



**FACULTAD DE FARMACIA  
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE**

**TRABAJO FIN DE GRADO  
TÍTULO: NUEVOS AVANCES  
FARMACOLÓGICOS EN EL TRATAMIENTO  
DE LAS DROGODEPENDENCIAS**

Autor: Marian de los Ángeles Villarta Aguilera

D.N.I.: 51125796-Q

Tutor: Elena González Burgos

Convocatoria: Febrero 2016

## **Resumen**

Entre los nuevos avances farmacológicos para el tratamiento de las drogodependencias se incluyen las investigaciones relativas al factor neurotrófico derivado de la glía (GDNF). El GDNF promueve la supervivencia y desarrollo de las neuronas dopaminérgicas y ha demostrado ser un potencial agente terapéutico para el tratamiento de adicciones a diferentes drogas. Sin embargo, una de sus principales limitaciones es su incapacidad para atravesar la barrera hematoencefálica (BHE). Es por ello por lo que actualmente se están investigando moléculas capaces de atravesar la BHE y que estimulen la síntesis de GDNF como ibogaína, cabergolina y el dipéptido leucina-isoleucina. Se llevó a cabo una búsqueda bibliográfica sistemática en las bases de datos Pubmed, Google Academic, Biblioteca Cochrane y MEDES (Medicina en español), y se seleccionaron un total de 14 artículos que cumplieran los criterios de inclusión especificados en la metodología. Cinco de los artículos estudiaron el efecto de la ibogaína sobre la síntesis de GDNF y la adicción a drogas; otros cinco estudios, la cabergolina y cuatro investigaciones eran relativas al dipéptido leucina-isoleucina. Los resultados muestran que la cabergolina y la leucina-isoleucina son candidatos potenciales para el tratamiento de la drogodependencia, aunque se necesitan más investigaciones acerca de la toxicidad de las moléculas y la posible interacción con drogas de abuso. La ibogaína presenta cierta toxicidad que no la convierte en una opción plausible, aunque existen algunos análogos de la misma con resultados prometedores. En todos los casos se necesita llevar a cabo más investigaciones para confirmar la seguridad y eficacia de estas moléculas.

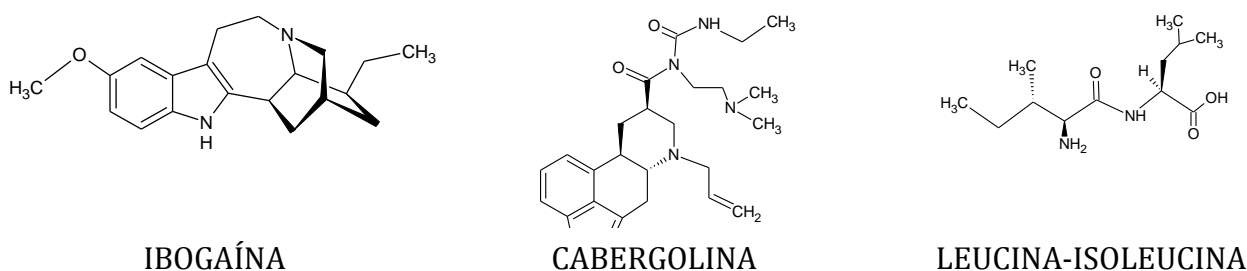
### **1) Introducción y antecedentes**

El consumo y la adicción a sustancias (psicoestimulantes, opioides, nicotina y alcohol, entre otros) se ha convertido en un problema social y de salud a escala mundial<sup>1</sup>. De acuerdo con los datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS), recogidos en el año 2008, el consumo excesivo de alcohol y el uso ilícito de drogas de abuso supone un 5,4% de la carga mundial de morbilidad<sup>2</sup>. En España, la prevalencia de trastornos por consumo de drogas en hombres es del 1,8%, y en mujeres del 0,57%<sup>2</sup>. En cuanto a los trastornos causados por el consumo abusivo de alcohol, las prevalencias en nuestro país son 1,07% para hombres y 0,17% para mujeres<sup>2</sup>. La prevención y educación ante este tipo de problemas es de vital importancia para reducir la prevalencia, ya que los tratamientos para superar la adicción a drogas son limitados<sup>3,4</sup>.

La adicción a drogas es un trastorno crónico por el cual el individuo se obsesiona con la búsqueda y consumo de la droga a la cual es adicto a pesar de ser consciente de las consecuencias negativas que la administración de esa droga puede conllevar<sup>5</sup>. En general, las drogas se podrían clasificar como reforzadores positivos (si producen sensación de euforia y placer) o negativos (en caso de que su efecto esté ligado al alivio de los síntomas de la abstinencia). El uso continuado produce en el sistema nervioso central adaptaciones y cambios que finalmente dan lugar al desarrollo de tolerancia, dependencia física, búsqueda compulsiva, sensibilización, recaídas y síndrome de abstinencia. Las drogas de abuso afectan (además de a otras estructuras y sistemas), y en diferente medida en función de la droga que se trate, al circuito mesocorticolímbico dopaminérgico, en el que los cuerpos de las neuronas dopaminérgicas, que se encuentran en el área tegmental ventral, emiten sus proyecciones hacia estructuras límbicas como la amígdala, el núcleo accumbens o el hipocampo. Al igual que los reforzadores naturales, las drogas dan lugar a la liberación de dopamina en estas estructuras, responsable finalmente de la sensación de euforia y placer<sup>5, 6</sup>. Ante un consumo continuado, la liberación anómala de dopamina conduce a una activación alterada de diferentes cascadas intracelulares que darán lugar, en último término, a la alteración de la transcripción génica y, a la inducción de cambios en las neuronas y circuitos neuronales<sup>7</sup>.

Numerosos estudios de investigación tienen por objeto profundizar sobre los mecanismos moleculares implicados en la adicción, y en base a ese conocimiento, desarrollar nuevos fármacos. Una de las corrientes más actuales se centra en el estudio del papel de los factores neurotróficos en la adicción a drogas, particularmente del factor neurotrófico derivado de la glía (GDNF, *Glial cell line-derived neurotrophic factor*). Aislado por primera vez en 1993<sup>6</sup>, el GDNF es un factor neurotrófico que ha demostrado un papel esencial en el desarrollo y supervivencia de las neuronas dopaminérgicas<sup>6</sup>. Además, recientes estudios realizados con roedores sugieren que el GDNF ejerce un potencial efecto protector frente a la adicción a las drogas de abuso (cocaína, etanol, metanfetamina y morfina). El GDNF activa su cascada de señalización a través primero de su unión con el co-receptor GFR $\alpha$ 1 (*GDNF family receptor  $\alpha$ 1*)<sup>6</sup> y posteriormente mediante la activación del receptor Ret (reorganizado durante la transfección, *Rearranged during transfection*) a través de la unión a éste del complejo formado por el co-receptor GFR $\alpha$ 1 y el GDNF. GFR $\alpha$ 1 es una proteína que puede bien estar anclada a la membrana celular por glicosilfosfatidilinositol o bien encontrarse en forma soluble. De acuerdo con esto, la señalización puede clasificarse como *cis*, o *trans*. En caso de que GFR $\alpha$ 1 se encuentre anclado a la membrana celular y la unión entre GFR $\alpha$ 1 y Ret se produzca debido al acercamiento de ambos receptores en la membrana celular, la

señalización sería de tipo *cis*. La señalización *trans*, en cambio, tendría lugar cuando el GFR $\alpha$ 1 se encuentra en forma soluble<sup>6</sup>. Las balsas lipídicas son secciones especiales de la membrana celular con una elevada presencia de colesterol, esfingolípidos y proteínas ancladas a la membrana mediante glucosil-fosfatidil inositol, y se cree que juegan un papel muy importante en la señalización de los factores de crecimiento en neuronas. En el caso del GDNF, tras la unión del GDNF al GFR $\alpha$ 1, el receptor Ret es atraído a las balsas lipídicas para activar la cascada de señalización. El receptor Ret es un receptor de tipo tirosin-quinasa, de modo que tras la activación del complejo se produce la autofosforilación del receptor<sup>6</sup> dando lugar al inicio de varias cascadas (siendo *Mitogen-Activated Protein Kinase* o MAPK, *Extracellular Signal-Regulated Kinase* o ERK1/2, *Phosphatidylinositol 3 kinase* o PI3K y la vía de la fosfolipasa C o PLC  $\gamma$  las principales)<sup>8</sup>. A pesar de los prometedores resultados que se han obtenido, el GDNF a día de hoy no puede emplearse como fármaco en el tratamiento de la dependencia a drogas ya que se trata de una proteína que no puede atravesar la barrera hematoencefálica<sup>9</sup>, y sería necesaria una administración intracerebral o intracerebroventricular que no sería adecuada o aplicable para pacientes adictos. Además, el GDNF no es estable frente a la acción de las proteasas del torrente circulatorio, lo que supone otro inconveniente para su administración por una vía distinta de las expuestas anteriormente<sup>6</sup>. De este modo, una de las posibles alternativas que se plantea es el empleo de pequeñas moléculas que atraviesen la barrera hematoencefálica y sean capaces de potenciar la síntesis de GDNF o activar sus receptores como son los compuestos ibogaína, cabergolina y el dipéptido leucina-isoleucina (Figura 1) en las que nos centraremos en este trabajo<sup>6</sup>.



**Figura 1.** Estructuras químicas de la ibogaína, cabergolina y la leucina-isoleucina.

## 2) Objetivos

El objetivo de la presente revisión bibliográfica es conocer y profundizar en el efecto de las moléculas ibogaína, cabergolina y el dipéptido leucina-isoleucina sobre la producción de GDNF en el tratamiento de diferentes drogodependencias.

### 3) Metodología

Se ha realizado una revisión bibliográfica de la literatura empleando las bases de datos Pubmed, Google Academic, Biblioteca Cochrane y MEDES (Medicina en español). La búsqueda de los artículos se ha llevado a cabo usando los descriptores en inglés “*GDNF*”, “*addiction*”, “*psychostimulants*”, “*opioids*”, “*ethanol*”, “*ibogaine*”, “*cabergoline*” y “*ile leu*”, y el operador booleano “*and*”, usando diferentes combinaciones de los mismos.

Se han tenido en cuenta los siguientes criterios de inclusión:

1. La búsqueda se ha realizado sin restricciones temporales. Los artículos encontrados abarcan desde el año 2003 al 2015.
2. Los artículos consultados están redactados en inglés o español.
3. Los artículos incluidos en esta revisión se refieren a estudios *in vitro*, *in vivo* o ensayos clínicos.
4. Aquellos estudios en los que se llevan a cabo experimentos de adicción y emplean como drogas sustancias psicoestimulantes (metanfetamina y cocaína), opioides (morfina) o etanol.
5. Los artículos que se han seleccionado son estudios en los que alguna de las tres moléculas que se investigan (ibogaína, cabergolina, leucina-isoleucina):
  - a. produce un aumento de GDNF.
  - b. muestra un papel protector frente a la acción de una droga determinada.
  - c. da lugar a un aumento en la síntesis de GDNF y además esto se correlaciona con una disminución de los efectos asociados a la drogodependencia.

### 4) Resultados y discusión

En la revisión se han identificado un total de 14 publicaciones que cumplen con los criterios de inclusión descritos en la metodología utilizada. Del total de las publicaciones seleccionadas hay cinco trabajos que centran su investigación en la ibogaína y sus análogos<sup>3,10-13</sup> (Tabla 1), cinco que estudian el compuesto cabergolina<sup>4,14,17</sup> (Tabla 2), y cuatro estudios sobre el dipéptido leucina-isoleucina<sup>1,18-20</sup> (Tabla 3). (Figura 2).

#### *Ibogaína*

La ibogaína, alcaloide presente en la raíz del arbusto africano *Tabernanthe iboga*, es uno de los compuestos más estudiados por sus propiedades antiadictivas frente a diferentes drogas (alcohol, opioides, cocaína) investigadas tanto en humanos<sup>13</sup> como en roedores<sup>13</sup>. Uno

de los mecanismos de acción de la ibogaína más estudiados a día de hoy es el papel regulador que ejerce sobre los factores neurotróficos y sus cascadas de señalización<sup>13</sup>. Relacionado con ello, Dao-Yao He y sus colaboradores investigaron en 2005 el efecto al que la administración de ibogaína daba lugar en cultivos celulares y en roedores<sup>10</sup>. A nivel de cultivo celular, emplearon las líneas celulares de neuroblastoma humano SH-SY5Y que fueron expuestas a diferentes concentraciones de ibogaína y durante diferentes tiempos. El resultado mostró que la exposición a ibogaína da lugar a un incremento de mRNA de GDNF (detectado mediante PCR) y del propio GDNF (medido mediante la técnica ELISA) de manera tiempo y dosis dependiente. Asimismo, concluyeron que el aumento de mRNA en el interior celular conduce de manera proporcional a un incremento de GDNF en el medio, y a una potenciación de la activación del receptor Ret y de las cascadas de señalización iniciadas a partir de la fosforilación de este receptor (MAPK, ERK1/2). En cuanto a las investigaciones llevadas a cabo en roedores por este grupo, se demostró que la administración de ibogaína supone una disminución en la auto-administración de etanol sostenida en el tiempo en ratas que han tenido una exposición previa al mismo y han desarrollado adicción. Este efecto se manifestó tanto con una administración sistémica de la ibogaína como con una administración *in situ*, directamente en el área tegmental ventral. Asimismo, se midió un incremento de mRNA de GDNF en el mesencéfalo de los ratones tras la administración sistémica de ibogaína. Finalmente, este grupo concluyó que la reducción de la autoadministración de etanol producida por la ibogaína está mediada por el GDNF.

La ibogaína da lugar a unos efectos antiadictivos sostenidos en el tiempo, de acuerdo con los resultados obtenidos en varias investigaciones<sup>11</sup>, entre las que se encuentran el artículo previamente descrito<sup>13</sup>. Un año más tarde, un estudio publicado por Dao-Yao He y Dorit Ron<sup>11</sup> investigó la causa de la extensión de los efectos antiadictivos de la ibogaína empleando la línea celular SH-SY5Y. Se demostró que una exposición corta a ibogaína da lugar al aumento de mRNA de GDNF en las células del cultivo. También condujo al incremento de los niveles de receptor Ret fosforilado, lo que se traduce en una potenciación de la cascada de señalización del GDNF, resultados ya expuestos en el estudio previo de 2005<sup>13</sup>. Sin embargo, la importancia de este estudio radica en el descubrimiento de que los efectos sostenidos de la ibogaína se deben a la activación de un bucle de autoregulación del GDNF. Es decir, la ibogaína potencia en un primer momento la síntesis de GDNF y éste estimula su propia síntesis. Tanto el incremento de GDNF inducido por la ibogaína como por el propio GDNF se llevan a cabo a través de la cascada de señalización de MAPK. Finalmente, este estudio

concluyó que en exposiciones cortas a ibogaína, la activación del bucle autorregulador de GDNF no precisa de la síntesis de proteínas, es decir, no es necesario que se sintetice completamente el GDNF para inducir su propia síntesis; el mRNA es suficiente.

Siguiendo la misma línea de investigación, en 2007 Dao-Yao He y Dorit Ron<sup>12</sup> fueron más allá y estudiaron cómo podría actuar el GDNF en sus efectos protectores frente a drogas. La exposición crónica a diferentes drogas da lugar al aumento de los niveles de tirosin hidroxilasa, una enzima que cataliza el paso limitante en la biosíntesis de la dopamina (entre otras catecolaminas). El aumento de niveles se debe a la asociación de la tirosin hidroxilasa con la chaperona HSP90, que estabiliza la enzima. El GDNF inhibe esta asociación, lo que conlleva a la disminución de los niveles de tirosin hidroxilasa. Para verificar esta teoría, se llevaron a cabo experimentos empleando de nuevo la línea celular SH-SY5Y que se trató con etanol. Posteriormente, se añadió GDNF en algunos de los cultivos e ibogaína en otros. Se confirmó que la exposición prolongada a etanol incrementaba los niveles de tirosin hidroxilasa en esta línea celular, de manera dosis dependiente y mantenida en el tiempo tras la última exposición a alcohol etílico. Además, los cultivos a los que posteriormente se había añadido GDNF o ibogaína, demostraron revertir el incremento de la tirosin hidroxilasa producido por el etanol. En el caso de la ibogaína, se comprobó que esa acción se había llevado a cabo vía GDNF. Para ello, los cultivos se sometieron a una exposición a etanol y posteriormente se añadió bien ibogaína o ibogaína e inhibidores de la cascada de señalización del GDNF. Al comparar ambos cultivos, las células que habían estado únicamente expuestas a ibogaína dieron lugar a una disminución de los niveles de tirosin hidroxilasa; no así las células que además habían estado expuestas a los bloqueantes de la cascada de señalización del GDNF, lo que demuestra que la ibogaína ejerce su acción vía GDNF.

Sin embargo, a pesar de los prometedores resultados de la ibogaína como posible sustancia para el tratamiento de la adicción a drogas, no es adecuado debido a los efectos adversos que produce: alucinaciones, bradicardia, temblores y bradicardia<sup>3</sup>. En ratas, además, a dosis de 100 mg/kg produce muerte de las células de Purkinje, situadas en el cerebelo<sup>3</sup>. En 2010 se publica otra investigación en la que se estudian los efectos de dos derivados de la ibogaína sobre la producción de GDNF en la línea celular SH-SY5Y y sobre el comportamiento de ratas en un estudio de *operant ethanol self-administration*<sup>3</sup>. Uno de los derivados empleados es la noribogaína (12-hidroxibogamina), metabolito mayoritario obtenido tras la metabolización de la ibogaína por el citocromo P4502D6<sup>3</sup> sobre el que ya se han realizado estudios que exponen un papel anti-adictivo similar a la ibogaína, pero sin los efectos secundarios que ésta conlleva<sup>3</sup>. El otro derivado 18-Metoxicoronaridina, 18-MC es de

**Tabla 1.** Estudios realizados con ibogaína.

<b>Compuesto</b>	<b>Tipo de estudio</b>	<b>Modelo de estudio</b>	<b>Parámetros medidos/técnicas empleadas</b>	<b>Resultados</b>	<b>Referencias</b>
Ibogaína	<i>In vitro</i>	Cultivo celular SH-SY5Y	- mRNA GDNF: RT-PCR - Proteína GDNF: ELISA - Activación vías señalización GDNF: inmunoprecipitación y WB - mRNA GDNF (exposición ibogaína y GDNF): RT-PCR -Activación (fosforilación) receptor <i>Ret</i> -Niveles TH (exposición a etanol/GDNF/ibogaína): WB e inmunoprecipitación -Niveles expresión de GDNF (noribogaína/18- MC): RT-PCR	-↑ mRNA GDNF -↑ proteína GDNF -↑ activación vía de señalización GDNF -↑ activación receptor <i>Ret</i> -↑ TH (etanol) y ↑ TH (GDNF/ibogaína)	[3,10-13]
		Cultivo celular C6 (glioma rata)	-Niveles GDNF (exposición a XL-008): ELISA	-↑ niveles GDNF	
	<i>In vivo</i>	Ratas adultas Long Evans	-Auto-administración etanol (vía sistémica y VTA de ibogaína) -Auto-administración etanol (noribogaína/18- MC en VTA)	-↓ Auto-administración de etanol -↓ significativa auto-administración etanol (noribogaína)	
		Ratones C57BL/6	-Niveles mRNA GDNF en mesencéfalo :RT-PCR	-↑ mRNA GDNF	



**Tabla 2.** Estudios realizados con cabergolina.

Compuesto	Tipo de estudio	Modelo de estudio	Parámetros medidos/técnicas empleadas	Resultados	Referencias
Cabergolina	<i>In vitro</i>	Cultivo astrocitos de ratón	-Niveles GDNF: ELISA -mRNA GDNF: RT-PCR	-↑ proteína GDNF -↑ mRNA GDNF	[14, 15,17]
		Cultivo celular SH-SY5Y	-mRNA GDNF: RT-PCR -Proteína GDNF: ELISA -Activación (fosforilación) receptor <i>Ret</i> : WB	-↑ niveles mRNA GDNF -↑ proteína GDNF -↑ fosforilación receptor <i>Ret</i>	
	Ensayos clínicos	Aleatorio, ciego, dos grupos paralelos de pacientes adictos a cocaína, y controlado por placebo.	-Benzoilecgonina urinaria, encuestas, clínica global	-↓ consumo de cocaína	[4]
		Aleatorio, cuatro grupos paralelos de pacientes adictos a cocaína y controlado por placebo	-Benzoilecgonina urinaria, encuestas, clínica global	-↓ consumo de cocaína	[16]
	<i>In vivo</i>	Ratas Long Evans	-mRNA GDNF: RT-PCR - <i>Operant self-administration</i> de etanol (administración cabergolina sistémica/ VTA) -Búsqueda de etanol en un periodo de extinción -Recaída tras un periodo de abstinencia	-↑ niveles GDNF -↓ auto-administración etanol -↓ búsqueda etanol -↓ recaída consumo etanol	[17]
		Ratones C57BL/6	-Prueba de elección de dos botellas	-↓ consumo de etanol sin alterarse el consumo de agua	
		Ratones heterocigotos para el gen GDNF	-mRNA GDNF: RT-PCR -Consumo etanol	-No se elevaron los niveles GDNF	

**Tabla 3.** Estudios realizados con leucina-isoleucina.

Compuesto	Tipo de estudio	Modelo de estudio	Parámetros medidos/técnicas empleadas	Resultados	Referencias
Leucina-isoleucina	<i>In vitro</i>	Cultivo de neuronas	- Niveles GDNF: EIA	-↑ niveles GDNF	[1,18]
		Cultivo de neuronas de hipocampo	-Niveles mRNA GDNF (sin/con ODN-antisentido): RT-PCR	-↑ niveles mRNA GDNF (sin ODN-antisentido)	[19]
	<i>In vivo</i>	Ratones C57BL/6J y Ratones heterocigotos C57BL/6J-GDNF	-Niveles GDNF (co-administración metanfetamina y Leu-Ile): EIA (solo en Ratones C57BL/6) -Estudio CPP inducido por metanfetamina -Niveles GDNF en núcleo accumbens (co-administración morfina y Leu-Ile): EIA -Estudio CPP inducido por morfina	-↑ niveles GDNF -↓ preferencia condicionada por metanfetamina (solo en Ratones C57BL/6) -↓ preferencia condicionada por morfina (sólo en ratones C57BL/6J)	[1,20]
		Ratones	-Niveles GDNF en mesencéfalo -Número rotaciones (administración metanfetamina)	-↑ niveles de GDNF -↓ número de rotaciones	[18]

origen sintético y, al igual que la noribogaína, parece también producir los efectos positivos de la ibogaína sin los efectos secundarios inherentes a ésta<sup>3</sup>. Los resultados de este trabajo demostraron que la noribogaína incrementa la expresión de GDNF de manera similar a la ibogaína. Sin embargo, el compuesto 18-MC produjo sólo un muy pequeño incremento de la expresión de GDNF. Este grupo llevó a cabo, además, experimentos de comportamiento con ratas que habían sido entrenadas para administrarse etanol a sí mismas, con previa exposición al mismo y generación de adicción. Se llevaron a cabo administraciones de noribogaína y 18-MC directamente en el área tegmental ventral de estas ratas, y se valoraron las respuestas que mostraron. Las ratas que recibieron noribogaína experimentaron una reducción significativa en la auto-administración de etanol, no así aquellas que habían recibido 18-MC. Estos resultados indican que la noribogaína tiene efectos antiadictivos similares a la ibogaína, que de igual forma se producen vía GDNF. El derivado sintético 18-MC, en cambio, aunque en otros estudios ha demostrado reducir el consumo de etanol en ratas<sup>3</sup>, los resultados de esta investigación muestran que su lugar de acción no sería el área tegmental ventral probablemente, ni sus efectos estarían mediados por el GDNF.

En el año 2015 se publicó el artículo más reciente en relación a la ibogaína (en concreto, un análogo de ibogaína) y el GDNF<sup>13</sup>. En esta investigación se empleó el análogo de ibogaína XL-008, se planteó su síntesis y se estudió su capacidad para incrementar la producción de GDNF en células C6 de glioma de rata. XL-008 es un análogo acíclico de ibogamina (la ibogamina, a su vez es un análogo de ibogaína que en posición 12 tiene un H en lugar de un grupo metoxi), que posee una desconexión entre la isoquinclidina y la posición 2 del indol. Su síntesis se lleva a cabo mediante una reacción de Diels-Alder a partir de dihidropiridina y metilvinilcetona, que tras una reducción da lugar a las formas *endo*- y *exo*- de las isoquinclidinas. La forma *endo* dará lugar al compuesto XL-008 tras ser desprotegido y alquilado con bromoetilindol, y la *exo* generará la ibogamina tras un proceso similar y una ciclación bajo condiciones reductoras Heck. Tras la síntesis, este nuevo compuesto se estudia sobre células C6 de glioma, modelo de astrocito conocido por su capacidad para generar mRNA de GDNF así como del receptor Ret y el co-receptor GFR $\alpha$ 1<sup>13</sup>. Las células se incubaron con los compuestos experimentales (XL-008, entre otros análogos de ibogamina) durante 24 y 48 horas y posteriormente se midieron los niveles de GDNF mediante ELISA. XL-008 se reveló como un potente inductor de la síntesis de GDNF, aunque en aquellos cultivos que habían estado expuestos durante 48 horas, se detectó una marcada citotoxicidad, lo que conllevó a que los estudios de GDNF se realizaran finalmente con tratamientos de no más de 24 horas. Este estudio, además fue más allá. La liberación de GDNF es potenciada por

el factor de crecimiento de fibroblastos FGF-2<sup>13</sup>, por lo que se decidió plantear cuál es el efecto de los análogos de ibogamina (en concreto, XL-008) sobre esta inducción. De nuevo, el análogo XL-008 se descubrió como un potenciador de esta vía por la cuál el FDF-2 induce la liberación de GDNF.

### *Cabergolina*

La cabergolina es un agonista dopaminérgico que actúa fundamentalmente sobre el receptor D2, y débilmente sobre el D1<sup>14</sup>. Ohta y colaboradores<sup>14</sup> analizaron el efecto de la cabergolina sobre la expresión de GDNF en cultivos de astrocitos de ratón que fueron expuestos a diferentes concentraciones de cabergolina. Los resultados demostraron que la cabergolina incrementa tanto los niveles de mRNA (medidos mediante PCR) como los de la proteína GDNF (determinados mediante la técnica ELISA) en los cultivos de astrocito de ratón. De este modo, la cabergolina se desveló como un potente inductor de la síntesis de GDNF.

Un año más tarde, se publicó un artículo<sup>15</sup> en que se estudiaba de nuevo la cabergolina como inductor de varios factores neurotróficos. De nuevo, los resultados mostraron que la cabergolina estimula la síntesis GDNF, al parecer, en parte, por su papel agonista del receptor dopaminérgico D2. Sin embargo, estos estudios todavía no habían relacionado la cabergolina con su posible papel contra la drogadicción.

En el año 2005<sup>4</sup> se realizó por primera vez un ensayo clínico doble ciego, aleatorizado, controlado por placebo en grupos paralelos con el fin de evaluar el efecto de la cabergolina en el tratamiento de la adicción a cocaína. El ensayo se extendió durante ocho semanas. Para valorar los resultados, se realizaron mediciones del metabolito benzoilecgonina de la cocaína en orina, se evaluó la búsqueda compulsiva de cocaína, la depresión y la impresión clínica global, entre otros. La cabergolina demostró suficientes efectos como posible tratamiento en la adicción a cocaína para ser estudiada en más profundidad.

Shoptaw y sus colaboradores llevaron a cabo otro ensayo clínico realizado en el mismo año<sup>16</sup>, comparando los resultados obtenidos en cuatro grupos de pacientes que sufrían dependencia a cocaína y que recibieron 3 fármacos dopaminérgicos (siendo la cabergolina uno de ellos) y placebo. Se trata de un ensayo de cuatro grupos paralelo y aleatorizado. Al igual que en el caso anterior, el estudio se extendió durante 8 semanas y los resultados se valoraron a través de la medida de metabolitos de cocaína en orina, entrevistas con los pacientes donde ellos informaban del consumo que habían tenido de cocaína durante el tratamiento, búsqueda compulsiva de la droga y la mejora clínica y estado de ánimo. De

nuevo, la cabergolina mostró diferencias significativas en cuanto a los metabolitos de cocaína detectados en orina frente a placebo, así como una tendencia descendente en los valores absolutos de los metabolitos de orina medidos a lo largo del estudio. A pesar de ello, se emplearon dosis bajas ya que tampoco se conocían las posibles interacciones entre la cabergolina y la cocaína, que en principio, y de acuerdo con los datos de este artículo, no se producen con la dosis semanal de 0,5 mg de cabergolina. Los autores proponen, al igual que en el artículo anterior, seguir realizando investigaciones sobre este compuesto debido a los prometedores resultados que se han obtenido y la suficiente evidencia que lo avala.

Los estudios que se han revisado hasta ahora únicamente muestran la capacidad de la cabergolina para inducir el aumento de GDNF y sus posibles efectos reductores del consumo de cocaína, por separado. En 2008 se lleva a cabo un estudio que combina la capacidad de la cabergolina para aumentar los niveles de GDNF y para disminuir el consumo de etanol<sup>17</sup>. En primer lugar, se confirma que la administración sistémica de cabergolina produce un aumento en los niveles de mRNA medidos en el mesencéfalo. Se verificó, posteriormente, que el incremento de estos niveles del mensajero en efecto conduce a un aumento de la síntesis de la proteína. Se empleó para ello una línea celular de tipo SH-SY5Y, donde la exposición a cabergolina supuso un aumento de mRNA de GDNF, que se correlacionó con un incremento significativo de la proteína. Además, mediante la medida de los niveles de fosforilación del receptor Ret del GDNF, se verificó que el aumento de GDNF conducía a una activación de su cascada de señalización. A continuación, se llevaron a cabo experimentos de comportamiento en ratas para determinar si la cabergolina disminuía su consumo de etanol. Las ratas habían sido entrenadas para auto-administrarse etanol al presionar una palanca, tras una exposición previa al mismo que había originado cierta adicción al alcohol étílico. Antes de llevar a cabo las sesiones para evaluar el comportamiento de las ratas, éstas recibían una administración sistémica de cabergolina. Tras completar el procedimiento, empleando varias dosis de cabergolina, se verificó que, de una manera dosis dependiente, la administración de cabergolina supuso una disminución en la auto-administración de etanol, y no afectó a la auto-administración de una solución de sacarosa, que se estudió de manera paralela para comprobar que los potenciales efectos de la cabergolina como anti-adictivo no se debían a una atenuación de la actividad motora o falta de motivación. Se valoró también el deseo de búsqueda del alcohol por parte de las ratas, y de nuevo el tratamiento previo con cabergolina conllevó un descenso estadísticamente significativo del número de presiones sobre la palanca ligada al etanol. En resumen, de acuerdo con estos dos estudios de comportamiento, el tratamiento con cabergolina previo al experimento conlleva una disminución de tanto la auto-

administración de etanol como la búsqueda del mismo. Además se estudió también cómo afectaba la cabergolina a la recaída y a la búsqueda de etanol tras un periodo de abstinencia, obteniéndose de nuevo resultados favorables en las ratas que habían recibido cabergolina previamente. Al igual que en los estudios realizados con ibogaína, este grupo de investigación decidió comprobar si los efectos producidos por la cabergolina se debían a su acción sobre el área tegmental ventral, o, si en cambio, su lugar de acción era otro. Para ello se realizaron de nuevo experimentos de comportamiento administrando cabergolina directamente en la zona del área tegmental ventral, y así poder comprobar si éste es su lugar de acción. Además se investigó la administración de varias dosis de cabergolina en una zona adyacente dopaminérgica, la sustancia negra. Las administraciones en el área tegmental ventral de cabergolina resultaron en una disminución de la auto-administración de etanol, mientras que en la sustancia negra sólo las dosis más elevadas de cabergolina mostraron algún efecto, posiblemente debido al paso de una zona a otra. Otra parte del estudio sometió a ratones que recibieron una administración sistémica de cabergolina a un procedimiento por el cuál los ratones estaban expuestos a dos botellas, una de las cuáles contenía una solución alcohólica y la otra únicamente agua. Los resultados mostraron que los ratones tratados con cabergolina disminuían su consumo de la botella que contenía etanol con respecto a los que habían recibido un vehículo, sin que se viera afectado el consumo de agua. Se incluyeron además experimentos con una solución de sabor amargo que contenía quinina y una solución de sacarosa, con el fin de averiguar si el descenso de consumo de etanol podía deberse a cambios en el sentido del gusto o a afectación motora. La auto-administración de quinina no se vio afectada tras la administración de cabergolina, y la de la solución de sacarina mostró una ligera tendencia a disminuir. Aun así, el conjunto de los datos sugiere que la cabergolina no afecta ni al gusto ni al sistema locomotor. Finalmente, se utilizaron ratones modificados genéticamente que poseían solo un alelo del gen codificante del GDNF, es decir, heterocigotos para ese gen. La administración de cabergolina no supuso un incremento de GDNF ni una disminución de los comportamientos relacionados con el etanol en estos ratones, en comparación con aquellos que poseían ambos alelos del gen de GDNF.

#### *Dipéptido isoleucina-leucina*

Existen algunos inmunosupresores que han mostrado efectos neuroprotectores como el FK506 (tacrolimus)<sup>21</sup>. El mecanismo de acción de esta molécula, como inmunosupresor, se basa en la unión a inmunofilinas, bloqueando la proliferación de linfocitos T. Investigando si los efectos neuroprotectores de este tipo de inmunosupresores estaban relacionados con los

factores neurotróficos, se publicó en 2004 un estudio que propuso tres moléculas, tres dipéptidos hidrófobos (leucina-isoleucina, leucina-prolina, y prolina-isoleucina) para estudiar su efecto sobre la producción de GDNF y BDNF (Brain Derived Neurotrophic Factor) y cómo ello afectaba a la muerte neuronal<sup>18</sup>. Esos tres compuestos fueron elegidos debido a su parecido con la estructura del FK506 que se une a las inmunofilinas. En primer lugar, estudiaron cómo afectaban estos compuestos a la muerte neuronal en ratones, empleando ratones en estado natural y ratones modificados genéticamente que carecían de alguno de los alelos de los genes de GDNF o BDNF. De los tres dipéptidos propuestos, únicamente la leucina-isoleucina demostró ser protectora de la muerte neuronal, sólo en aquellos ratones que mantenían sus genes codificantes de GDNF intactos. Posteriormente se comprobaron cuáles eran los efectos de la administración tanto intraperitoneal como intracerebroventricular de este dipéptido (leucina-isoleucina) sobre la producción de GDNF y BDNF. Los niveles de los dos factores neurotróficos aumentaron tras la administración de leucina-isoleucina. Este artículo también incluyó estudios relacionados con la administración de drogas; en concreto midió las rotaciones de ratones tras la administración de metanfetamina, comparando los resultados de aquellos que habían recibido previamente una administración de leucina-isoleucina con los que no, obteniendo los primeros valores inferiores de rotaciones inducidas por metanfetamina. Finalmente, se comprobaron las posibles acciones inmunosupresoras del dipéptido en comparación a las de FK506 (tacrolimus); sin embargo, estos efectos no se manifestaron, por lo que, de acuerdo con estos resultados, la leucina-isoleucina parece restringir sus acciones a las neuroprotectoras.

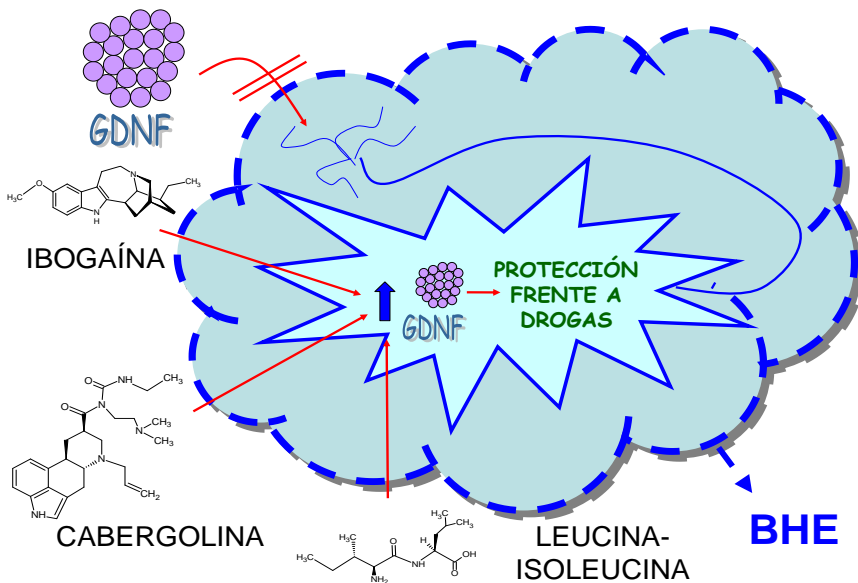
Otro estudio publicado en 2006 profundizó más en los mecanismos de acción del dipéptido leucina-isoleucina en cuanto al aumento del GDNF<sup>19</sup>. De nuevo se emplearon los tres dipéptidos utilizados en el estudio anterior (leucina-isoleucina, leucina-prolina, y prolina-isoleucina), que fueron expuestos en cultivos primarios de neuronas de hipocampo. Al igual que en el caso anterior, sólo el dipéptido leucina-isoleucina demostró incrementar la producción de GDNF en este tipo de cultivo, que se midió a través de sus niveles de mRNA mediante una RT-PCR a tiempo real. Además, sus experimentos concluyeron con el resultado de que el factor de transcripción CREB (*cAMP response element-binding protein*) está implicado en la regulación de la transcripción del gen de GDNF que se induce en los cultivos expuestos a leucina-isoleucina. El dipéptido atravesaría la membrana neuronal a través de un transportador que no se logró identificar, y se uniría a la proteína Hsc70, lo que daría lugar a niveles elevados de Akt fosforilado (y, por tanto, activado), que finalmente conllevaría a

niveles elevados de CREB fosforilado, que se relacionaron con la elevación de la producción de GDNF.

De este modo, ya se había demostrado que el dipéptido leucina-isoleucina incrementa los niveles de GDNF tanto *in vivo* como *in vitro*. En el año 2006 se publicó un artículo en el que la leucina-isoleucina no solo se revela como una sustancia capaz de incrementar los niveles de GDNF, sino que además se realizan experimentos comprobando su papel en la adicción a drogas, en concreto a la metanfetamina<sup>1</sup>. En primer lugar se midieron, mediante enzima inmunoensayo (EIA) los niveles de GDNF producidos en un cultivo de neuronas que habían estado expuestas al dipéptido leucina-isoleucina. Los niveles de mRNA de GDNF se incrementaron considerablemente tras la exposición al dipéptido, en comparación con el grupo control. Se midieron también los niveles de GDNF en el núcleo accumbens de ratones, tras la administración de leucina-isoleucina o vehículo previa a una dosis de metanfetamina. La metanfetamina incrementó los niveles de GDNF, pero los ratones que habían sido tratados con leucina-isoleucina, tuvieron un aumento mayor del factor neurotrófico. También se midieron los niveles de GDNF en ratones que, tras un tratamiento con metanfetamina, y una exposición a un período de abstinencia en el cual se les administraba un vehículo o leucina-isoleucina, recibieron una dosis aguda de metanfetamina. De nuevo se observaron incrementos mayores de GDNF en los ratones que habían recibido el dipéptido en comparación a los que sólo habían recibido un vehículo. Finalmente se llevaron a cabo los estudios de comportamiento, a través de un paradigma de *conditioning place preference* en el que los ratones empleados se exponen a un dispositivo con dos compartimentos con diferencias en el suelo, y se les entrena para relacionar uno de los compartimentos con los efectos de una droga (en este caso, la droga empleada es, de nuevo, la metanfetamina). Posteriormente, sin administración de la droga, se midieron los tiempos respectivos que el ratón pasa en cada uno de los compartimentos. En este estudio, los ratones tratados con metanfetamina demostraron emplear más tiempo en el compartimento asociado a la droga, lo que estaría relacionado con los efectos de búsqueda de recompensa. Aquellos ratones que, previa administración de metanfetamina durante los días de tratamiento, habían recibido una dosis de leucina-isoleucina, demostraron una preferencia por el compartimento asociado a la droga menor que los que habían recibido un vehículo. La leucina-isoleucina no mostró ninguna tendencia a producir preferencia por algún compartimento en sí misma. Se llevaron a cabo, además, experimentos para comprobar los efectos de la leucina-isoleucina sobre el incremento de la actividad motora en ratones que habían recibido una dosis de metanfetamina. El dipéptido sí demostró disminuir esta tendencia a día 8 del estudio. También se estudió el



efecto si la leucina-isoleucina era administrada después de la adquisición de la preferencia por un compartimento asociado a la droga, y, de nuevo, los resultados fueron favorecedores para el dipéptido. Finalmente, para verificar que la leucina-isoleucina media sus efectos protectores vía GDNF, se realizaron experimentos de comportamiento empleando animales heterocigotos para el gen de GDNF, en los que los efectos de la leucina-isoleucina fueron marcadamente menores, permitiendo que se desarrollara una preferencia al compartimento asociado con la droga.



**Figura 2.** Mecanismo de acción de ibogaína, cabergolina y leucina-isoleucina en relación al GDNF.

comparación a aquellos ratones que únicamente habían recibido vehículo. La administración previa a la morfina de leucina-isoleucina llevó a una potenciación del incremento de GDNF inducido por la morfina. Se realizaron también ensayos con heterocigotos para el gen de GDNF, de modo que, a dosis bajas de morfina, los ratones que carecían de un alelo del gen de GDNF experimentaron preferencia por el compartimento asociado a la toma de droga en un estudio de *conditioning place preference* mientras que aquellos cuyos genes estaban intactos no desarrollaron ninguna preferencia. Asimismo, la leucina-isoleucina pareció no afectar a los heterocigotos, y, por tanto, no inhibió la preferencia por el compartimento ligado a la droga.

## 5) Conclusiones

El GDNF ha demostrado un prometedor papel protector frente a la adicción a diferentes tipos de drogas, aunque debido a su limitación para atravesar la barrera hematoencefálica no

En un último estudio en el año 2007<sup>20</sup>, se comprobó si los efectos de la leucina-isoleucina sobre la adicción a morfina eran vía GDNF. Para ello, se emplearon ratones, que fueron tratados con morfina, dando como resultado un marcado incremento de la actividad motora y de los niveles de GDNF en el núcleo accumbens en

es, a día de hoy, un candidato potencial para el tratamiento en la adicción a drogas<sup>9</sup>. Es por ello por lo que las actuales investigaciones van encaminadas a buscar moléculas pequeñas capaces de pasar al sistema nervioso central y potenciar la síntesis de GDNF para el tratamiento de diferentes drogodependencias. Entre estas moléculas se incluyen ibogaína, cabergolina y el dipéptido isoleucina-leucina.

Los estudios llevados a cabo con ibogaína demuestran sus potenciales ventajas tanto en la inducción de la síntesis de GDNF como en los experimentos de comportamiento. Aunque la ibogaína presenta efectos adversos que la descartan como posible tratamiento, algunos de sus análogos han demostrado tener el mismo efecto protector y potenciador de la síntesis de GDNF, sin los efectos negativos que su precursor conlleva. Sin embargo, hasta ahora solo se han llevado a cabo estudios *in vitro* e *in vivo* con estos análogos, y solo con exposición a alcohol como droga de abuso. Será necesario llevar a cabo futuras investigaciones para valorar el efecto de estos análogos en otro tipo de adicciones (como psicoestimulantes y opioides), estudiar en profundidad su posible toxicidad e interacción con las drogas de estudio, y finalmente, realizar ensayos clínicos para evaluar sus efectos en seres humanos.

La cabergolina se muestra como una buena opción ya que se han llevado a cabo ensayos clínicos con pacientes reales donde se manifestaba su papel protector frente a la drogadicción. A pesar de ello, el número de pacientes incluidos en los ensayos clínicos que se han llevado a cabo no es muy elevado, por lo que es necesario realizar estudios con un mayor número de pacientes para confirmar los efectos de la cabergolina. Además los estudios que se han realizado *in vivo* han empleado únicamente alcohol como droga adictiva, y los ensayos clínicos, cocaína. Al igual que en el caso de la ibogaína, es necesario investigar el papel de la cabergolina en más tipos de adicciones para determinar ante qué tipo de drogas sería efectivo. Además, se emplearon dosis no muy elevadas de cabergolina en los ensayos clínicos ya que se desconoce el efecto de la interacción entre ésta y la cocaína, por lo que será necesario estudiar las interacciones entre la cabergolina y las drogas de abuso en mayor profundidad, para poder garantizar el uso de una dosis efectiva y segura.

Finalmente, el dipéptido leucina-isoleucina ha sido investigado *in vitro* e *in vivo*, al igual que la ibogaína. De nuevo los estudios *in vivo* realizados se limitan a una serie de drogas concretas (metanfetamina y morfina), lo que abre puertas a futuros experimentos para evaluar el efecto del dipéptido sobre otros tipos de adicciones. También es necesario estudiar más a fondo el perfil de seguridad de este compuesto así como las dosis a emplear, antes de pasar a realizar ensayos clínicos en humanos.

Estos tres compuestos, entre otros que no se han mencionado en la presente revisión abren la puerta a un tratamiento de la drogodependencia más efectivo y seguro, que necesita de futuras investigaciones para consolidarse.

## **6) Bibliografía**

1. Niwa M, Nitta A, Yamada Y, Nakajima A, Saito K, Seishima M., et al. An inducer for glial cell line-derived neurotrophic factor and tumor necrosis factor $\alpha$  protects against methamphetamine-induced rewarding effects and sensitization. *Biol Psychiatry*. 2007; 61(7):890-901.
2. World Health Organization [Internet].GHO: Global Observatory Data: WHO. c2008. Disponible en: [http://www.who.int/gho/substance\\_abuse/en/](http://www.who.int/gho/substance_abuse/en/)
3. Carnicella S, He D, Yowell Q, Glick S, Ron D. Noribogaine, but not 18-MC, exhibits similar actions as ibogaine on GDNF expression and ethanol self-administration. *Addict Biol*. (2010); 15(4): 424–433.
4. Leiderman DB, Shoptaw S, Montgomery A, Bloch DA, Elkashef A, LoCastro J, et al. Cocaine Rapid Efficacy Screening Trial (CREST): a paradigm for the controlled evaluation of candidate medications for cocaine dependence. *Addiction*. (2005); 100 (Suppl. 1), 1–11.
5. Camí J, Farré M. Drug addiction. *N Engl J Med*. (2003); 349:975-86.
6. Carnicella S, Ron D. GDNF-a potencial target to treat addiction. *Pharmacol Ther* . (2009); 122(1):9-18.
7. Nestler EJ. Molecular basis of long-term plasticity underlying addiction. *Nature Rev. Neurosci*. (2001); 2 : 119–128.
8. Airaksinen MS, Saarma M. The GDNF family: signalling, biological functions and therapeutic value. *Nat Rev Neurosci*. (2002); 3(5):383-394.
9. Kastin AJ, Akerstrom V, Pan Weihong. Glial cell line-derived neurotrophic factor does not enter normal mouse brain. *Neuroscience Letters*. (2003);340(3):239-241.
10. He DY, McGough NNH, Ravindranathan A, Jeanblanc J, Logrip ML, Phamluong K, et al. Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor Mediates the Desirable Actions of the Anti-Addiction Drug Ibogaine against Alcohol Consumption. *J Neurosci*. (2005); 25(3):619-628.
11. He DY, Ron D. Autoregulation of glial cell line-derived neurotrophic factor expression: implications for the long-lasting actions of the anti-addiction drug, Ibogaine. *FASEB J*.(2006); 20(13):2420-2422.

12. He DY, Ron D. Glial Cell Line-derived Neurotrophic Factor Reverses Ethanol-mediated Increases in Tyrosine Hydroxylase Immunoreactivity via Altering the Activity of Heat Shock Protein 90. *J Biol Chem.* (2008); 283(19):12811-12818.
13. Gassaway MM, Jacques TL, Kruegel AC, Karpowicz RJ, Li X, Li S, et al. Deconstructing the Iboga Alkaloid Skeleton: Potentiation of FGF2- induced Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor Release by a Novel Compound. *ACS Chem Biol.*(2015); 11(1):77-87.
14. Ohta K, Kuno S, Mizuta I, Fujinami A, Matsui H, Ohta M. Effects of dopamine agonists bromocriptine, pergolide, cabergoline, and SKF-38393 on GDNF, NGF, and BDNF synthesis in cultured mouse astrocytes. *Life Sci.* (2003); 73(5):617-626.
15. Ohta K, Fujinami A, Kuno S, Sakakimoto A, Matsui H, Kawahara Y, et al. Cabergoline stimulates synthesis and secretion of nerve growth factor, brain-derived neurotrophic factor and glial cell line-derived neurotrophic factor by mouse astrocytes in primary culture. *Pharmacology.* (2004); 71(3):162-168.
16. Shoptaw S, Watson DW, Reiber C, Rawson RA, Montgomery MA, Majewska MD, et al. Randomized controlled pilot trial of cabergoline, hydergine and levodopa/carbidopa: Los Angeles Cocaine Rapid Efficacy Screening Trial (CREST). *Addiction.* (2005); 100 Suppl 1:78-90.
17. Carnicella S, Ahmadiantehrani S, He DY, Nielsen CK, Bartlett SE, Patricia H, et al. The FDA-approved drug cabergoline decreases alcohol drinking and seeking behaviors via glial cell line-derived neurotrophic factor. *Biological Psychiatry.* (2009); 66(2):146-153.
18. Nitta A, Nishioka H, Fukumitsu H, Furukawa Y, Sugiura H, Shen L, et al. Hydrophobic dipeptide Leu-Ile protects against neuronal death by inducing brain-derived neurotrophic factor and glial cell line-derived neurotrophic factor synthesis. *J Neurosci Res.* (2004); 78(2):250-258.
19. Cen X, Nitta A, Ohya S, Zhao Y, Ozawa N, Mouri A, et al. An Analog of a Dipeptide-Like Structure of FK506 Increases Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor Expression through cAMP Response Element-Binding Protein Activated by Heat Shock Protein 90/Akt Signaling Pathway. *J Neurosci.* (2006); 26(12):3335-3344.
20. Niwa M, Nitta A, Shen L, Noda Y, Nabeshima T. Involvement of glial cell line-derived neurotrophic factor in inhibitory effects of a hydrophobic dipeptide Leu-Ile on morphine-induced sensitization and rewarding effects. *Behav Brain Res.* (2007); 179(1):167-171.
21. Kaminska B, Gaweda-Walerych K, Zawadzka M. Molecular mechanisms of neuroprotective action of immunosuppressants - facts and hypotheses. *J Cell Mol Med.* (2004); 8(1):45-58.