. D., Neuhofer, D., Roberts-Wolfe, D. J., . . . Kalivas, P. W. (2017). Accumbens nNOS Interneurons Regulate Cocaine Relapse. *J Neurosci*, *37*(4), 742-756. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2673-16.2016
- Solinas, M., Yasar, S., & Goldberg, S. R. (2007). Endocannabinoid system involvement in brain reward processes related to drug abuse. *Pharmacol Res*, *56*(5), 393-405. doi: 10.1016/j.phrs.2007.09.005
- Soria, G., Mendizabal, V., Tourino, C., Robledo, P., Ledent, C., Parmentier, M., . . . Valverde, O. (2005). Lack of CB1 cannabinoid receptor impairs cocaine self-administration. *Neuropsychopharmacology*, *30*(9), 1670-1680. doi: 10.1038/sj.npp.1300707
- Sperlagh, B., Windisch, K., Ando, R. D., & Sylvester Vizi, E. (2009). Neurochemical evidence that stimulation of CB1 cannabinoid receptors on GABAergic nerve terminals activates the dopaminergic reward system by increasing dopamine release in the rat nucleus accumbens. *Neurochem Int*, *54*(7), 452-457. doi: 10.1016/j.neuint.2009.01.017
- Stankeviciute, N. M., Scofield, M. D., Kalivas, P. W., & Gipson, C. D. (2014). Rapid, transient potentiation of dendritic spines in context-induced relapse to cocaine seeking. *Addict Biol*, *19*(6), 972-974. doi: 10.1111/adb.12064
- Staton, P. C., Hatcher, J. P., Walker, D. J., Morrison, A. D., Shapland, E. M., Hughes, J. P., . . . Chessell, I. P. (2008). The putative cannabinoid receptor GPR55 plays a role in mechanical hyperalgesia associated with inflammatory and neuropathic pain. *Pain*, *139*(1), 225-236. doi: 10.1016/j.pain.2008.04.006
- StatSoft. (Estados Unidos). STATISTICA (Version 7.0). Tulsa, OK. Retrieved from <http://www.statsoft.com/>
- Stefanik, M. T., & Kalivas, P. W. (2013). Optogenetic dissection of basolateral amygdala projections during cue-induced reinstatement of cocaine seeking. *Front Behav Neurosci*, *7*, 213. doi: 10.3389/fnbeh.2013.00213
- Stefanik, M. T., Kupchik, Y. M., & Kalivas, P. W. (2016). Optogenetic inhibition of cortical afferents in the nucleus accumbens simultaneously prevents cue-induced transient synaptic potentiation and cocaine-seeking behavior. *Brain Struct Funct*, *221*(3), 1681-1689. doi: 10.1007/s00429-015-0997-8
- Stefanik, M. T., Moussawi, K., Kupchik, Y. M., Smith, K. C., Miller, R. L., Huff, M. L., . . . LaLumiere, R. T. (2013). Optogenetic inhibition of cocaine seeking in rats. *Addict Biol*, *18*(1), 50-53. doi: 10.1111/j.1369-1600.2012.00479.x
- Stefanski, R., Ladenheim, B., Lee, S. H., Cadet, J. L., & Goldberg, S. R. (1999). Neuroadaptations in the dopaminergic system after active self-administration but not after passive administration of methamphetamine. *Eur J Pharmacol*, *371*(2-3), 123-135. doi: 10.1016/s0014-2999(99)00094-1
- Stewart, J., & de Wit, H. (1987). Reinstatement of drug-taking behavior as a method of assessing incentive motivational properties of drugs. In B. MA (Ed.), *Methods of assessing the reinforcing properties of abused drugs* (pp. 211-227). New York: Springer.
- Sugiura, T., Kondo, S., Sukagawa, A., Nakane, S., Shinoda, A., Itoh, K., . . . Waku, K. (1995). 2-Arachidonoylglycerol: a possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain. *Biochem Biophys Res Commun*, *215*(1), 89-97. doi: 10.1006/bbrc.1995.2437
- Surmeier, D. J., Ding, J., Day, M., Wang, Z., & Shen, W. (2007). D1 and D2 dopamine-receptor modulation of striatal glutamatergic signaling in striatal medium spiny neurons. *Trends Neurosci*, *30*(5), 228-235. doi: 10.1016/j.tins.2007.03.008
- Suto, N., Ecke, L. E., You, Z. B., & Wise, R. A. (2010). Extracellular fluctuations of dopamine and glutamate in the nucleus accumbens core and shell associated with lever-pressing during cocaine self-administration, extinction, and yoked cocaine administration. *Psychopharmacology (Berl)*, *211*(3), 267-275. doi: 10.1007/s00213-010-1890-z
- Suto, N., Elmer, G. I., Wang, B., You, Z. B., & Wise, R. A. (2013). Bidirectional modulation of cocaine expectancy by phasic glutamate fluctuations in the nucleus accumbens. *J Neurosci*, *33*(21), 9050-9055. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0503-13.2013

- Suto, N., Tanabe, L. M., Austin, J. D., Creekmore, E., Pham, C. T., & Vezina, P. (2004). Previous exposure to psychostimulants enhances the reinstatement of cocaine seeking by nucleus accumbens AMPA. *Neuropsychopharmacology*, *29*(12), 2149-2159. doi: 10.1038/sj.npp.1300533
- Swanson, C. J., Bures, M., Johnson, M. P., Linden, A. M., Monn, J. A., & Schoepp, D. D. (2005). Metabotropic glutamate receptors as novel targets for anxiety and stress disorders. *Nat Rev Drug Discov*, *4*(2), 131-144. doi: 10.1038/nrd1630
- Swendsen, J., Conway, K. P., Degenhardt, L., Dierker, L., Glantz, M., Jin, R., . . . Kessler, R. C. (2009). Socio-demographic risk factors for alcohol and drug dependence: the 10-year follow-up of the national comorbidity survey. *Addiction*, *104*(8), 1346-1355. doi: 10.1111/j.1360-0443.2009.02622.x
- Szabo, B., Muller, T., & Koch, H. (1999). Effects of cannabinoids on dopamine release in the corpus striatum and the nucleus accumbens in vitro. *J Neurochem*, *73*(3), 1084-1089. doi: 10.1046/j.1471-4159.1999.0731084.x
- Takamori, S. (2006). VGLUTs: 'exciting' times for glutamatergic research? *Neurosci Res*, *55*(4), 343-351. doi: 10.1016/j.neures.2006.04.016
- 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*(11), 1073-1074. doi: 10.1038/80577
- Timmerman, W., & Westerink, B. H. (1997). Brain microdialysis of GABA and glutamate: what does it signify? *Synapse*, *27*(3), 242-261. doi: 10.1002/(SICI)1098-2396(199711)27:3<242::AID-SYN9>3.0.CO;2-D
- Todd, T. P., Vurbic, D., & Bouton, M. E. (2014). Behavioral and neurobiological mechanisms of extinction in Pavlovian and instrumental learning. *Neurobiol Learn Mem*, *108*, 52-64. doi: 10.1016/j.nlm.2013.08.012
- Torregrassa, M. M., & Kalivas, P. W. (2008). Microdialysis and the neurochemistry of addiction. *Pharmacol Biochem Behav*, *90*(2), 261-272. doi: 10.1016/j.pbb.2007.09.001
- Tranham-Davidson, H., LaLumiere, R. T., Reissner, K. J., Kalivas, P. W., & Knackstedt, L. A. (2012). Ceftriaxone normalizes nucleus accumbens synaptic transmission, glutamate transport, and export following cocaine self-administration and extinction training. *J Neurosci*, *32*(36), 12406-12410. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1976-12.2012
- Tsou, K., Brown, S., Sanudo-Pena, M. C., Mackie, K., & Walker, J. M. (1998). Immunohistochemical distribution of cannabinoid CB1 receptors in the rat central nervous system. *Neuroscience*, *83*(2), 393-411. doi: 10.1016/s0306-4522(97)00436-3
- Tung, L. W., Lu, G. L., Lee, Y. H., Yu, L., Lee, H. J., Leishman, E., . . . Chiou, L. C. (2016). Orexins contribute to restraint stress-induced cocaine relapse by endocannabinoid-mediated disinhibition of dopaminergic neurons. *Nat Commun*, *7*, 12199. doi: 10.1038/ncomms12199
- Turu, G., & Hunyady, L. (2010). Signal transduction of the CB1 cannabinoid receptor. *J Mol Endocrinol*, *44*(2), 75-85. doi: 10.1677/JME-08-0190
- Tzschentke, T. M. (2007). Measuring reward with the conditioned place preference (CPP) paradigm: update of the last decade. *Addict Biol*, *12*(3-4), 227-462. doi: 10.1111/j.1369-1600.2007.00070.x
- Valjent, E., & Maldonado, R. (2000). A behavioural model to reveal place preference to delta 9-tetrahydrocannabinol in mice. *Psychopharmacology (Berl)*, *147*(4), 436-438. doi: 10.1007/s002130050013
- Valyear, M. D., Glovaci, I., Zaari, A., Lahlou, S., Trujillo-Pisanty, I., Andrew Chapman, C., & Chaudhri, N. (2020). Dissociable mesolimbic dopamine circuits control responding triggered by alcohol-predictive discrete cues and contexts. *Nat Commun*, *11*(1), 3764. doi: 10.1038/s41467-020-17543-4
- van Ree, J. M., Slangen, J. L., & de Wied, D. (1978). Intravenous self-administration of drugs in rats. *J Pharmacol Exp Ther*, *204*(3), 547-557.
- Van Sickle, M. D., Duncan, M., Kingsley, P. J., Mouihate, A., Urbani, P., Mackie, K., . . . Sharkey, K. A. (2005). Identification and functional characterization of brainstem cannabinoid CB2 receptors. *Science*, *310*(5746), 329-332. doi: 10.1126/science.1115740
- Vanderschuren, L. J., & Pierce, R. C. (2010). Sensitization processes in drug addiction. *Curr Top Behav Neurosci*, *3*, 179-195. doi: 10.1007/7854_2009_21

- Vasileiou, I., Fotopoulou, G., Matzourani, M., Patsouris, E., & Theocharis, S. (2013). Evidence for the involvement of cannabinoid receptors' polymorphisms in the pathophysiology of human diseases. *Expert Opin Ther Targets*, *17*(4), 363-377. doi: 10.1517/14728222.2013.754426
- Vasquez, C., & Lewis, D. L. (1999). The CB1 cannabinoid receptor can sequester G-proteins, making them unavailable to couple to other receptors. *J Neurosci*, *19*(21), 9271-9280.
- Vaughn, L. K., Mantsch, J. R., Vranjkovic, O., Stroh, G., Lacourt, M., Kreutter, M., & Hillard, C. J. (2012). Cannabinoid receptor involvement in stress-induced cocaine reinstatement: potential interaction with noradrenergic pathways. *Neuroscience*, *204*, 117-124. doi: 10.1016/j.neuroscience.2011.08.021
- Vermetten, E., & Bremner, J. D. (2002). Circuits and systems in stress. I. Preclinical studies. *Depress Anxiety*, *15*(3), 126-147. doi: 10.1002/da.10016
- Vezina, P. (2007). Sensitization, drug addiction and psychopathology in animals and humans. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, *31*(8), 1553-1555. doi: 10.1016/j.pnpbp.2007.08.030
- Vlachou, S., & Panagis, G. (2014). Regulation of brain reward by the endocannabinoid system: a critical review of behavioral studies in animals. *Curr Pharm Des*, *20*(13), 2072-2088. doi: 10.2174/13816128113199990433
- Volkow, N. D., & Baler, R. D. (2014). Addiction science: Uncovering neurobiological complexity. *Neuropharmacology*, *76 Pt B*, 235-249. doi: 10.1016/j.neuropharm.2013.05.007
- Volkow, N. D., Fowler, J. S., Wang, G. J., Hitzemann, R., Logan, J., Schlyer, D. J., . . . Wolf, A. P. (1993). Decreased dopamine D2 receptor availability is associated with reduced frontal metabolism in cocaine abusers. *Synapse*, *14*(2), 169-177. doi: 10.1002/syn.890140210
- Volkow, N. D., Hampson, A. J., & Baler, R. D. (2017). Don't Worry, Be Happy: Endocannabinoids and Cannabis at the Intersection of Stress and Reward. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, *57*, 285-308. doi: 10.1146/annurev-pharmtox-010716-104615
- Vranjkovic, O., Gasser, P. J., Gerndt, C. H., Baker, D. A., & Mantsch, J. R. (2014). Stress-induced cocaine seeking requires a beta-2 adrenergic receptor-regulated pathway from the ventral bed nucleus of the stria terminalis that regulates CRF actions in the ventral tegmental area. *J Neurosci*, *34*(37), 12504-12514. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0680-14.2014
- Wade, M. R., Degroot, A., & Nomikos, G. G. (2006). Cannabinoid CB1 receptor antagonism modulates plasma corticosterone in rodents. *Eur J Pharmacol*, *551*(1-3), 162-167. doi: 10.1016/j.ejphar.2006.08.083
- 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*(22), 5389-5396. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0955-05.2005
- Wang, W., Sun, D., Pan, B., Roberts, C. J., Sun, X., Hillard, C. J., & Liu, Q. S. (2010). Deficiency in endocannabinoid signaling in the nucleus accumbens induced by chronic unpredictable stress. *Neuropsychopharmacology*, *35*(11), 2249-2261. doi: 10.1038/npp.2010.99
- Wang, X., Moussawi, K., Knackstedt, L., Shen, H., & Kalivas, P. W. (2013). Role of mGluR5 neurotransmission in reinstated cocaine-seeking. *Addict Biol*, *18*(1), 40-49. doi: 10.1111/j.1369-1600.2011.00432.x
- Ward, S. J., Rosenberg, M., Dykstra, L. A., & Walker, E. A. (2009). The CB1 antagonist rimonabant (SR141716) blocks cue-induced reinstatement of cocaine seeking and other context and extinction phenomena predictive of relapse. *Drug Alcohol Depend*, *105*(3), 248-255. doi: 10.1016/j.drugalcdep.2009.07.002
- Warner, T. A., & Drugan, R. C. (2012). Morris water maze performance deficit produced by intermittent swim stress is partially mediated by norepinephrine. *Pharmacol Biochem Behav*, *101*(1), 24-34. doi: 10.1016/j.pbb.2011.11.009
- Weiss, F. (2005). Neurobiology of craving, conditioned reward and relapse. *Curr Opin Pharmacol*, *5*(1), 9-19. doi: 10.1016/j.coph.2004.11.001
- 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*(8), 4321-4326. doi: 10.1073/pnas.97.8.4321

- Wenger, T., Moldrich, G., & Furst, S. (2003). Neuromorphological background of cannabis addiction. *Brain Res Bull*, *61*(2), 125-128. doi: 10.1016/s0361-9230(03)00081-9
- Westerink, B. H. C., & Justice Jr, J. B. (1991). Microdialysis compared with other in vivo release models *Techniques in the behavioral and neural sciences* (Vol. 7, pp. 23-43 %@ 0921-0709): Elsevier.
- Westlake, T. M., Howlett, A. C., Bonner, T. I., Matsuda, L. A., & Herkenham, M. (1994). Cannabinoid receptor binding and messenger RNA expression in human brain: an in vitro receptor autoradiography and in situ hybridization histochemistry study of normal aged and Alzheimer's brains. *Neuroscience*, *63*(3), 637-652. doi: 10.1016/0306-4522(94)90511-8
- Wilson, R. I., & Nicoll, R. A. (2001). Endogenous cannabinoids mediate retrograde signalling at hippocampal synapses. *Nature*, *410*(6828), 588-592. doi: 10.1038/35069076
- Winters, B. D., Kruger, J. M., Huang, X., Gallaher, Z. R., Ishikawa, M., Czaja, K., . . . Dong, Y. (2012). Cannabinoid receptor 1-expressing neurons in the nucleus accumbens. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *109*(40), E2717-2725. doi: 10.1073/pnas.1206303109
- Wise, R. A., & Morales, M. (2010). A ventral tegmental CRF-glutamate-dopamine interaction in addiction. *Brain Res*, *1314*, 38-43. doi: 10.1016/j.brainres.2009.09.101
- Wiskerke, J., Pattij, T., Schoffelmeer, A. N., & De Vries, T. J. (2008). The role of CB1 receptors in psychostimulant addiction. *Addict Biol*, *13*(2), 225-238. doi: 10.1111/j.1369-1600.2008.00109.x
- Witkiewitz, K., & Marlatt, G. A. (2004). Relapse prevention for alcohol and drug problems: that was Zen, this is Tao. *Am Psychol*, *59*(4), 224-235. doi: 10.1037/0003-066X.59.4.224
- Wolf, M. E. (2016). Synaptic mechanisms underlying persistent cocaine craving. *Nat Rev Neurosci*, *17*(6), 351-365. doi: 10.1038/nrn.2016.39
- Wolf, M. E., & Ferrario, C. R. (2010). AMPA receptor plasticity in the nucleus accumbens after repeated exposure to cocaine. *Neurosci Biobehav Rev*, *35*(2), 185-211. doi: 10.1016/j.neubiorev.2010.01.013
- Wolf, M. E., Sun, X., Mangiavacchi, S., & Chao, S. Z. (2004). Psychomotor stimulants and neuronal plasticity. *Neuropharmacology*, *47 Suppl 1*, 61-79. doi: 10.1016/j.neuropharm.2004.07.006
- Woodhams, S. G., Chapman, V., Finn, D. P., Hohmann, A. G., & Neugebauer, V. (2017). The cannabinoid system and pain. *Neuropharmacology*, *124*, 105-120. doi: 10.1016/j.neuropharm.2017.06.015
- Wu, M., Brudzynski, S. M., & Mogenson, G. J. (1993). Functional interaction of dopamine and glutamate in the nucleus accumbens in the regulation of locomotion. *Can J Physiol Pharmacol*, *71*(5-6), 407-413. doi: 10.1139/y93-061
- Xi, Z. X., Gilbert, J., Campos, A. C., Kline, N., Ashby, C. R., Jr., Hagan, J. J., . . . Gardner, E. L. (2004). Blockade of mesolimbic dopamine D3 receptors inhibits stress-induced reinstatement of cocaine-seeking in rats. *Psychopharmacology (Berl)*, *176*(1), 57-65. doi: 10.1007/s00213-004-1858-y
- Xi, Z. X., Gilbert, J. G., Peng, X. Q., Pak, A. C., Li, X., & Gardner, E. L. (2006). Cannabinoid CB1 receptor antagonist AM251 inhibits cocaine-primed relapse in rats: role of glutamate in the nucleus accumbens. *J Neurosci*, *26*(33), 8531-8536. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0726-06.2006
- Xi, Z. X., Peng, X. Q., Li, X., Song, R., Zhang, H. Y., Liu, Q. R., . . . Gardner, E. L. (2011). Brain cannabinoid CB(2) receptors modulate cocaine's actions in mice. *Nat Neurosci*, *14*(9), 1160-1166. doi: 10.1038/nn.2874
- Xi, Z. X., Ramamoorthy, S., Baker, D. A., Shen, H., Samuvel, D. J., & Kalivas, P. W. (2002). Modulation of group II metabotropic glutamate receptor signaling by chronic cocaine. *J Pharmacol Exp Ther*, *303*(2), 608-615. doi: 10.1124/jpet.102.039735
- Xi, Z. X., Spiller, K., Pak, A. C., Gilbert, J., Dillon, C., Li, X., . . . Gardner, E. L. (2008). Cannabinoid CB1 receptor antagonists attenuate cocaine's rewarding effects: experiments with self-administration and brain-stimulation reward in rats. *Neuropsychopharmacology*, *33*(7), 1735-1745. doi: 10.1038/sj.npp.1301552
- Xie, X., Lasseter, H. C., Ramirez, D. R., Ponds, K. L., Wells, A. M., & Fuchs, R. A. (2012). Subregion-specific role of glutamate receptors in the nucleus accumbens on drug context-induced reinstatement of cocaine-seeking behavior in rats. *Addict Biol*, *17*(2), 287-299. doi: 10.1111/j.1369-1600.2011.00325.x
- Xie, X., & Steketeer, J. D. (2008). Repeated exposure to cocaine alters the modulation of mesocorticolimbic glutamate transmission by medial prefrontal cortex Group II metabotropic glutamate receptors. *J Neurochem*, *107*(1), 186-196. doi: 10.1111/j.1471-4159.2008.05593.x

- Yashiro, K., & Philpot, B. D. (2008). Regulation of NMDA receptor subunit expression and its implications for LTD, LTP, and metaplasticity. *Neuropharmacology*, *55*(7), 1081-1094. doi: 10.1016/j.neuropharm.2008.07.046
- Yu, L. L., Zhou, S. J., Wang, X. Y., Liu, J. F., Xue, Y. X., Jiang, W., & Lu, L. (2011). Effects of cannabinoid CB(1) receptor antagonist rimonabant on acquisition and reinstatement of psychostimulant reward memory in mice. *Behav Brain Res*, *217*(1), 111-116. doi: 10.1016/j.bbr.2010.10.008
- Zahm, D. S. (1999). Functional-anatomical implications of the nucleus accumbens core and shell subterritories. *Ann N Y Acad Sci*, *877*, 113-128. doi: 10.1111/j.1749-6632.1999.tb09264.x
- Zangen, A., Solinas, M., Ikemoto, S., Goldberg, S. R., & Wise, R. A. (2006). Two brain sites for cannabinoid reward. *J Neurosci*, *26*(18), 4901-4907. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3554-05.2006
- Zhang, L. Y., Zhou, Y. Q., Yu, Z. P., Zhang, X. Q., Shi, J., & Shen, H. W. (2021). Restoring glutamate homeostasis in the nucleus accumbens via endocannabinoid-mimetic drug prevents relapse to cocaine seeking behavior in rats. *Neuropsychopharmacology*, *46*(5), 970-981. doi: 10.1038/s41386-021-00955-1
- Zhao, X., Yao, L., Wang, F., Zhang, H., & Wu, L. (2017). Cannabinoid 1 receptor blockade in the dorsal hippocampus prevents the reinstatement but not acquisition of morphine-induced conditioned place preference in rats. *Neuroreport*, *28*(10), 565-570. doi: 10.1097/WNR.0000000000000796
- Zinsmaier, A. K., Dong, Y., & Huang, Y. H. (2021). Cocaine-induced projection-specific and cell type-specific adaptations in the nucleus accumbens. *Mol Psychiatry*. doi: 10.1038/s41380-021-01112-2
- Zoppi, S., Perez Nievas, B. G., Madrigal, J. L., Manzanares, J., Leza, J. C., & Garcia-Bueno, B. (2011). Regulatory role of cannabinoid receptor 1 in stress-induced excitotoxicity and neuroinflammation. *Neuropsychopharmacology*, *36*(4), 805-818. doi: 10.1038/npp.2010.214
- Zou, S., & Kumar, U. (2018). Cannabinoid Receptors and the Endocannabinoid System: Signaling and Function in the Central Nervous System. *Int J Mol Sci*, *19*(3). doi: 10.3390/ijms19030833