

UNIVERSIDAD NACIONAL DE EDUCACIÓN A DISTANCIA



TESIS DOCTORAL

**Estudio del efecto de la autoadministración de
morfina y endomorfina-2 en animales con
distinta vulnerabilidad a las acciones reforzantes
de los opiáceos.**

Gonzalo López Montoya

Licenciado en Psicología

Departamento de Psicobiología

Facultad de Psicología

Madrid, 2011

Departamento de Psicobiología

Facultad de Psicología

**Estudio del efecto de la autoadministración de morfina
y endomorfina-2 en animales con distinta
vulnerabilidad a las acciones reforzantes de los
opiáceos.**

Gonzalo López Montoya

Memoria para optar al grado de
Doctor en Psicología

Director: Dr. Emilio Ambrosio Flores
Codirectora: Dra. María Luisa Soto Montenegro

Departamento de Psicobiología
UNED



Agradecimientos:

En primer lugar quiero dar las gracias a Emilio Ambrosio y a María Luisa Soto ya que sin ellos, no habría sido posible llevar a cabo esta tesis doctoral.

También estoy muy agradecido a Carmen García, Nuria del Olmo, Miguel Miguéns, Alejandro Higuera, Santiago Morales y Amparo Assís por toda la ayuda que me han prestado y por su amistad.

Por supuesto, quiero agradecer a Manuel Desco y Juanjo Vaquero el haberme acogido en su seno y facilitarme el trabajo en todo momento.

A todos mis compañeros del Laboratorio de Imagen Médica y especialmente a Verónica García y a Alexandra de Francisco

A mis padres que siempre me han apoyado y ayudado en todos los sentidos imaginables.

Y por último, y muy especialmente, a Cristina.

ÍNDICE

1	Introducción.....	17
1.1	Algunas notas históricas	17
1.1.1	El consumo de opiáceos en la historia reciente de España.....	18
1.2	Sustratos neurales de los efectos reforzantes de las drogas.....	19
1.3	Aspectos diferenciales en las razas Fischer 344 y Lewis.	21
1.4	La morfina y el sistema opioide endógeno.....	29
1.4.1	La morfina: farmacocinética, farmacodinámica, mecanismos efectores y acciones farmacológicas.	29
1.4.1.1	Farmacocinética.....	29
1.4.1.2	Farmacodinámica y mecanismos efectores	30
1.4.1.3	Acciones farmacológicas.....	32
1.4.1.4	El sistema opioide endógeno.....	33
1.4.1.5	Las endomorfinas.	36
1.5	El sistema glutamatérgico.....	40
1.5.1	El glutamato y las vías glutamatérgicas	40
1.5.2	Receptores glutamatérgicos.....	42
1.5.2.1	Receptores NMDA	42
1.5.2.2	Receptores no-NMDA.....	45
1.5.2.3	Receptores metabotrópicos.....	46
1.5.3	Los receptores NMDA en los estudios de drogadicción	48
1.5.4	El papel del glutamato en la captación y metabolismo celulares de la glucosa.....	53
1.5.5	La captación de glucosa inducida por glutamato y la TEP <i>in vivo</i>	54
1.6	Metabolismo cerebral de la glucosa.	55
1.6.1	Glucosa y cuerpos cetónicos como sustratos energéticos.	55
1.6.2	Actividad neuronal, flujo sanguíneo y metabolismo energético.	55
1.6.3	Diferencias entre el metabolismo cerebral <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	57
1.6.4	Contribución de las células gliales y endoteliales vasculares al metabolismo cerebral.....	58
1.6.5	Transportadores de glucosa en el cerebro.....	59
2	PLANTEAMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN	63
3	MATERIAL Y MÉTODOS.....	65
3.1	Sujetos	65
3.2	La autoadministración intravenosa de drogas	65
3.2.1.1	Técnica quirúrgica.....	66
3.2.2	Consideraciones teóricas sobre la autoadministración de drogas.....	67
3.2.3	Procedimiento experimental.....	68
3.2.4	Diseño experimental para el estudio de los receptores NMDA.....	69
3.2.5	Técnica de autorradiografía cuantitativa de receptores	69
3.2.6	Técnica de autorradiografía cuantitativa de los receptores NMDA	70
3.2.7	Técnica de autorradiografía cuantitativa de los receptores endomorfina-1 y endomorfina-2.....	71
3.2.8	Análisis cuantitativo de los autorradiogramas.....	72

3.3	Tomografía por emisión de positrones	73
3.3.1	Adquisición de las imágenes	74
3.3.2	Reconstrucción y registro de las imágenes.....	75
3.3.3	Suavizado, enmascaramiento y normalización de las imágenes	76
3.3.4	Fusión de los resultados con imágenes de resonancia magnética	76
3.4	Análisis estadístico	77
3.4.1	Estudio NMDA.....	77
3.4.2	Estudio de las Endomorfinas	78
3.4.3	Estudio de microTEP.....	78
4	RESULTADOS	81
4.1	Autoadministración de morfina y niveles de unión al receptor glutamatérgico NMDA.....	81
4.1.1	Autoadministración de morfina	81
4.1.2	Niveles de unión del ligando radiactivo [³ H]-MK-801	82
4.2	Metabolismo cerebral de la glucosa medido por TEP	88
4.2.1	Autoadministración de morfina.	89
4.2.2	Diferencias en el metabolismo cerebral de la glucosa.....	89
4.3	Niveles de unión de las endomorfinas 1 y 2 tritadas a sus receptores.....	93
4.3.1	Niveles de unión de la endorfina-1.....	94
4.3.2	Niveles de unión de la endorfina-2.....	97
4.3.3	Autoadministración de endorfina-2.....	101
4.3.4	Administración pasiva de endorfina-2.....	105
5	DISCUSIÓN.....	109
5.1	Niveles del receptor glutamatérgico NMDA.....	109
5.2	Metabolismo cerebral de la glucosa	113
5.3	Distribución de las endomorfinas y autoadministración de E-2.....	116
6	CONCLUSIONES	120
7	REFERENCIAS	122

LISTA DE ABREVIATURAS

2-DG	2-desoxi-D-glucosa
5HT	Serotonina
AMPA	α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropionato
ATV	Área tegmental ventral
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
CBF	Flujo sanguíneo cerebral
E-1	Endomorfina 1
E-2	Endomorfina 2
FDG	2-fluoro-2-desoxi-D-glucosa
GABA	Ácido gamma-aminobutírico
i.c.v.	Intracerebroventricular
i.p.	Intraperitoneal
LCMRglu	Tasa metabólica cerebral local para la glucosa
NAcc	Núcleo Accumbens
NAccCore	Núcleo Accumbens Core
NMDA	N-metil-D-aspartato
NMDAR1	Subunidad NR1 del receptor NMDA
PDYN	Prodinorfina
PENK	Proencefalina
POMC	Proopiomelanocortina
RF	Razón fija
RmGlu	Receptor metabotrópico de glutamato
SNC	Sistema Nervioso Central
SNP	Sistema Nervioso Periférico

LISTA DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1-1. Representación esquemática del sistema mesolímbico-mesocortical dopaminérgico en el cerebro de la rata. Adaptado de Cooper et al., 2003.....	20
Figura 1-2. Estructura molecular de la morfina.....	30
Figura 1-3. Representación de un receptor μ -opioide con los 7 dominios transmembrana.	31
Figura 1-4. Procesamiento proteolítico de los precursores polipéptidos opioides.	34
Figura 1-5. Vías neuronales que utilizan aminoácidos excitatorios (glutamato o aspartato) como transmisores.	41
Figura 1-6. Representación esquemática de un receptor NMDA.....	43
Figura 1-7. Representación esquemática de un receptor metabotrópico glutamatérgico.	48
Figura 1-8. Astrocitos en contacto con vasos sanguíneos.	59
Figura 3-1. Caja de Skinner preparada para la autoadministración de drogas.	66
Figura 4-1. Conducta de autoadministración y extinción de la misma. Tasas de respuesta y número de refuerzos (inyecciones de morfina 1 mg/kg).....	82
Figura 4-2. Autorradiogramas representativos basales y de cada día de extinción en ambas razas.....	83
Figura 4-3. Niveles de unión de [3 H]-MK-801 a los receptores NMDA glutamatérgicos en NAcc Core.	86
Figura 4-4. Niveles de unión de [3 H]-MK-801 a los receptores NMDA glutamatérgicos en corteza cingulada.	86
Figura 4-5. Niveles de unión de [3 H]-MK-801 a los receptores NMDA glutamatérgicos en la corteza motora.....	87
Figura 4-6. Niveles de unión de [3 H]-MK-801 a los receptores NMDA glutamatérgicos en NAcc Shell.....	87
Figura 4-7. Niveles de unión de [3 H]-MK-801 a los receptores NMDA glutamatérgicos en la corteza parietal.....	87
Figura 4-8. Niveles de unión de [3 H]-MK-801 a los receptores NMDA glutamatérgicos en la corteza insular.	87

Figura 4-9. Niveles de unión de [3 H]-MK-801 a los receptores NMDA glutamatérgicos en la corteza piriforme.....	87
Figura 4-10. Niveles de unión de [3 H]-MK-801 a los receptores NMDA glutamatérgicos en el tubérculo olfatorio.....	87
Figura 4-11. Niveles de unión de [3 H]-MK-801 a los receptores NMDA glutamatérgicos en el giro dentado.....	88
Figura 4-12. Niveles de unión de [3 H]-MK-801 a los receptores NMDA glutamatérgicos en la región CA1	88
Figura 4-13. Niveles de unión de [3 H]-MK-801 a los receptores NMDA glutamatérgicos en la región CA2.....	88
Figura 4-14. Niveles de unión de [3 H]-MK-801 a los receptores NMDA glutamatérgicos en la corteza piriforme.....	88
Figura 4-15. Conducta de autoadministración. Tasas de respuesta y número de refuerzos (inyecciones de morfina por hora 1 mg/kg)	89
Figura 4-16. Imágenes representativas del contraste (salinos a día 0) en el que se iluminan los vóxeles correspondientes a las zonas del encéfalo en las que los animales Lewis muestran mayor metabolismo de la glucosa que los Fischer 344.	90
Figura 4-17. Imágenes representativas del contraste (salinos a día 15) en el que se iluminan los vóxeles correspondientes a las zonas del encéfalo en las que los animales Lewis muestran mayor metabolismo de la glucosa que los Fischer 344.	91
Figura 4-18. Imágenes representativas del contraste (morfina a día 0) en el que se iluminan los vóxeles correspondientes a las zonas del encéfalo en las que los animales Lewis muestran mayor metabolismo de la glucosa que los Fischer 344.	91
Figura 4-19. Imágenes representativas del contraste (morfina a día 15) en el que se iluminan los vóxeles correspondientes a las zonas del encéfalo en las que los animales Lewis muestran mayor metabolismo de la glucosa que los Fischer 344.	92
Figura 4-30. Autorradiogramas representativos de la unión total y la inespecífica de E-1.	93
Figura 4-31. Autorradiogramas representativos de la unión total y la inespecífica de E-2.	94
Figura 4-20. Niveles de unión de E-1 a nivel de BST (Cg1- área 1 corteza cingulada, Cg2- área 2, M1- corteza motora primaria, M2- secundaria, S1- corteza somatosensorial primaria, S2- secundaria, IPACM-L- núcleo intersticial medial y lateral, BSTMA-V- bed núcleo medial y ventral, CPU- caudado / putamen, LPG-	

globo pálido ventral, mfba-b- haz prosencefálico medial, LSI-V-D- Septum intermedio, ventral y dorsal, SHi- Septum hipocampal, Pir- corteza piriforme, ICj- isla de calleja, SIB- sustancia innominada, Estriosomas del estriado, Matriz del estriado). 95

Figura 4-21. Niveles de unión de E-1 a nivel de NAcc (Cg1- área 1 corteza cingulada, Cg2- área 2 corteza cingulada, M1- corteza motora primaria, M2- corteza motora secundaria, S1- corteza somatosensorial primaria, S2- corteza somatosensorial secundaria, Cl- células adrenérgicas, LSS- banda lateral del estriado, LAcbSh- núcleo accumbens shell, AcbC- núcleo accumbens core, CPU- caudado / putamen, VP- pálido ventral, VDB- banda diagonal núcleos límbicos, MS- Septum medial, LSi- Septum intermedio lateral, LSV- Septum ventral, LSD- Septum dorso lateral, SHi- Septum hipocampal, PIR- corteza piriforme, Estriosomas del estriado, Matriz del estriado). 95

Figura 4-22. Niveles de unión de E-1 a nivel de Hip (RGSb- corteza retrosplenial granular b, RSA- corteza retrosplenial agranular, M2- corteza motora secundaria, M1- corteza motora primaria, S1- corteza somatosensorial primaria, S2- corteza somatosensorial secundaria, Ect- corteza entorrinal, CA1- hipocampo área 1, CA2- “ área 2, CA3- “ área 3, PODG- giro dentado superior, DG-giro dentado, CPU- caudado / putamen, LGP- globo pálido lateral, LHb- núcleo habenular lateral, PV-núcleo talámico paraventricular, VPM- núcleo talámico posterior ventral, MDC-.núcleo talámico medio dorsal, LDVL- núcleo talámico dorsolateral, Subv- núcleo talámico submedio ventral, MGP- globo pálido medial, LH- área hipotalámica lateral, DMD- núcleo dorsomedial hipotalámico, VMHDM- núcleo ventromedial hipotalámico, VM- núcleo talámico ventromedial, VMHVL- núcleo talámico ventrolateral, MePD- núcleo posterior dorsal de la amígdala, MeAD- núcleo anterodorsal de la amígdala, MePC- núcleo medial dorsal de la amígdala, BMA- núcleo basomedial de la amígdala, B- núcleo basal de Meysnert, LaDL- núcleo lateral de la amígdala, Rt- núcleo reticular talámico). 96

Figura 4-23. Niveles de unión de E-1 a nivel de VTA (RsGb- corteza retrosplenial granular b, V2MM- corteza visual secundaria, Aud- corteza auditiva secundaria, Ect- corteza entorrinal, PRb- corteza peririnal, APir- área piriforme de la amígdala. AHIPM-área de la amígdala hipocampal posterior, PMCo- núcleo amigdalóide posterior, CA1, CA2 CA3- áreas 1, 2, y 3 del hipocampo, DG- giro dentado, PoDG- giro dentado superior, LPMC- núcleo talámico posterior, MGD-

V-M- núcleo geniculado dorsal, medial y ventral, SG- núcleo talámico supragenicolado, SNL-D-R- sustancia negra lateral, dorsal y reticular. IPoR- núcleo interpeduncular, VTA- área tegmental ventral, VTRZ- zona tegmental visual, R- núcleo rojo, RLi- núcleo rostral del raphe, DpMe- núcleos mesencefálicos, IMLFG- núcleos intersticiales, LPAG- sustancia gris periacueductal lateral, DMPAG- sustancia gris periacueductal dorsomedial, DLPAG- sustancia gris periacueductal dorsolateral, DpWn- deep white layer colículo superior, Ing- colículo superior intermedio). 96

Figura 4-24. Niveles de unión de E-1 a nivel de LC (prf- fisura primaria., Sim- lobulo simple, Crus1- crus 1 lobulo ansiform, PF1- paraflocculus, DC- núcleo dorsal coclear, GRC- núcleo coclear granular, VCP- núcleo coclear ventral, SpSo- núcleo espinal trigemino, P7- zona perifacial, LGPI- núcleo lateral paragigantocelular, GIA- núcleo del bulbo olfatorio accesorio, PPy- núcleo parapiramidal, Rmg- núcleos mayores del raphe, Rpa- núcleo pálido raphe, pd- bundle predorsal, DPGI.- núcleo dorsal paragigantocelular, IRt- núcleo reticular intermedio, Acs7- núcleo facial accesorio, PCRtA- núcleo reticular parvocelular, icp- pedúnculo inferior cerebral, Spve- núcleo espinal vestibular, MVeMC- núcleo medial vestibular parvocelular, CI- núcleo intersticial caudado, SMV- velum superior medular, MVeRC- núcleo medial vestibular, LVE- núcleo vestibular lateral, Vecg- núcleo vestibuceleberal, Suve- núcleo superior vestibular, Y- núcleo Y, Lat- núcleo cereberal lateral, InTA- núcleo anterior cereberal, Py- tracto piramidal, A5- células noradrenérgicas). 97

Figura 4-25. Niveles de unión de E-2 al nivel del la estría terminal. Cg1- área 1 corteza cingulada, Cg2- área 2 corteza cingulada, M2- corteza motora secundaria, M1- corteza motora primaria, S1- corteza somatosensorial primaria, LSV- Septum ventral, LSi- Septum intermedio lateral, MnPo- núcleo preóptico mediano, SFi- núcleo septofimbrial, BSTMA- núcleo de la estría terminal, Amig- amígdala, MCPO- núcleo preóptico magnocelular, HDB- núcleo horizontal de la banda diagonal, LGP- globo pálido lateral, CPU- caudado putamen, MPOL, núcleo preóptico medial lateral, AVPe, núcleo periventricular anteroventral, Patches, Matriz. 98

Figura 4-26. Niveles de unión de E-2 al nivel del NAcc A1cx cing- área 1 corteza cingulada, a2 cx cing- área 2 corteza cingulada, cx motor sec- corteza motora secundaria, cx motor prim- corteza motora primaria, cx somatosens prim- corteza

somatosensorial primaria, LSV- Septum ventral, LSi- septum intermedio lateral, MS- septum medial, VDB- banda diagonal núcleos límbicos, SHi- septum hipocampal, amig- amígdala, Cpu- caudado putamen, patches. 98

Figura 4-27. Niveles de unión de E-2 al nivel del hipocampo. RGSb- corteza retrosplenial granular b, RSA- corteza retrosplenial agranular, M2- corteza motora secundaria, M1- corteza motora primaria, S1- corteza somatosensorial primaria, S2- corteza somatosensorial secundaria, Ect- corteza entorrinal, CA1- hipocampo área 1, CA2- “ área 2, CA3- “ área 3, PODG- giro dentado superior, DG-giro dentado, CPU- caudado / putamen, LGP- globo pálido lateral, LHb- núcleo habenular lateral, PV-núcleo talámico paraventricular, VPM- núcleo talámico posterior ventral, MDC-.núcleo talámico medio dorsal, LDVL- núcleo talámico dorsolateral, Subv- núcleo talámico submedio ventral, MGP- globo pálido medial, LH- área hipotalámica lateral, DMD- núcleo dorsomedial hipotalámico, VMHDM- núcleo ventromedial hipotalámico, VM- núcleo talámico ventromedial, VMHVL- núcleo talámico ventrolateral, MePD- núcleo posterior dorsal de la amígdala, MeAD- núcleo anterodorsal de la amígdala, MePC- núcleo medial dorsal de la amígdala, BMA- núcleo basomedial de la amígdala, B- núcleo basal de Meynert, LaDL- núcleo lateral de la amígdala, Rt- núcleo reticular talámico. 99

Figura 4-28. Niveles de unión de E-2 al nivel del VTA. RsGb- corteza retrosplenial granular b, RSA- corteza agranular retrosplenial, cx V2mm-corteza visual secundaria mediomedial, cx V2ml- corteza visual secundaria mediolateral, cx PtA, corteza de asociación parietal, S1- corteza somatosensorial primaria, CA1, CA2, CA3, GD- giro dentado, LPMC- núcleo talámico posterior lateral mediocaudal, LPMR- núcleo talámico posterior lateral mediodorsal, LPLR- núcleo talámico posterior lateral laterorostral, DLG-núcleo geniculado lateral dorsal, VPM- núcleo talámico ventral posteromedial, SNR- sustancia negra reticulada, VTA- área tegmental ventral, PMCo, núcleo amigdalóide cortical posteromedial, AHIPM-área de la amígdala hipocampal posterior, APir- área piriforme de la amígdala, MM- núcleo mamilar medial, ML- núcleo mamilar medial lateral. 99

Figura 4-29. Niveles de unión de E-1 a nivel de LC (prf- fisura primaria., Sim- lobulo simple, Crus1- crus 1 lobulo ansiform, PF1- parafloculus, DC- núcleo dorsal coclear, GRC- núcleo coclear granular, VCP- núcleo coclear ventral, SpSo- núcleo espinal trigemino, P7- zona perifacial, LGPI- núcleo lateral paragigantocelular, GIA- núcleo del bulbo olfatorio accesorio, PPy- núcleo parapiramidal, Rmg-

núcleos mayores del raphe, Rpa- núcleo pálido raphe, pd- bundle predorsal, DPGI- núcleo dorsal paragigantocelular, IRt- núcleo reticular intermedio, Acs7- núcleo facial accesorio, PCRtA- núcleo reticular parvocelular, icp- pedúnculo inferior cerebral, Spve- núcleo espinal vestibular, MVeMC- núcleo medial vestibular parvocelular, CI- núcleo intersticial caudado, SMV- velum superior medular, MVeRC- núcleo medial vestibular, LVE- núcleo vestibular lateral, Vecg- núcleo vestibuleberal, Suve- núcleo superior vestibular, Y- núcleo Y, Lat- núcleo cereberal lateral, InTA- núcleo anterior cereberal, Py- tracto piramidal, A5- células noradrenérgicas).	100
Figura 4-32. Autorradiogramas representativos realizados con E-2 tritiada degradada.	100
Figura 4-33. Curva de autoadministración de E-2 (concentración 100nM).	102
Figura 4-34. Curva de autoadministración de E-2 (concentración 600nM).	102
Figura 4-35. Curva de autoadministración de E-2 (concentración 1200nM).	103
Figura 4-36. Curva de autoadministración de E-2 (concentración 2400nM).	103
Figura 4-37. Conducta de autoadministración de E-2 con las cuatro concentraciones probadas.	104
Figura 4-38. Curva de la ingesta acumulada total según cada concentración.	105
Figura 4-39. Autorradiogramas representativos de unión de E-2 tritiada tras la administración intravenosa.	106

RESUMEN

La dependencia de opiáceos y especialmente de heroína sigue siendo un serio problema de salud pública en muchos países del mundo, aunque afortunadamente haya disminuido la prevalencia de su consumo en nuestro país en la última década. Como es conocido, el principal tratamiento farmacológico de la dependencia de opiáceos es el empleo de agonistas sustitutivos, cuya eficacia y seguridad ha hecho que su uso se haya ido generalizando progresivamente en los países desarrollados. Sin embargo, hay un alto porcentaje de recaídas en el consumo de estas drogas y para ayudar en la solución de este problema aún no se tienen herramientas terapéuticas adecuadas por lo que es necesario seguir investigando en este campo.

Dada la gran importancia de los sistemas opioide endógeno y dopaminérgico en la mediación de las acciones reforzantes de muchas drogas de abuso, incluidas lógicamente la de los opiáceos, la investigación básica sobre los mecanismos que puedan estar operando en la dependencia y recaídas en el consumo de estas sustancias se ha centrado en el estudio de ambos sistemas de neurotransmisores, pero es reconocida cada vez en mayor grado la posible importancia en estos procesos del sistema glutamatérgico. Además, se han descrito nuevos péptidos opioides, como es el caso de las endomorfina, que tienen propiedades analgésicas, pero cuya posible participación en las propiedades reforzantes de opiáceos de abuso es menos conocida. Por ello, el objetivo esencial de esta tesis doctoral ha sido tratar de aportar nuevos conocimientos sobre la posible contribución de elementos reguladores del sistema

glutamatérgico (como es el caso de los receptores NMDA) y de las endomorfinas, particularmente de la endomorfinina 2, en las acciones reforzantes positivas de los opiáceos. Dado, por otra parte, que el glutamato participa en gran parte de la activación neuronal del Sistema Nervioso Central (SNC), que ese neurotransmisor estimula la captación de glucosa en las células nerviosas y que hay datos que sugieren que drogas de abuso como los opiáceos y la cocaína reducen la captación de glucosa en el SNC, también ha sido de nuestro interés analizar el metabolismo cerebral de la glucosa. Finalmente, puesto que es conocido que hay diferencias individuales en respuesta a las acciones reforzantes de las drogas y que puede decirse que hay sujetos con distinto grado de vulnerabilidad a la drogadicción, también hemos querido estimar la posible influencia relativa del genotipo en la mediación del sistema glutamatérgico y de la endomorfinina 2 en la diferente susceptibilidad ante los efectos reforzantes de los opiáceos.

Para llevar a cabo nuestros estudios hemos empleado dos cepas de ratas, Lewis (LEW) y Fischer 344 (F344), que tienen una demostrada diferente susceptibilidad ante las acciones reforzantes de la morfina y las metodologías de la autoadministración intravenosa de drogas, la autorradiografía cuantitativa de receptores y la Tomografía por Emisión de Positrones en el animal pequeño (microPET).

En todos los estudios los animales se autoadministraron intravenosamente la droga (morfina o endomorfinina-2) durante 15 días y extinguieron su conducta de autoadministración a diferentes tiempos (durante 7 y 15 días en el caso de los receptores NMDA; durante 15 días en el del metabolismo cerebral de la glucosa; y durante 7 días en el de la endomorfinina-2).

Los resultados indicaron que las dos cepas tienen niveles basales de receptores NMDA distintos y que son mayores en la región del área tegmental ventral (ATV) de

los animales LEW. Después de la autoadministración de morfina, en los animales F344 se produjo un aumento de esos receptores en la región del núcleo accumbens, pero en los LEW no hubo cambios significativos. Sin embargo, en la región del tálamo ambas razas presentaron un aumento de estos receptores. Por su parte, durante la extinción los animales LEW mostraron un descenso progresivo en sus niveles del receptor NMDA comparados con los del último día de autoadministración (o día 0) tanto en el día 7 como en el 15, mientras que en los F344 dichos niveles decayeron hasta el día 7, pero iniciaron una recuperación que fué más manifiesta el día 15.

En lo que se refiere al metabolismo cerebral de la glucosa, los resultados indicaron que las ratas LEW tenían en sí mismas (esto es, a nivel basal) un mayor metabolismo cerebral de la glucosa que las ratas F344 en las cortezas entorrinal y perirrinal así como en una amplia zona que comprende el hipotálamo, los cuerpos mamilares, la sustancia negra, el área tegmental ventral y el haz prosencefálico medial. Sin embargo, tras 15 días de autoadministración de morfina estas diferencias basales disminuyeron notablemente, aunque sólo en las zonas corticales y no en las subtalámicas. No obstante, después de los 15 de extinción se observó cierta tendencia a la recuperación de las diferencias basales.

Por último, en lo relativo a las endomorfinas, los datos que encontramos apuntan a que la endorfina-2 presenta una unión a sus receptores más específica que la endorfina-1 a la concentración de 3 nM, que es una concentración a la que se une con gran afinidad un ligando sintético, el DAMGO, a los receptores μ -opioides. Por este motivo, en los subsiguientes estudios elegimos solamente a la endorfina-2 para estudiar si esta sustancia podía ser autoadministrada por los animales LEW, que en trabajos nuestros previos se autoadministran más morfina que los F344, a diferentes concentraciones (100, 600, 1200 y 2400 nM/kg). Los resultados indicaron que no había

diferencias significativas cuando se comparaban los últimos cinco días de autoadministración y los últimos cinco de la extinción (en la que se sustituye la droga por suero salino) de las dosis 100, 600 y 1200 nM/kg, lo cual sugiere que a esas dosis la endomorfina-2 no parece inducir efectos reforzantes positivos en los animales LEW, pero sí se encontraron diferencias significativas en el caso de la dosis de 2400 nM, lo cual apunta a que, al menos a dosis altas, la posible unión de la endomorfina-2 a los receptores mu-opioides hace que sea susceptible de ser autoadministrada por los sujetos, limitando así sus potencialidades terapéuticas como analgésico.

En conjunto, estos datos sugieren que: 1) la autoadministración crónica de drogas produce cambios neuroadaptativos en elementos reguladores del sistema glutamatérgico, como es el caso de los receptores NMDA, en diferentes regiones cerebrales. Dichos cambios pueden ser distintos en función del genotipo del sujeto y, concretamente, en el caso de sujetos vulnerables pueden conllevar reducciones mantenidas en el tiempo de los niveles de dichos receptores que, hipotéticamente, podrían participar en una mayor facilidad para las recaídas; 2) los sujetos vulnerables, en comparación con los más resistentes, parecen tener una mayor activación cerebral basal, diferencia que se mantiene durante la autoadministración de morfina, aunque esté más reducida y que no parece ser muy duradera porque se inicia una recuperación hacia los niveles basales después de 15 días de ausencia de la droga; y 3) parte de las acciones reforzantes positivas de los opiáceos pueden ser mediadas por el péptido endógeno endomorfina-2 a través de su unión a sus receptores E-2 centrales, los cuales tienen una distribución cerebral muy similar a la de agonistas sintéticos específicos de los receptores mu-opioides.

INTRODUCCIÓN

1 Introducción

1.1 Algunas notas históricas

Los opiáceos, cuya capacidad de reducir el dolor aún no ha sido superada, han sido usados durante siglos para inducir analgesia, entre otros propósitos, y aún hoy son ampliamente utilizados en diversas ramas de la medicina. Se encuentran ya referencias al uso del opio en los escritos de Teofrasto sobre el año 300 a.C. Durante mucho tiempo el opio fue administrado en forma de vapor o a través de punciones en la piel. Debido a la extrema variabilidad en el contenido del opio y debido también a su variable tasa de absorción, los efectos iban de la analgesia insuficiente a la muerte por depresión respiratoria, de forma que los fallecimientos no eran infrecuentes. Careciendo de los modernos antagonistas opioides, los intentos por revivir a pacientes en estado de inconsciencia inducido por una sobredosis de opio consistían en colocar bajo la nariz una esponja empapada en vinagre o en dejar caer en el interior de los oídos unas gotas de jugo de ruda.

Todo esto cambió en 1803, cuando Sertürner, un químico alemán, aisló el principal principio activo del opio y lo denominó morfina en honor a Morfeo, dios griego del sueño. Los efectos de la morfina eran mucho más potentes y más predecibles que los de su hermano mayor, el opio. Sin embargo, el problema de la precisión en cuanto a la administración no se solucionó hasta 1853 cuando Pravaz inventó la jeringa y Alexander Wood desarrolló la aguja hipodérmica (Musto, 1991). Aunque la morfina se aisló del opio a principios del siglo XIX, su estructura no fue identificada hasta 1925 por Gulland y Robinson. El descubrimiento de que simples modificaciones de la molécula de morfina daban lugar a grandes variaciones en su farmacología atrajo el interés de los químicos y farmacólogos. En 1874 uno de estos cambios (la adición de dos grupos acetilo) dio como resultado el compuesto llamado diacetilmorfina o heroína que fue rápidamente promocionado como más potente que la morfina aunque no adictivo. Hoy sabemos que la heroína es metabolizada primero a monoacetilmorfina y luego a morfina en el cerebro. La heroína es, sin embargo, mucho más rápida en ejercer sus efectos debido a que la diacetilación hace a la droga menos polar y, por ello, más liposoluble. Esta mayor solubilidad en lípidos facilita la entrada en el cerebro.

1.1.1 El consumo de opiáceos en la historia reciente de España

Todos los datos a nuestro alcance apoyan la tesis de que antes de 1976 el consumo y comercio de heroína eran casi desconocidos en España, aunque sí había morfinómanos de edades y características muy diferentes a las de los futuros heroinómanos callejeros (González Duro, 1979). Mientras que en el verano de 1978 los consumidores de heroína en España aún se contaban por decenas o, a lo sumo, por centenares, en 1982 había ya decenas de miles de jóvenes que habían aprendido a inyectarse opiáceos que conseguían en un creciente mercado negro. Hablamos de opiáceos y no sólo de heroína porque muchos de ellos se iniciaron en la práctica endovenosa utilizando otras sustancias a menudo conseguidas en farmacias (Gamella, 1991).

La expansión del consumo de heroína en España tuvo su primera fase entre 1977 y 1978 cuando los primeros consumidores se hicieron visibles y la opinión pública centró su atención en el uso local de esta droga. La expansión del uso de la heroína alcanzó niveles epidémicos entre 1979 y 1982, durante la segunda fase, y alcanzó su cénit en la tercera, entre 1983 y 1986, cuando se produjo la definitiva institucionalización del problema. Desde 1987 la heroinomanía entró en una nueva fase, disminuyendo el número de nuevos usuarios mientras crecían la morbilidad y mortalidad de los heroinómanos a consecuencia de su forma de vida, así como por la expansión del SIDA. Fue entonces cuando se extendió el uso de la heroína fumada cuyo uso era percibido por los usuarios como menos peligroso que el intravenoso. A partir de 1991-1992, la dependencia de heroína se ha convertido en “endémica”, hay menos nuevos heroinómanos y el problema se concentra en una población cada vez más envejecida y circunscrita a ciertos entornos. Varios indicadores independientes apoyan este modelo, como son los datos de solicitudes de tratamiento, admisiones hospitalarias y clínicas, confiscaciones de drogas ilegales, infecciones y enfermedades asociadas al uso intravenoso de drogas y muertes por reacción aguda (De la Fuente et al. 1995; Camí y Barrio, 1993; Hartnoll, 1992; Sánchez Payá et al. 1990; Comas, 1985; DGPND, 1994; Funes y Romaní, 1985). Sin embargo, y a pesar de esta clara disminución del consumo de heroína, son los heroinómanos los que más reclaman tratamiento (tanto primer tratamiento como tratamientos tras las recaídas) y sigue siendo necesario un

conocimiento más profundo de los mecanismos últimos que operan en la adicción a opiáceos, para poder mejorar la eficacia de los tratamientos actuales, basados en su mayor parte en el empleo de sustitutivos como la metadona. Por ello, en el siguiente epígrafe nos ocuparemos del sistema mesocorticolímbico dopaminérgico considerado como un sustrato común a los efectos reforzantes de todas las drogas de abuso.

1.2 Sustratos neurales de los efectos reforzantes de las drogas

Parece que las drogas de abuso, incluidos los opiáceos, tienen un sustrato neural común de sus efectos reforzantes que vamos a ver con algún detalle. En 1954, James Olds y Peter Milner hicieron un descubrimiento sorprendente: la estimulación eléctrica de ciertas zonas del cerebro era reforzante. Efectivamente, los animales experimentales podían llegar a presionar la palanca que les proporciona las descargas hasta más de 6.000 veces cada hora ignorando otros refuerzos como la actividad sexual o la comida. Desde entonces se ha avanzado mucho en la comprensión de cómo, tanto los reforzadores naturales como las drogas de abuso, ejercen sus efectos en el SNC. Aunque las distintas drogas producen efectos muy diferentes entre sí (piénsese en la heroína, la cocaína, el alcohol o la marihuana), parece que todas ellas tienen un efecto común: bien de forma directa o indirecta, actúan en el sistema dopaminérgico mesocorticolímbico. Este sistema suele dividirse en la vía dopaminérgica mesocortical y la mesolímbica. Simplificando, estas vías tienen su origen en el área tegmental ventral donde se encuentran los cuerpos celulares cuyos axones inervan, entre otras regiones, el estriado ventral (cuyo principal componente es el núcleo accumbens) y la corteza prefrontal medial. Algunos investigadores han sugerido que es en concreto el núcleo accumbens el objetivo neuroanatómico final de la recompensa en general.

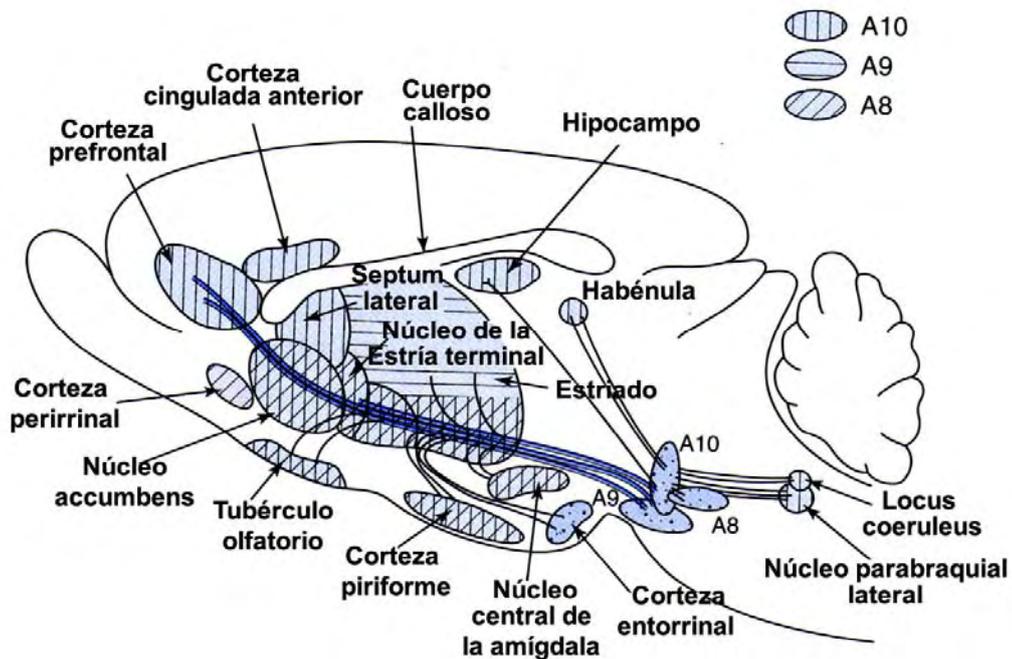


Figura 1-1. Representación esquemática del sistema mesolímbico-mesocortical dopaminérgico en el cerebro de la rata. Adaptado de Cooper et al., 2003.

Se puede definir a la recompensa como cualquier estímulo que el cerebro interpreta como intrínsecamente bueno o deseable mientras que un estímulo reforzante es aquel que aumenta la probabilidad de que una conducta asociada con él sea realizada de nuevo (Nestler et al. 2001).

Además de las drogas, también otros estímulos naturales como saciar la sed o el apetito o la actividad sexual, parece que activan estas vías dopaminérgicas provocando la liberación de dopamina en sus objetivos. Por otro lado, no solo lo placentero activa estas vías sino que también estímulos aversivos o el aprendizaje asociativo pueden hacerlo. Además, mientras que una recompensa inesperada activa las neuronas dopaminérgicas mesencefálicas, si este estímulo reforzante se repite y termina siendo esperado dejará de activarlas. Y si cuando es esperado, se omite, esto suprimirá la señal en estas neuronas. Estos hallazgos han llevado a una conceptualización más amplia sobre estas neuronas dopaminérgicas mesencefálicas. Algunos creen que su función podría ser la de orientar las limitadas capacidades cognitivas y conductuales hacia cualquier estímulo inesperado con algún significado potencial, entre los cuales se encontraría la recompensa.

Sin embargo, existen diferencias entre los reforzadores naturales y las drogas de abuso. Por ejemplo, la cantidad de dopamina liberada a causa de un reforzador natural es limitada mientras que las drogas de abuso elevan los niveles de dopamina extracelular en una medida mucho mayor lo que puede llevar a una regulación a la baja del número de receptores y, por consiguiente, a una subsensibilidad del sistema. Esta sensibilidad reducida ha sido propuesta como la principal causa de vulnerabilidad a la recaída en el uso de drogas.

Parece pues, que todas las drogas de abuso, incluida la morfina, ejercen sus efectos reforzantes a través de este sistema neural.

A continuación pasaremos a ver con detalle el modelo más utilizado con animales de laboratorio para estudiar las diferencias genéticas en cuanto a la proclividad al abuso de drogas.

1.3 Aspectos diferenciales en las razas Fischer 344 y Lewis.

La mayoría de los modelos que intentan explicar los procesos de dependencia a drogas de abuso, consideran los factores genéticos como una de las variables de mayor importancia y relacionada con la predisposición al consumo de drogas. Por ello, parece imprescindible abordar la naturaleza de estos factores para poder comprender dichos modelos. Para poder analizar su contribución existen dos caminos posibles: a) la manipulación genética de animales de experimentación y el posterior análisis de los efectos que estas manipulaciones tienen sobre las conductas adictivas y b) el estudio del genotipo y el fenotipo de diferentes clases de animales que muestren diferencias claras respecto al consumo y dependencia de sustancias químicas.

Este segundo acercamiento es el utilizado en dos de los estudios del presente trabajo de investigación y para ello disponemos de dos razas de ratas, las Fischer 344 (F344) y las Lewis (LEW) derivadas ambas de una tercera: la raza Sprague-Dawley. Sabiendo que estas dos razas difieren en sus comportamientos adictivos y estudiando las variables que las caracterizan podríamos hallar las claves sobre los mecanismos implicados en la vulnerabilidad genética a la drogadicción. Por ello, todo este epígrafe está dedicado a

reparar los conocimientos acumulados hasta ahora sobre las diferencias entre estas dos cepas de ratas.

Los comportamientos en los que se observan más diferencias entre ambas razas son aquellos con un elevado componente de reactividad emocional, de estrés o de miedo (Kosten y Ambrosio, 2002). Las ratas de la raza LEW muestran un mayor reflejo de sobresalto que las F344. Este reflejo consiste en una reacción a nivel musculoesquelético ante un estímulo que puede ser de diversas modalidades pero de alta intensidad. Hemos de indicar el hecho de que este tipo de reflejo ha sido asociado negativamente con el eje hipotalámico-hipofisiario-adrenal (HPA). Por ello podríamos hipotetizar tentativamente que los animales LEW podrían tener una menor funcionalidad de dicho eje. En pruebas de ansiedad en las que se utilizan tests que suponen un conflicto para el animal como colocar a ratas deprivadas de alimento en un entorno nuevo y luminoso con acceso a comida, los animales LEW comen más que los F344 mostrando así menos miedo al nuevo entorno. Sin embargo, en pruebas con laberinto elevado no se han hallado diferencias entre razas, mostrando ambas altos niveles de ansiedad (Chaulouff et al. 1995).

La “emocionalidad” o reactividad al estrés se ha medido con tests de actividad locomotora y los resultados muestran que las F344 son más emocionales que las LEW al haber superado a estas últimas en el número de respuestas de erguimiento en un ambiente novedoso, defecatorias y de actividad ambulatoria (Rex et al. 1996). También existen diferencias entre estas dos razas en cuanto a sus respuestas, tanto incondicionadas como condicionadas, a la administración de diferentes drogas. Diversos estudios han estudiado los efectos de los estimulantes psicomotores y de la morfina sobre conductas incondicionadas. Las comparaciones entre razas de los efectos locomotores de la cocaína apuntan a que la curva dosis-respuesta en la raza LEW es menos pronunciada, más plana, que en la F344. Utilizando un amplio rango de dosis, la raza LEW muestra niveles característicos de actividad locomotora y estos niveles son, en general, mayores que los manifestados por la raza F344. Por tanto, la respuesta locomotora incondicionada a la cocaína en las LEW es de mayor potencia pero menos sensible a los efectos de la dosis, mostrando similares características a lo largo de toda la curva dosis-respuesta (George et al. 1991; Kosten et al. 1994).

La sensibilización es el hecho de que la repetida administración de drogas produzca un aumento de sus efectos activadores (Kalivas y Stewart, 1991; Post et al., 1987; Robinson y Becker, 1986) y constituye otro efecto incondicionado susceptible de ser estudiado. En este caso, la raza LEW desarrolla esta sensibilización mostrando un menor nivel de actividad al inicio de la administración de cocaína que se va incrementando con el paso de los días. No obstante, la raza F344 desarrolla cierta tolerancia a los efectos sobre la actividad locomotora con dosis altas de cocaína y muestra, al principio, niveles altos de actividad que van disminuyendo poco a poco. Parece que ambas razas exhiben un patrón opuesto en este parámetro (Kosten et al. 1994). Ambas razas muestran, sin embargo, sensibilización a las estereotipias inducidas por este psicoestimulante (Sircar y Kim, 1999).

Otros estudios han comparado los efectos sobre la actividad locomotora de la administración de morfina en ambas razas. Dosis de 1.0 y 5.0 mg/kg produjeron incrementos significativos en la actividad locomotora en ambas razas aunque no se observó un efecto global del genotipo.

Pasemos a revisar ahora las conductas condicionadas. Algunos estudios han comparado a las dos razas en los paradigmas de condicionamiento al contexto y de condicionamiento clásico utilizando drogas y otras clases de estímulos. Estos trabajos son de gran importancia ya que los estímulos ambientales pueden llegar a asociarse con los efectos de las drogas.

Otra respuesta que también ha sido medida y comparada en ambas razas son los niveles de actividad locomotora producidos por cocaína. Tanto las F344 como las LEW mostraron activación condicionada: desarrollaron mayores niveles de actividad en las sesiones en las que recibían cocaína en comparación con los niveles de actividad anteriores a la administración de cocaína (Kosten et al. 1994).

El condicionamiento aversivo gustativo es un procedimiento de condicionamiento clásico en el que también han sido estudiadas estas dos razas de ratas. En un primer estudio, la raza LEW desarrolló condicionamiento aversivo al sabor de la cocaína más rápidamente y con dosis menores que la raza F344 (Glowa et al. 1994). En cambio, en trabajos posteriores no se encontraron diferencias entre ambas razas en condicionamiento aversivo al sabor de la cocaína usando dosis y procedimientos de

administración similares a los utilizados en condicionamiento al contexto (Kosten et al. 1994). Otros trabajos muestran que las F344 adquirieron más rápidamente la aversión al sabor inducida por la cocaína (Lancellotti et al. 2000), mientras que las LEW no adquirieron tal conducta. Otros autores, sin embargo, han encontrado que estas dos cepas no se diferenciaban en el desarrollo de condicionamiento al sabor al cloruro de litio (Grigson y Freet, 2000). Estos mismos autores han sugerido que la raza LEW es más sensible a los cambios en el valor de los reforzadores en comparación con la raza F344 (Grigson y Greet, 2000).

El condicionamiento preferencial de lugar es otro de los paradigmas con el que se han estudiado diferencias entre estas dos cepas de rata. Consiste en un procedimiento de condicionamiento clásico por el que las ratas tienden a aproximarse y pasar mayor tiempo en un ambiente emparejado previamente con la administración de la droga. Ello, se cree que refleja las propiedades reforzantes de las drogas como puede deducirse del amplio rango de drogas con las que se mantiene dicha conducta (Carr et al 1989; Schechter y Calcagnetti, 1993). Sin embargo, el descenso en el tiempo que el animal pasa en un ambiente asociado con la droga reflejaría los efectos motivacionales negativos de dicha droga como se observa tras la administración de antagonistas opiáceos a ratas previamente expuestas a morfina (Mucha, 1987). Diversos trabajos han mostrado claramente que las ratas LEW exhiben un mayor condicionamiento preferencial de lugar con varias drogas psicoactivas como la morfina, la cocaína o la nicotina, en comparación con las F344 (Guitart et al. 1992; Horan et al. 1997; Kosten et al. 1994).

Se han empleado también diversos procedimientos para evaluar los efectos de las drogas con estudios de condicionamiento operante entre los que podemos citar a los que se refieren al efecto de las drogas sobre la conducta reforzada, utilizando diferentes metodologías como la autoestimulación eléctrica intracraneal, al efecto de las drogas como estímulos discriminativos o la función de las drogas como reforzadores naturales en tareas operantes como en la autoadministración intravenosa de drogas. Los animales pueden ser entrenados para discriminar la presencia de una droga por medio de la selección de una palanca en una tarea operante (Colpaert, 1978). Los estímulos señalarían el momento en el que, si se produce la respuesta, esta sería reforzada. Con una dosis de 10 mg/kg de cocaína no se hallaron diferencias en la discriminación de

drogas entre razas (Haile y Kosten, 2000). No obstante, en otro estudio, las ratas F344 adquirieron la conducta de discriminación de morfina más rápidamente que las LEW (Morgan et al. 1999). No hubo diferencias en ninguno de los dos estudios, tras la adquisición, en la respuesta en función de la dosis utilizada.

La raza LEW se autoadministra varias drogas psicoactivas más fácilmente que la raza F344. En los primeros estudios se utilizó la vía oral mostrándose que las LEW se autoadministraban más etanol (Li y Lumeng, 1984; Suzuki et al. 1988a), opiáceos (Suzuki et al. 1992; Suzuki et al. 1988b) y cocaína (George y Goldberg, 1989) que las F344. En un estudio posterior, sin embargo, se demostró que con la autoadministración oral, la cocaína no funciona como reforzador en la raza LEW aunque sí se produjo un aumento en la activación locomotora (Bell et al. 1993). En cambio, la raza LEW adquirió la conducta de autoadministración intravenosa de cocaína con dosis menores y en menos ensayos que la raza F344 (Kosten et al. 1997). Al reemplazar la cocaína por suero salino tuvo lugar una disminución de la respuesta de autoadministración en ambas razas lo que concuerda con la idea de que la cocaína funciona como un reforzador. Igualmente, la adquisición de la conducta de autoadministración de morfina tuvo lugar más rápidamente en las LEW que en las F344 (Ambrosio et al. 1995; Martín et al. 1999). Las dos razas mostraron extinción de la conducta de autoadministración al ser sustituida la morfina por suero salino aunque la frecuencia de extinción fue menor en la raza LEW (Ambrosio et al. 1995; Martín et al. 1999). Curiosamente, ninguna de las dos razas adquirió la conducta de autoadministración de nicotina bajo condiciones en las que otras razas sí la adquirieron (Shoaib et al. 1997). No es fácil explicar estos resultados, especialmente si tenemos en cuenta que los estudios de condicionamiento preferencial de lugar demuestran que en la raza LEW hay un grado de condicionamiento a la nicotina tan elevado como a la morfina o a la cocaína. El motivo podría ser que la nicotina administrada intravenosamente puede tener algunas propiedades aversivas.

Finalmente, se ha comprobado que bajo programas de razón fija, los animales LEW responden con menor frecuencia en comparación con los animales F344 cuando se va reduciendo la dosis de cocaína (Kosten et al. 1997). Ello sugiere que estos animales son más sensibles a los efectos reforzantes de la cocaína aunque bajo programas de razón progresiva parece que las ratas F344 presentan mayor frecuencia de respuesta que las ratas LEW (Ward et al, 1996).

Teniendo en cuenta todos estos datos experimentales con distintas drogas y procedimientos podemos afirmar que la raza LEW parece más sensible al efecto reforzante de las drogas en comparación con la raza F344.

Una duda que ha surgido con este tipo de estudios es si el aumento de respuestas operantes mostrado por las LEW, comparadas con la F344, es consecuencia del efecto reforzador de las drogas. Por ello, se ha evaluado la adquisición de la respuesta operante con un reforzador natural como es la comida. Bajo un programa de reforzamiento continuo, la raza LEW adquirió más rápidamente la respuesta operante que la F344 aunque ninguna de las dos razas difirió en el número de ensayos necesarios para alcanzar su respectivo nivel asintótico de respuesta. Bajo programas de razón progresiva, ambas razas no difieren significativamente en los puntos de cese o *breaking points*, ni en la frecuencia final de respuestas emitidas para la comida (Martín et al. 1999).

Existen también diversas diferencias entre estas dos cepas de ratas a nivel neuroquímico. Como se sabe, tanto las drogas de abuso como los reforzadores naturales activan la vía dopaminérgica mesocorticolímbica (Heffner et al. 1980; Pfaus et al. 1990; Wise y Rompre, 1989). Las razas LEW y F344 difieren en distintos aspectos relacionados con este sistema neurotransmisor. Por ejemplo, los niveles de tirosina hidroxilasa (TH), la enzima encargada de la síntesis de la dopamina, en el ATV de los animales pertenecientes a la raza F344 son menores que los de los animales LEW. Al contrario ocurre en el núcleo accumbens, donde los niveles de tirosina hidroxilasa (TH) son mayores en F344 que en LEW (Beitner-Johnson et al. 1991; Guitart et al. 1992; Ortiz et al. 1995). Por otra parte, las ratas F344 tienen un mayor número de neuronas dopaminérgicas activas espontáneamente en el ATV al ser comparadas con las LEW. Asimismo, se han encontrado mayores niveles extracelulares de metabolitos de la dopamina en el NAcc de los animales F344 aunque no hay diferencias en los niveles de este transmisor entre ambas razas (Camp et al. 1994; Strecker et al. 1995). También se ha comprobado que las LEW son más sensibles en su respuesta dopaminérgica a la cocaína y la metanfetamina en el Nacc en comparación con las F344 y que muestran un mayor descenso en los metabolitos de dopamina (Camp et al. 1994). Del mismo modo, se ha podido comprobar el hecho de que los niveles de dopamina en el Nac se incrementan en mayor proporción en respuesta a la administración de morfina en las

ratas F344 (Schutz et al 1994) encontrándose, además, una diferencia temporal: los niveles de dopamina están más elevados en las F344 entre los 10 y los 40 minutos tras la administración con un pico del 553% a los 30 minutos mientras que en las LEW el nivel máximo aparece a los 20 minutos y es de un 336% (Schutz et al. 1994).

Los animales de la cepa F344 muestran mayores niveles de proteínas $G_{i\alpha}$ en el Nac, aunque no hay diferencias respecto a las proteínas $G_{o\alpha}$ y $G_{s\alpha}$ en comparación con la cepa LEW (Brodkin et al. 1998; Guitart et al. 1993). Es sabido que las proteínas G_i/o están ligadas a los receptores dopaminérgicos D2 y que inhiben la actividad de la enzima adenilato ciclasa (AC) por lo que parece que estos datos concuerdan con el hecho de que las F344 tengan mayores niveles de AC y de proteína quinasa A (Guitart et al. 1993) así como mayor densidad de receptores dopaminérgicos D2 ó D3 (Flores et al. 1998) que las LEW en el Nac. A diferencia de lo hallado con los receptores D2 y D3, no se han encontrado diferencias en los niveles de receptores dopaminérgicos del subtipo D1 entre las razas LEW y F344 (Flores et al. 1998) ni diferencias en la fijación a los receptores D1 ó D2 o en la expresión de su ARNm en el estriado (George et al. 1991; Luedtke et al. 1992) ni en la fijación al receptor D1 en el Nac. Sí se han encontrado diferencias entre ambas razas en otras zonas cerebrales. Por ejemplo, la raza F344 muestra mayores niveles de fijación al receptor del subtipo D1 en la corteza cingulada aunque menores niveles en varias capas de hipocampo, en las capas molecular y granular del giro dentado, partes ventral y central del núcleo talámico posterolateral y la parte reticular de sustancia negra (Martín et al. 2003). También se han hallado diferencias en los niveles del transportador dopaminérgico en el Nacc ya que parece que la raza LEW tiene menos que la F344 (Flores et al. 1998).

Aparte de las diferencias encontradas en el sistema dopaminérgico se ha podido comprobar que existen distinciones entre ambas razas en otros sistemas neurotransmisores que pueden estar implicados también en la búsqueda y consumo de drogas. Por ejemplo, en comparación con la raza LEW, la F344 tiene un mayor nivel basal de glutamato en la corteza prefrontal y en el Nacc (Selim y Bradberry, 1996) aunque esta última raza presenta un nivel menor de fijación al receptor N-metil-D-aspartato (NMDA) que la LEW en varias regiones cerebrales como las cortezas frontal y cingulada, el caudado putamen, el núcleo central de la amígdala y la capa blanca intermedia del colículo superior (Martín et al. 2003).

En cuanto al sistema serotoninérgico, las ratas de la raza F344 muestran mayores niveles basales de serotonina (5HT) en el Nacc (Selim y Bradberry, 1996) aunque los niveles basales del metabolito de la 5HT, ácido 5-hidroxi-indolacético (5-HIAA) son similares en ambas razas (Camp et al. 1994; Strecker et al. 1995). Hay que señalar, sin embargo, que los niveles de este metabolito se incrementan notablemente en el Nacc de las ratas F344 pero no en las LEW tras la administración de metanfetamina, aunque no de cocaína (Camp et al. 1994). A ello hay que añadir que las ratas F344 tienen mayores niveles de fijación al receptor de serotonina en la corteza frontal y en el hipocampo. Otras diferencias encontradas en el sistema serotoninérgico que creemos conveniente mencionar incluyen la mayor fijación al receptor 5HT1A y la mayor expresión de de su ARNm en el hipocampo por parte de los animales de la raza F344 en comparación con la LEW. Asimismo, la raza F344 muestra un mayor nivel de actividad de la enzima triptófano hidroxilasa, encargada de la síntesis de serotonina (Chaouloff et al. 1995).

Nuestro grupo se ha encargado de estudiar las características del sistema opioide en las razas LEW y F344. Los resultados arrojados por estas investigaciones demuestran que la raza LEW adquiere la conducta de autoadministración de morfina más rápidamente que la F344 con programas de condicionamiento operante de bajo requerimiento de respuestas (Razón Fija 1) (Ambrosio et al. 1995) y que esas diferencias se mantenían con programas de alto requerimiento de respuestas como los de Razón Progresiva que miden, además, la eficacia reforzante de las drogas (Martín et al. 1999). En este trabajo puedo también comprobarse que la raza LEW tiene menor contenido de ARNm de proencefalina en el estriado dorsal y en el Nac que la raza F344.

Con respecto a los receptores μ opioides, decir que se ha encontrado que los animales de la raza LEW tienen niveles menores en el estriado dorsal, el núcleo accumbens, en varios núcleos talámicos y en otras regiones cerebrales al ser comparados con los animales de la raza F344 (Oliva et al. 1999; Sánchez-Cardoso et al. 2002). Por otra parte, se ha encontrado que la raza F344 muestra un mayor nivel de expresión génica de encefalina en el hipotálamo (Sternberg et al. 1989) así como mayores niveles de dinorfinas en varias regiones cerebrales al ser comparada con la LEW (Nylander et al. 1995).

Estas diferencias en el sistema opioide entre ambas razas podrían traducirse en diferencias conductuales. Como hemos comentado antes, las ratas LEW adquieren más fácilmente la conducta de autoadministración de morfina y ello podría tener relación con el hecho de que esta raza muestre una menor presencia basal de elementos reguladores de su sistema opioide, receptores μ y niveles de proencefalina, al ser comparada con la F344, menos vulnerable al consumo de opiáceos.

Una vez vistas las diferencias entre estas dos cepas de rata pasamos a ver distintos aspectos de la morfina y el sistema opioide endógeno haciendo especial hincapié en las endomorfina.

1.4 La morfina y el sistema opioide endógeno

1.4.1 La morfina: farmacocinética, farmacodinámica, mecanismos efectores y acciones farmacológicas.

1.4.1.1 Farmacocinética

La morfina es un alcaloide procedente del opio (10% de su composición), jugo extraído de la planta *Papaver somniferum* que también contiene otros alcaloides como la codeína o la papaverina que son utilizados actualmente en clínica.

La morfina se absorbe fácilmente en el tracto gastrointestinal aunque, debido al efecto del primer paso hepático sólo alcanza una biodisponibilidad del 20-25%. La absorción por vía subcutánea o intramuscular es buena, con un período de latencia de unos 30 minutos. El máximo efecto se alcanza al cabo de una hora, persistiendo durante 3-5 horas. Mediante las vías epidural e intratecal se consiguen concentraciones satisfactorias en el líquido cefalorraquídeo. El efecto por vía intravenosa es muy rápido, con un tiempo de latencia de unos cinco minutos. También se consigue una buena absorción por las mucosas nasal y oral con los compuestos más lipofílicos como, por ejemplo, la heroína.

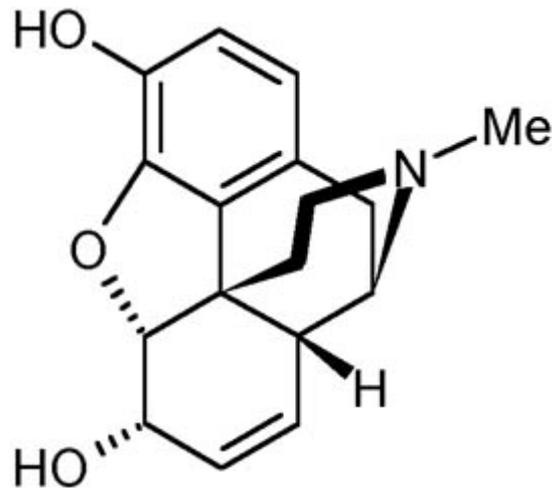


Figura 1-2. Estructura molecular de la morfina.

La morfina se une a proteínas plasmáticas en sólo un 35% debido a su gran hidrofilia. Pasa con dificultad la barrera hematoencefálica, pero se fija selectivamente en varios núcleos del SNC. No tiene ninguna dificultad, sin embargo, en atravesar la barrera placentaria.

La morfina se biotransforma principalmente por conjugación con ácido glucurónico, dando lugar a metabolitos activos e inactivos. El conjugado en posición 6 (morfina-6-glucurónido) es aún más potente, de diez a veinte veces más que la propia morfina, siendo su semivida plasmática de dos a tres horas.

Otras tres posibles vías metabólicas son la N-desmetilación de la morfina, que da lugar a normorfina, la sulfatación y la metilación (Flórez et al 2004).

La eliminación de la morfina tiene lugar fundamentalmente por filtración glomerular y, principalmente, como derivado conjugado, aunque una pequeña cantidad se elimina como morfina inalterada.

Sufre circulación enterohepática, eliminándose por heces un 5-10% en forma conjugada. También se elimina en pequeña cuantía por la leche materna.

1.4.1.2 Farmacodinámica y mecanismos efectores

En el apartado dedicado al sistema opioide endógeno se describirán en detalle los distintos tipos de receptores opioides existentes en el SNC de los mamíferos, por lo que en este epígrafe nos centraremos más en los mecanismos efectores.

La respuesta de una neurona a la presencia de un opioide se caracteriza por: 1) inhibición de la actividad bioeléctrica y 2) inhibición de la liberación del neurotransmisor en que esa neurona se ha especializado, sea cual fuere su naturaleza, activadora o inhibidora.

Los receptores opioides se encuentran acoplados a diversas formas de proteínas Gi/o, pertenecientes a la superfamilia con siete dominios transmembrana, según la localización neuronal del receptor, sensibles todas ellas a la toxina *pertussis*. La activación de las proteínas Gai/ao provoca inhibición de la adenilatociclasa con reducción del AMPc, apertura de canales de K⁺ y cierre de canales de Ca²⁺.

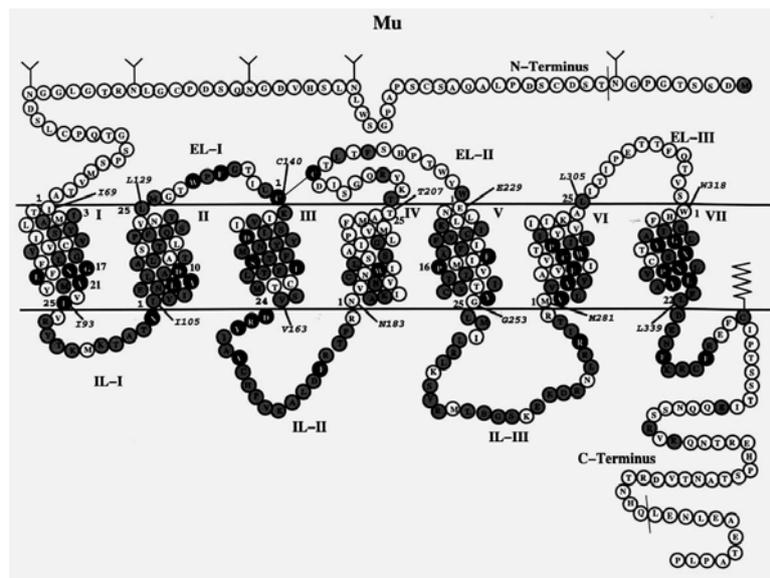


Figura 1-3. Representación de un receptor μ -opioide con los 7 dominios transmembrana.

El aumento de la conductancia al K⁺ produce hiperpolarización de membrana, reducción de la duración del potencial de acción e inhibición de la actividad de descarga de potenciales de acción por parte de la neurona. La consecuencia es una clara inhibición de la actividad bioeléctrica de la neurona y, en la terminación nerviosa, una reducción de la capacidad de liberar el neurotransmisor. Se ha comprobado este tipo de respuestas en múltiples regiones del sistema nervioso central (SNC) y del sistema

nervioso periférico (SNP): *locus coeruleus*, hipotálamo, médula espinal, núcleo parabraquial, ganglios raquídeos y plexo submucoso de la pared intestinal (Lorenzo et al. 2001).

El bloqueo de los canales de Ca^{2+} (algunos de los cuales son de tipo N) con reducción de la entrada de este ión, provoca, aparte de cambios de potencial de membrana, una inhibición de la liberación de neurotransmisores. La reducción de los niveles de adenosín monofosfato cíclico (AMPC) repercute en el estado de fosforilación de múltiples proteínas intraneuronales, incluidas las que se encuentran en el núcleo para regular procesos de transcripción a partir de genes de acción inmediata y de acción tardía.

1.4.1.3 Acciones farmacológicas

La morfina ejerce sus efectos más pronunciados en el SNC y, como podríamos esperar, estos efectos son dependientes de la dosis. En dosis pequeñas y medias (5-10 mg), los principales efectos subjetivos son somnolencia, disminución de la sensibilidad a estímulos externos e internos y pérdida de la ansiedad e inhibición. A estas dosis se produce relajación muscular, analgesia, ligera depresión respiratoria, contracción de las pupilas (miosis) y disminución de la capacidad de concentración; estos efectos suelen ser seguidos por el sueño (Feldman et al, 1997).

En dosis algo mayores se presenta euforia y el estado subjetivo es algo distinto a la relajación obtenida con dosis menores. La literatura habla a menudo del efecto llamado *rush* (subida) que se siente inmediatamente después de la inyección intravenosa de morfina o heroína y que ha sido comparada frecuentemente con un “orgasmo abdominal”.

Las náuseas que a menudo acompañan incluso a las dosis bajas, aumentan según lo hace la cantidad del fármaco administrado. Las náuseas son un efecto del SNC en el que se encuentra implicado el área postrema. Para los sujetos dependientes o adictos a opiáceos las náuseas pueden llegar a convertirse en una señal positiva al haber adquirido propiedades reforzantes secundarias que señalan la aparición de la euforia (Feldman et al. 1997).

Con dosis aún mayores, el sopor se transforma en pérdida de la consciencia, la contracción de las pupilas es aún mayor y la tasa respiratoria se ve peligrosamente disminuida. A estas dosis el centro respiratorio del tronco del encéfalo, que normalmente responde ante altos niveles de CO₂ en sangre aumentando la tasa y profundidad respiratorias, se encuentra deprimido y puede, en última instancia, conducir a la muerte. La función respiratoria puede verse aún más comprometida por la posible acción broncoconstrictora de los opiáceos debida al estímulo vagal y a la liberación de histamina.

La acción analgésica es la propiedad más importante de la morfina: suprime casi todos los tipos de dolor, cualquiera que sea su localización o intensidad. Podemos distinguir dos componentes en el fenómeno del dolor: 1) el dolor como sensación específica y 2) el dolor como sufrimiento, es decir, el componente afectivo o emocional del dolor. La morfina suprime, fundamentalmente, el componente afectivo del dolor y lo hace de manera selectiva en cuanto que lo consigue con dosis que no producen sueño ni anestesia, ni alteran otras modalidades sensoriales como la táctil, térmica o vibratoria.

1.4.1.4 El sistema opioide endógeno.

El hecho de que los fármacos opiáceos presentasen estereoespecificidad, que muchos de ellos tengan una gran potencia farmacológica y la posibilidad de fijación saturable, demostró la existencia de sitios de reconocimiento específico que se denominaron receptores opioides.

Por otra parte, en el organismo existen también sustancias fisiológicas endógenas con especificidad por estos receptores. Estas sustancias, “opioides endógenos”, son capaces de ocupar el receptor opioide y se comportan como la morfina. En la actualidad se conocen tres familias distintas de estos péptidos: las encefalinas, las endorfinas y las dinorfinas. Cada familia deriva de un polipéptido precursor diferente y posee una distribución anatómica característica. Dichos precursores se conocen como proopiomelanocortina (POMC), proencefalina (PENK) y prodinorfina (PDYN).

Estos precursores se caracterizan por poseer de manera repetida ciertas secuencias de péptidos biológicamente activos, tanto opioides como no opioides. Así la

POMC contiene la secuencia de aminoácidos de la hormona melanocito estimulante (γ -MSH), de la adrenocorticotropina (ACTH) y de la β -lipotropina (β -LPH). Dentro de la secuencia de 91 aminoácidos de la β -lipotropina se encuentran la β -endorfina y la β -MSH (véase Fig.1.3).

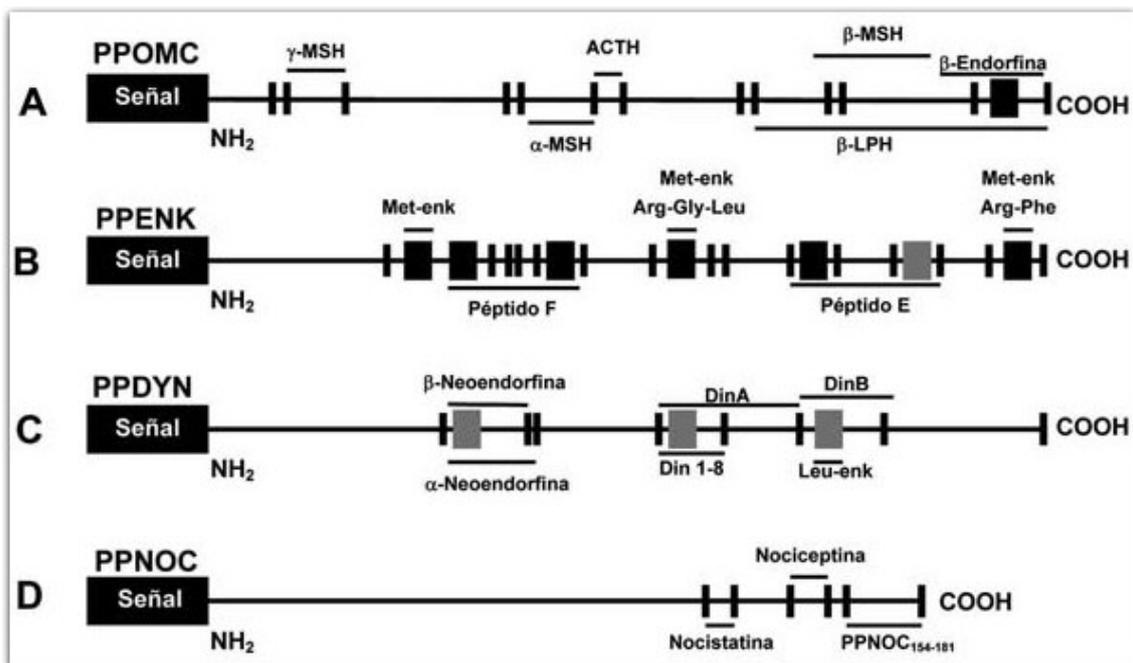


Figura 1-4 Procesamiento proteolítico de los precursores polipéptidos opioides.

La distribución de estos péptidos está relativamente limitada dentro del SNC. Los péptidos derivados de la proencefalina están en áreas del SNC relacionadas con la percepción del dolor, la afectividad, la modulación del control motor, la regulación del sistema nervioso autónomo (SNA) y las funciones neuroendocrinas. Los péptidos opioides no están confinados únicamente en el SNC: los péptidos derivados de la proencefalina también se encuentran en la médula adrenal y en plexos nerviosos y glándulas exocrinas del estómago y del intestino.

Los opioides endógenos y los fármacos opiáceos pueden interactuar con distintos tipos de receptores. Se ha sugerido la existencia de, al menos, tres tipos de

receptores opioides denominados *mu* (μ), *delta* (δ) y *kappa* (κ), habiéndose identificado igualmente algunos subtipos de estos receptores.

El receptor μ se expresa ampliamente en el SNC: neocórtex, estriado, núcleo accumbens, amígdala, tálamo, hipocampo, septum, sustancia negra, colículos inferiores y superiores, locus coeruleus, núcleo del tracto solitario, núcleo espinal del trigémino y asta dorsal de la médula espinal (Feldman et al. 1997).

Este receptor μ presenta dos subtipos en función de su afinidad relativa por los agonistas: μ -1, de alta afinidad y mediador, al ser activado, de la analgesia supraespinal, miosis y euforia; y μ -2, de baja afinidad y mediador de la depresión respiratoria, acciones gastrointestinales y otras.

Normalmente el receptor δ está colocalizado con el receptor μ , aunque de manera un poco más restringida. Se encuentra sobre todo en el neocórtex, el estriado, las áreas olfatorias, la sustancia negra y el núcleo accumbens (NAcc).

El receptor δ parece estar involucrado tanto en la analgesia de origen supraespinal como en la espinal; especialmente esta última en el dolor originado por estímulos térmicos. También se han identificado receptores δ -1 y δ -2. Los agonistas con mayor afinidad por el receptor δ son los opioides endógenos leu-enkefalina y met-enkefalina, así como sus análogos estructurales.

El receptor κ , con afinidad por la ketociclazocina y otros derivados del benzomorfanos, por ejemplo la pentazocina, media la analgesia, que no presenta el grado de tolerancia de los agonistas de los receptores μ y que parece ser de origen espinal. Su activación produce, en vez de euforia, disforia y efectos psicómiméticos (desorientación y despersonalización). Se ha propuesto la existencia de varios subtipos de receptor κ a partir de resultados obtenidos de ensayos de fijación y de estudios farmacológicos. Así, los κ -1 producirían analgesia a nivel espinal, mientras que los κ -3 aliviarían el dolor a través de mecanismos supraespinales. Se ha propuesto la existencia de receptores κ -2, pero sus propiedades farmacológicas se desconocen.

Los tres tipos de receptores se han clonado a partir de ácido desoxirribonucleico (ADN) humano. Al igual que los demás receptores asociados a proteínas G (se conocía desde hacía tiempo que los opioides inhiben la adenilatoclasa), los tres receptores

pertenecen a la familia de proteínas con siete dominios transmembrana. La homología de la secuencia de aminoácidos entre los tres alcanza hasta el 60% en su conjunto.

Recientemente, se ha clonado un receptor distinto de los otros tres aunque también asociado a proteínas G, con el 50-60% de homología. Ha sido denominado ORL-1 (*opioid receptor-like protein*). Su activación provoca también inhibición de la adenilatociclasa. Sólo tienen una ligera afinidad por este receptor las dinorfinas, si bien se ha aislado un nuevo péptido cerebral de 17 aminoácidos llamado nociceptina u orfanina. Está por aclarar todavía el papel real de este ligando y de su receptor, ya que se les ha propuesto una función doble algésica y analgésica.

1.4.1.5 Las endomorfinas.

Continuando con este repaso del sistema opioide endógeno hablaremos ahora de dos péptidos opioides endógenos descubiertos recientemente.

En la segunda mitad de la década de los noventa se identificaron dos péptidos que fueron nombrados endomorfina-1 (E-1), y endomorfina-2 (E-2). La E-1 posee mayor afinidad ($K_i=360$ pM, 0.36 nM) y selectividad por el receptor μ -opioide (4.000 veces más que por el δ y 15.000 que por el κ) que otros ligandos opioides endógenos incluida la β -endorfina (Zadina et al., 1997, 1999).

Sin embargo a pesar de las diversas acciones atribuidas a estos péptidos aún no se ha identificado un ácido ribonucleico mensajero (ARNm) específico que codifique un precursor para estos péptidos opioides como es el caso de otras familias de péptidos opioides: PENK, PDYN, POMC y proNoc/OFQ (Comb et al 1982; Nothaker et al 1996; Reischeid et al 2000).

Estructuralmente, las secuencias peptídicas codificadas por las endomorfinas son muy diferentes a las mostradas por diversos péptidos opioides endógenos. Mientras que los péptidos opioides clásicos como las encefalinas, las endorfinas y las dinorfinas comparte la secuencia Tyr-Gly-Gly-Phe en el terminal N, las endomorfinas muestran las secuencias Tyr-Pro-Trp-Phe la E-1 y Tyr Pro-Phe-Phe le E-2 (Fichna et al 2007).

En cuanto a su distribución en el sistema nervioso central las endomorfinas muestran patrones comunes y también característicos de cada una de ellas (Antón et al 1998, Martin-Schild et al 1999; Pierce et al 2000). Tanto la E-1 como la E-2 han sido localizadas en diversas estructuras del SNC de la rata: la estría terminal, la sustancia gris periacueductal, el locus coeruleus, el núcleo parabraquial, el hipotálamo y el núcleo del tracto solitario. Sin embargo la E-1 parece estar densamente distribuida en diversas regiones prosencefálicas como el núcleo accumbens, la corteza, el tálamo y el cuerpo estriado así como en el troncoencéfalo superior: núcleo del tracto solitario y ganglios de la raíz dorsal (Martin-Schild et al 1999; Schreff et al 1998). Por su parte la E-2 se localiza principalmente en la médula espinal y en el troncoencéfalo inferior y particularmente en el núcleo del tracto solitario, la sustancia gelatinosa del bulbo raquídeo y en las capas superficiales del asta dorsal de la médula espinal así como en el hipotálamo lateral (Antón et al 1998; Martin-Schild et al 1999; Schreff et al 1998).

Numerosos estudios han demostrado claramente que es el receptor μ -opioide el que media las acciones de las endomorfinas en el SNC de los mamíferos (Fichna et al 2007). La hipótesis que apunta a que las endomorfinas son los ligandos endógenos de los receptores μ -opioides surgió de varios estudios que mostraron que ambas endomorfinas desplazaban a la [D-Ala², N-MePhe⁴, Gly-ol]-encefalina (DAMGO), a la naloxona y a otros ligandos selectivos de los receptores μ -opioides de forma dependiente de la concentración (Horvath, 2000). Es más, estudios autorradiográficos que usaron trazadores marcados radiactivamente mostraron que la distribución de estos ligandos coincidía con la distribución de DAMGO en el cerebro de los roedores (Fichna et al 2007).

Sin embargo basándose en la baja eficacia de las endomorfinas para estimular el receptor μ -opioide, comparada con el DAMGO y con la morfina, ambos péptidos han sido considerados como agonistas parciales de los receptores μ -opioides (Sim et al 1998; Alt et al 1998).

Además, varios estudios farmacológicos han mostrado que las endomorfinas producen sus efectos biológicos regulando de manera diferencial los dos subtipos del receptor μ -opioide μ_1 y μ_2 (Sakurada et al, 1999; Tseng et al, 2000; Sakurada et al, 2000). Por ejemplo el antagonista del receptor μ_1 naloxonacina despliega una gran eficacia en

bloquear la antinocepción inducida por la E-2 en comparación con la mostrada por la E-1. En cambio el antagonista de los receptores μ -opioides β -funaltrexamina es capaz de inhibir la antinocepción inducida por ambas endomorfinas (Sakurada et al, 1999; Tseng et al, 2000; Sakurada et al, 2000).

Es interesante resaltar el hecho de que en varios estudios *in vivo* que utilizaron técnicas de *binding* con radioligandos además de otros en los que se empleó la autorradiografía se encontró que las endomorfinas marcaron varias zonas en las que también marca el DAMGO en el cerebro de la rata apoyando el papel endógeno de estos dos péptidos como ligandos peptídicos del receptor μ -opioides (Fichna et al 2007).

Existe un gran número de estudios tanto celulares como farmacológicos que muestran que la exposición crónica a agonistas de los receptores μ -opioides median los cambios de larga duración y las adaptaciones celulares que subyacen al desarrollo de la tolerancia y la dependencia física a los opiáceos tanto en animales como en humanos (Defer et al, 2000; Heyne et al 2000; Law et al 2000). Estudios *in vitro* han mostrado que la administración crónica tanto de E-1 como de E-2 produce el desarrollo de tolerancia en líneas celulares específicas de tumores neuronales (Higashida et al 1998; McConalogue et al, 1999). Por otra parte, las endomorfinas han mostrado que pueden producir endocitosis y tráfico de los receptores μ -opioides (Böhm et al 1997) lo cual parece mediar en la desensibilización, la resensibilización y la regulación a la baja de distintos mecanismos moleculares implicados en la capacidad de respuesta celular a la estimulación por ligando implicada en el desarrollo de la tolerancia opioide y de la adicción a drogas (Böhm et al 1997).

Por otra parte y mediante experimentos *in vivo* se ha comprobado que las endomorfinas pueden provocar la aparición de signos característicos del síndrome de abstinencia de opiáceos del tipo de los producidos por dosis similares de morfina (Chen et al 2003). El método utilizado fue la administración intracerebroventricular (i.c.v.) durante 5 días seguida de la administración de naloxona intraperitoneal (i.p.).

La mayoría de los péptidos opioides sufren una rápida degradación enzimática (Egleton, 1998). Existen estudios *in vitro* que muestran la participación de la aminopeptidasa M en dicha degradación (Tomboly et al 2002; Janeka et al 2006). Hay también estudios *in*

vivo que muestran que hay dos grupos de enzimas que son los principales responsables de la degradación de las endomorfina: la dipeptidil peptidasa IV, que inicia el proceso y las aminopeptidasas que están implicadas en el procesamiento ulterior (Shane et al 1999; Sakurada et al 2003; Janecka et al 2008).

Es interesante destacar que algunos investigadores creen que la E-1 es más resistente a la degradación *in vivo* que la E-2 (Fujita y Kumamoto, 2006) lo que concuerda con el hecho de que la duración de los efectos antinociceptivos espinales es mayor en el caso de E-1 que en el de la E-2 (Grass et al 2002) y con el estudio de Stone y colaboradores de 1997 en el que se comprobó que la E-1 necesita de más tiempo que la E-2 para el desarrollo de tolerancia.

Tras estudiar si los metabolitos de la E-1 poseían afinidad por el receptor μ -opioide pudo comprobarse que ni la poseían ni activaban a las proteínas-G ni tenían efectos antinociceptivos (Szatmari et al 2001).

En cuanto al papel neurofisiológico que juegan las endomorfina son diversos los estudios al respecto y apuntan a varios procesos biológicos de gran importancia como la percepción del dolor, las respuestas al estrés y funciones complejas como la recompensa, la vigilancia y la homeostasis en sentido amplio (autonómica, cognitiva, neuroendocrina y límbica).

La presencia de endomorfina en vías nociceptivas bien caracterizadas apunta claramente a su papel en la modulación del dolor (Fields y Basbaum, 1994; Guilbaud et al 1994). Además, Zadina (2002) ha sugerido que la E-2 endógena, debido a su localización neuroanatómica específica, podría estar implicada en las primeras etapas del procesamiento de la información nociceptiva.

Por otra parte parece estar bien establecido el hecho de que es el área tegmental ventral (ATV) la región cerebral crítica en cuanto a los efectos μ -opioides en la motivación tras la administración de sustancias afines a dicho receptor. Dichos receptores se encuentran en neuronas gabaérgicas que inervan células dopaminérgicas del ATV que a su vez inervan el núcleo accumbens (Johnson y North, 1992; Margolis et al 2003).

Del mismo modo a como sucede con la morfina y el DAMGO las endomorfinas inyectadas (i.c.v.) en el ATV posterior dan lugar a condicionamiento de lugar y producen notables efectos estimulantes psicomotores (Zangen et al 2002). La E-1 inyectada en el ATV posterior hace además que los animales experimentales adquieran la conducta de autoadministración de la sustancia. Parece que existen diferencias entre los efectos reforzantes que producen las endomorfinas según la especie animal en que se investigue. En ratones se ha encontrado que la E-1 produce condicionamiento de lugar mientras que la E-2 produce aversión al lugar (Narita et al 2001a, b). Sin embargo en ratas se ha encontrado que ninguna de las dos endomorfinas utilizando una dosis baja (15µg) produce efecto reforzante alguno en el paradigma de preferencia de lugar (Huang et al 2004). Por el contrario los animales tratados con altas dosis de E-2 (30 µg) mostraron una clara preferencia de lugar mientras que los animales tratados con 30 µg de E-1 mostraron ciertos movimientos del tronco del cuerpo que hicieron imposible la prueba de preferencia de lugar (Huang et al 2004).

Tras esta revisión al sistema opioide endógeno abordaremos a continuación el sistema glutamatérgico que ha pasado a ser el segundo sistema neurotransmisor más estudiado, tras la dopamina, en el ámbito de las adicciones.

1.5 El sistema glutamatérgico

1.5.1 El glutamato y las vías glutamatérgicas

El glutamato es el principal neurotransmisor excitatorio del SNC de los mamíferos. Se trata de un aminoácido no esencial y su paso desde la circulación sanguínea al cerebro a través de la barrera hematoencefálica es mucho menor que al contrario, por lo que el aporte proveniente de la sangre desempeña un papel mínimo en los niveles cerebrales de glutamato.

Tan sólo unos pocos aminoácidos han podido cumplir la mayoría de los criterios para ser considerados neurotransmisores y ello no ha sido una labor sencilla debido al hecho de que muchos aminoácidos están implicados en el metabolismo intermediario y, obviamente, en la síntesis de proteínas. El glutamato, en concreto, está implicado en la detoxificación del amoníaco y en la síntesis del ácido gamma-aminobutírico (GABA).

Todo ello hace difícil distinguir su papel bioquímico de su posible papel transmisor. Sin embargo, se sabe que el glutamato media la mayoría de la transmisión sináptica excitatoria del SNC.

En cuanto a las vías glutamatérgicas, su localización ha avanzado a un ritmo mucho menor que la de muchos otros transmisores. Ello es debido a los mismos motivos, ya comentados, que dificultan la caracterización como neurotransmisores de los aminoácidos. Sin embargo, el desarrollo de anticuerpos dirigidos a los aminoácidos excitatorios, especialmente los que distinguen aspartato de glutamato, y a sus receptores y transportadores, ha facilitado la localización anatómica de las vías glutamatérgicas.

El glutamato se encuentra sobre todo en una serie de vías descendentes cuyo origen son células piramidales neocorticales (entre ellas la vía corticoestriada, así como otras proyecciones dirigidas a distintas estructuras límbicas, diencefálicas y troncoencefálicas). Asimismo, es el neurotransmisor de diversas vías intrahipocampales y de proyecciones hipocampales (Fonnum, 1984; Nieuwenhuys, 1985). Por otra parte, existe evidencia de que el glutamato es el transmisor utilizado por las interneuronas excitatorias en la médula espinal así como por muchos, si no todos, los terminales de las neuronas aferentes primarias (Broman et al., 1993; Watkins, 1984).

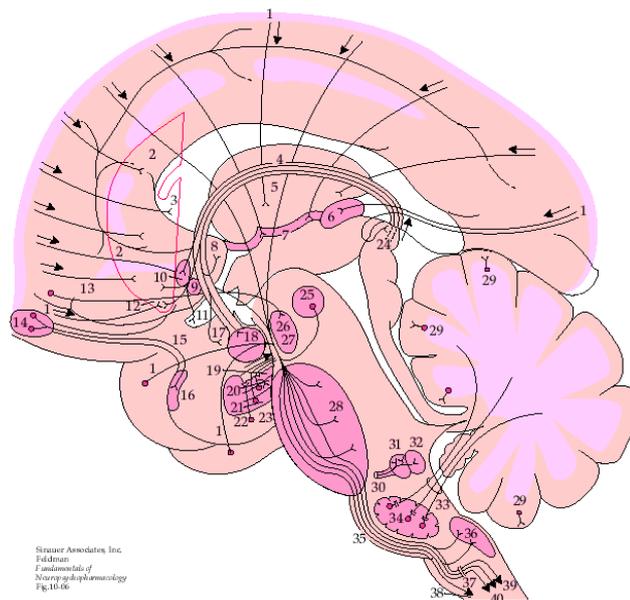


Figura 1-5. Vías neuronales que utilizan aminoácidos excitatorios (glutamato o aspartato) como transmisores.

1.5.2 Receptores glutamatérgicos

Existen varias clases de receptores con los que el glutamato puede interaccionar, algunos de ellos están ligados directamente a un canal iónico y son denominados según el nombre del agonista que los activa con mayor efectividad. Son los receptores kainato (KA), AMPA (ácido alfa-amino-3-hidroxi-5metilisoazol-4-propiónico) y NMDA (N-metil-D-aspartato). Un cuarto receptor para el glutamato, en vez de estar directamente ligado a canales iónicos, lo está a proteínas G. Se trata del mGluR o receptor metabotrópico del glutamato.

Los receptores ionotrópicos son complejos relativamente grandes, formados por cinco proteínas individuales que se combinan para formar un canal iónico a través de la membrana. Estos canales son muy impermeables a los iones en ausencia del neurotransmisor, pero cuando éste se une a los sitios de reconocimiento del receptor, se producen unos cambios conformacionales que abren el canal y permiten a los iones fluir según sus gradientes electroquímicos.

1.5.2.1 Receptores NMDA

Los receptores NMDA presentan una serie de características que los hace diferentes de otros receptores controlados por ligando. Con potenciales de membrana por debajo de aproximadamente -50 mV, la concentración extracelular del catión divalente magnesio es suficiente para, prácticamente, abolir el flujo de iones a través de los canales del receptor NMDA, incluso en presencia de glutamato. Por ello, con potenciales de membrana de reposo, unos -70 mV, la activación de estos receptores no produce más que pequeños flujos de corriente debido a que la entrada del magnesio en el canal bloquea el paso a iones monovalentes.

Sin embargo, según el potencial de membrana va siendo menos negativo, la afinidad del magnesio por su lugar de unión decrece, así como su acción bloqueadora, por lo que ya puede pasar la corriente iónica a través del canal (Nestler et al. 2001). Para que esto ocurra, la membrana ha de ser despolarizada por la acción de los receptores AMPA, que suelen encontrarse cerca de los NMDA, tras ser estimulados por glutamato.

Otra característica de los receptores NMDA es que permiten el paso a través de ellos, no sólo de sodio y potasio como los AMPA y los cainato, sino también de calcio. De hecho, su permeabilidad al calcio es unas 10 veces mayor que al sodio, de tal manera que los receptores NMDA representan uno de los mecanismos más significativos por los que la actividad sináptica puede incrementar el nivel de calcio intracelular en sinapsis individuales.

Por otro lado, estos receptores presentan la característica única entre los receptores de neurotransmisores, consistente en la necesidad de la unión simultánea de dos agonistas diferentes para su activación. Además de la unión del glutamato, en su lugar correspondiente, es necesaria la unión de la glicina en su propio lugar de unión, por lo que se les ha llamado coagonistas del receptor NMDA. Esta implicación de la glicina provee a estos receptores de otra vía para afinar con precisión su actividad.

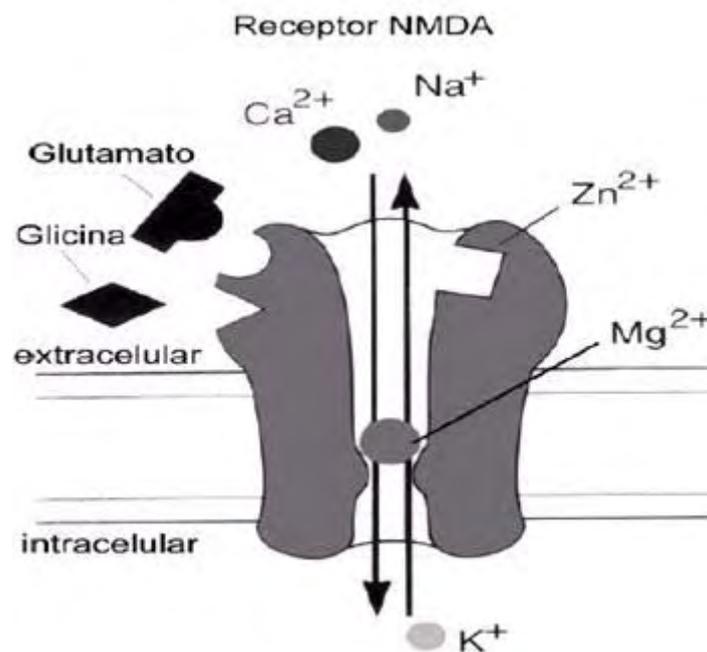


Figura 1-6. Representación esquemática de un receptor NMDA.

Los receptores NMDA se encuentran entre los más estrechamente regulados ya que poseen, al menos, seis lugares de unión distintos para ligandos endógenos que pueden influir la probabilidad de apertura del canal iónico. Estos lugares son el del glutamato, el de la glicina (agonistas) y un lugar regulatorio de la poliamina,

contribuyendo los tres a la activación del receptor. Por otro lado, tenemos los sitios de reconocimiento para el magnesio, el cinc y el hidrógeno, que inhiben el flujo de iones.

Otro importante inhibidor alostérico endógeno de la activación del receptor NMDA es el pH. Este factor puede influir en la frecuencia con que el canal se abre de manera tal que un pH de 6.0 suprime la activación del receptor casi por completo, siendo el punto medio un pH de 7.4.

A menudo se habla de estos receptores como “detectores de coincidencias” debido a que para lograr su activación y el paso del calcio es necesaria la ocurrencia de dos eventos simultáneamente: la liberación presináptica de glutamato y la despolarización de la membrana postsináptica.

Una activación excesiva de los receptores NMDA puede dañar, e incluso matar, a las neuronas diana por medio de un proceso conocido como excitotoxicidad y que se debe a una entrada excesiva de calcio en la célula.

El receptor NMDA está compuesto por dos clases de subunidades diferentes: NMDAR1 y NMDAR2. De la primera se pueden dar hasta ocho variantes de empalme, las cuales, producen diferencias en las propiedades del receptor en que se expresan.

Otros cuatro miembros de la familia NMDA han sido clonados (NMDAR2A-2D). Estas cuatro subunidades no forman canales cuando se expresan ellas solas o en combinación, a menos que se produzca una coexpresión con la subunidad NMDAR1, por lo que parece que esta desempeña una función esencial en la formación del poro funcional. Las subunidades 2A-2D parecen ejercer papeles moduladores en la actividad del receptor al expresarse junto con la NMDAR1 en forma heteromérica.

La coexpresión de NMDAR1 con cualesquiera de las otras subunidades produce corrientes mucho mayores, de 5 a 60 veces, que cuando se expresa solo.

Todas las subunidades NMDAR tienen un residuo asparagina (Asn) neutro pero polar en una determinada posición del dominio TM2, esencial para producir permeabilidad al calcio. Este residuo también parece formar parte del lugar de unión del magnesio, lo que sugiere que puede haber cierto solapamiento entre los sitios de unión del magnesio y de permeabilidad del calcio.

1.5.2.2 Receptores no-NMDA

Tanto los receptores AMPA como los kainato median la transmisión sináptica excitatoria rápida y se encuentran asociados principalmente a canales independientes del voltaje, que median corrientes despolarizantes fundamentalmente por la entrada en la célula de iones Na^+ . Sin embargo, existen unas pocas poblaciones celulares que poseen receptores AMPA permeables al Ca^{2+} . Esta característica depende de la presencia de una subunidad llamada GluR2 de modo que cuando está presente, el receptor no es permeable al Ca^{2+} y viceversa (Bochet et al., 1994; Hollmann et al., 1991).

El paso del calcio del espacio extracelular al interior celular juega un papel fundamental en la regulación de diversos sistemas de segundo mensajero. Así, esta propiedad de algunos receptores AMPA glutamatérgicos puede tener una gran importancia funcional, especialmente en células que carezcan de receptores NMDA.

Cuatro subunidades llamadas GluR1 a GluR4 se ensamblan entre ellas para formar proteínas con perfiles farmacológicos idénticos a los de los receptores AMPA. Cada una de estas subunidades es codificada por un gen distinto y cada una existe en dos formas denominadas *flip* y *flop* que son generadas por empalme alternativo (Sommer et al., 1990), mostrando patrones regionales de expresión específicos. Además, las dos variantes de las subunidades GluR dan lugar a receptores con tasas de desensibilización diferenciales: las corrientes iónicas asociadas a subunidades *flip* muestran una desensibilización más lenta que aquellas asociadas a subunidades *flop*.

La estructura y función de estos receptores es regulada además de por la expresión alternativa mencionada, por medio de la fosforilación. Dicha fosforilación puede ser catalizada por la proteína quinasa C (PKC) y por la proteína quinasa dependiente de Ca^{2+} /calmodulina (CaMK), pero aparentemente no lo es por la proteína quinasa dependiente de AMPc (PKA). Además, la fosforilación parece aumentar la amplitud de las corrientes iónicas, lo cual sugiere que este mecanismo regulatorio podría jugar un papel en procesos de plasticidad sináptica como la potenciación a largo plazo, que implica la participación de receptores AMPA (Feldman et al. 1997).

Las subunidades GluR5 a GluR7 se ensamblan con las KA1 y KA2 para formar receptores kainato funcionales. Mediante experimentos con radioligandos se ha conseguido establecer que en los receptores homoméricos formados con subunidades GluR5, GluR6 y GluR7, el [3H]-kainato se une con una afinidad de aproximadamente 80-100 nM, lo cual podría corresponder a sitios de unión de baja afinidad previamente identificados. En cambio, receptores homoméricos de subunidades KA1 muestran una afinidad de 4 nM y podrían corresponder a sitios de unión del kainato de alta afinidad. Sin embargo las subunidades KA1 y KA2, cuando se expresan solas, son virtualmente inactivas debido a que carecen de canales funcionales. Por ello se cree que sirven como subunidades modulatorias que confieren una capacidad de unión de alta afinidad al kainato en canales formados por subunidades GluR5 a GluR7 (Nestler et al., 2001).

1.5.2.3 Receptores metabotrópicos

Los receptores ionotrópicos del glutamato se diferencian en muchos aspectos de los mGluR o receptores de glutamato metabotrópicos. En primer lugar, los mGluR no controlan directamente canales iónicos, sino que lo hacen a través de una cascada de eventos en los que están implicadas proteínas G, enzimas, segundos mensajeros, etc.

Como todos los receptores ligados a proteínas G, los mGluR cuentan con siete regiones transmembrana aunque, al igual que los receptores ionotrópicos, tienen un terminal N extracelular inusualmente grande que precede a las regiones que atraviesan la membrana. También posee un terminal C muy grande para un receptor ligado a una proteína G.

Los mGluR son considerablemente mayores que otros receptores ligados a proteínas G y presentan poca homología con ellos en su secuencia de aminoácidos. Además existe una gran diferencia en su estructura, en comparación con otros receptores metabotrópicos: el lugar de unión para el glutamato parece estar situado en el gran dominio extracelular del terminal N, mientras que en la mayoría de los receptores metabotrópicos, el lugar de unión está formado por los segmentos transmembrana y parcialmente embebido en la propia membrana.

Por todo ello, se cree que los mGluR evolucionaron independientemente de otros receptores metabotrópicos y que su origen está en una familia distinta de receptores. El tercer lazo intracelular, que se cree que es el principal determinante de la unión con

proteínas G en otros receptores, es relativamente pequeño en mGluR aunque, como hemos dicho, el terminal C es bastante grande. La unión entre los mGluR y sus respectivas proteínas G debe darse a través de determinantes únicos que probablemente ejercen sus efectos en el gran dominio del terminal C.

Se puede dividir a esta familia de receptores en tres grupos según su homología en la secuencia de aminoácidos, perfiles farmacológicos a agonistas y vías de transducción de señales. Los miembros de cada clase comparten el 70% aproximadamente de su secuencia de aminoácidos mientras que entre clases comparten el 45% aproximadamente.

El grupo I. Este grupo comprende a los receptores mGluR1 y mGluR5 y está relacionado con la estimulación de la actividad de la fosfolipasa C (PLC) por medio de la proteína Gq. La fosfolipasa C hidroliza al fosfolípido fosfatidil inositol 4,5-bisfosfato (PIP₂), lo que lleva a la formación de inositol 1,4,5- trifosfato (IP₃) y de diacilglicerol (DAG), ambos segundos mensajeros.

El grupo II. Está formado por mGluR2 y mGluR3, ambos inhiben la adenilciclase (AC) y regulan canales iónicos específicos de potasio y calcio, probablemente mediante proteínas G del tipo Gi, ya que la respuesta es bloqueada por la toxina *pertussis*.

El grupo III. Comprende a los mGluR4, 6, 7, y 8. Igualmente inhiben la AC y regulan canales iónicos de potasio y calcio mediante proteínas Gi. Sin embargo los receptores de este grupo muestran una preferencia por agonistas diferente a los de grupo II.

Los mGluR postsinápticos modulan diversos canales iónicos controlados por ligando y controlados por voltaje. Todos ellos inhiben los canales de calcio controlados por voltaje del tipo L, mientras que los de los grupos I y II inhiben los del tipo N. La activación de los mGluR cierra también canales de potasio dependientes de calcio, sensibles a la acetilcolina (ACh) y dependientes de voltaje, aunque el mecanismo que media estas acciones aún es desconocido.

Diversos tipos de mGluR se encuentran localizados en terminales presinápticas de neuronas centrales y su activación bloquea tanto la transmisión glutamatérgica excitatoria como la gabaérgica inhibitoria en muchas regiones del SNC. Un mecanismo

por el que la activación de los mGluR disminuye la liberación de neurotransmisor puede implicar la inhibición de los canales de calcio controlados por voltaje en la membrana del terminal presináptico.

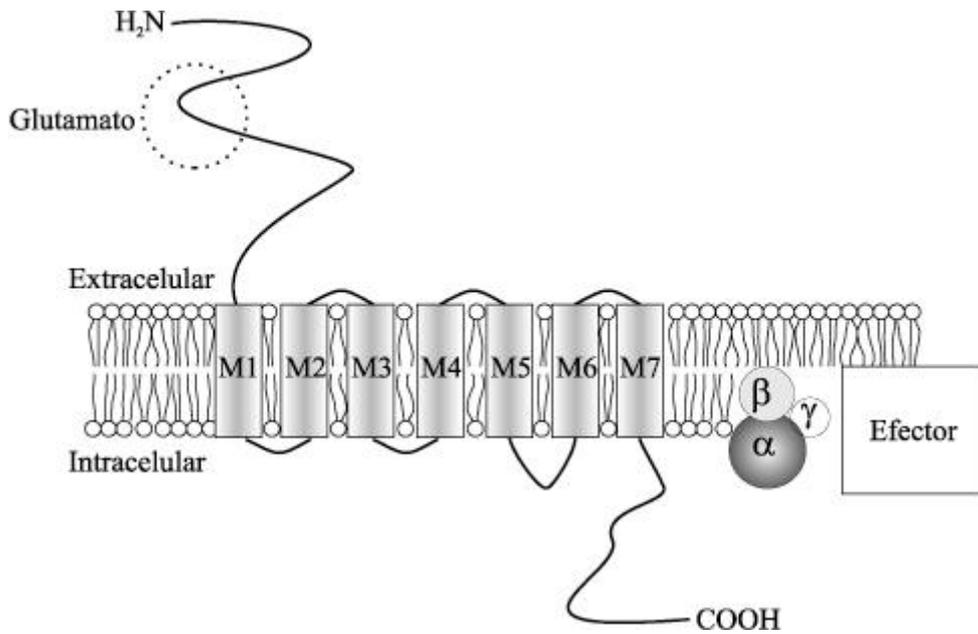


Figura 1-7. Representación esquemática de un receptor metabotrópico glutamatergico.

1.5.3 Los receptores NMDA en los estudios de drogadicción

Se han comprobado interacciones entre los receptores NMDA y los receptores opioides. La evidencia acerca de la modulación de los receptores NMDA debida a la unión de opioides a sus receptores y, a la inversa, la modulación de los receptores opioides, causada a su vez por la unión a los receptores NMDA de sus agonistas, arroja cierta luz sobre los mecanismos celulares e intracelulares implicados en la antinocicepción, la tolerancia y la neuroplasticidad.

Hay que destacar el hecho de que los patrones de distribución de los receptores NMDA y de los receptores μ -opioides son similares en diversas regiones del SNC (Mao, 1999). Además, un estudio ha mostrado la colocalización de receptores μ -

opioides y NMDA, en lugares tanto presinápticos como postsinápticos, de la concha o *shell* del núcleo accumbens (Gracy et al. 1997), lo que confirma la existencia de un sustrato esencial para las interacciones entre receptores μ y NMDA en una misma neurona.

Existe evidencia de que la unión a los receptores NMDA puede verse afectada por los opioides y viceversa (Mao, 1999). En concreto, se ha comprobado en ratas, examinando *in vitro* la unión al receptor tras la administración *in vivo* de una sustancia, que la unión de [³H]-DAMGO, un agonista selectivo de los receptores μ , se reguló a la baja tras la infusión continua de morfina y que este efecto podía prevenirse con un tratamiento con el antagonista NMDA no competitivo MK-801, pero no con el competitivo D-AP5 (Wong et al. 1996). En otro estudio, utilizando la técnica del desplazamiento o potenciación de la unión a un receptor tras añadir el agente *in vitro*, se mostró que la dinorfina A potencia la unión de [³H] CGP-39653 (un antagonista competitivo NMDA), posiblemente debido a una interacción con el lugar de unión para la glicina del receptor NMDA (Dumont y Lemaire, 1994). La combinación de los resultados de los estudios realizados *in vitro* y de los llevados a cabo *in vivo* sugiere que existe una interacción, ya sea directa o indirecta, entre los receptores NMDA y los opioides (Mao, 1999).

Un considerable número de estudios indica claramente que los opioides pueden modular directamente los eventos electrofisiológicos mediados por el receptor NMDA. Cabe mencionar algunas características importantes de estas modulaciones. Primero, la electrofisiología de los receptores NMDA ha mostrado cambios tanto inhibitorios como excitatorios, dependiendo de las preparaciones utilizadas en los experimentos. Segundo, parece que los opioides modulan de manera diferente la electrofisiología de los receptores NMDA según la localización pre o postsináptica del receptor. Tercero, los perfiles de esta modulación son distintos dependiendo de si el agonista utilizado actúa en los receptores μ , δ o κ (Mao, 1999).

Por otro lado, y apoyando esta interacción, cabe mencionar el hecho de que los antagonistas de los receptores NMDA inhiben el desarrollo de tolerancia a los efectos analgésicos de la morfina (Trujillo y Akil, 1991; Marek et al. 1991), así como el desarrollo de sensibilización (Jeriorski et al. 1994; Wolf y Jeriorski, 1993) y dependencia física a la morfina (Trujillo y Akil, 1991).

Respecto a la tolerancia a la analgesia inducida por morfina, decir que existen numerosos estudios (Bilsky et al. 1996; Elliott et al. 1994; Fundytus et al. 1994; Grisel et al. 1996; Jhamandas et al. 1996; Lufty et al. 1996; Manning et al. 1996, entre otros) que muestran que la co-administración continuada de morfina con distintos antagonistas del receptor NMDA tanto competitivos (AP-5, LY235959, LY274614 y ACEA-1328) como no competitivos (MK-801, CPP, dextrometorfano, y memantina) previene el desarrollo, aunque no la expresión, de tolerancia en ratas y ratones, sin afectar la analgesia inducida por esta droga. Se han empleado distintas vías de administración tanto para la morfina (subcutánea, intravenosa, intratecal, intracerebroventricular, intraperitoneal y oral) como para los antagonistas NMDA (subcutánea, intratecal e intraperitoneal). Esta inhibición del desarrollo de tolerancia a la analgesia inducida por morfina ha sido demostrada tanto con la administración de dosis discretas de morfina como con la infusión continua mediante bombas osmóticas. Los tests conductuales empleados para medir el grado de analgesia incluyen el de la formalina, el *hot-plate* y el *tail-flick*.

Aunque se ha encontrado que otros compuestos son capaces de modificar tanto la analgesia como la tolerancia inducidas por opiáceos (Bhargava, 1994), la capacidad de inhibir el desarrollo pero no la expresión de la tolerancia a opiáceos parece ser privativa de los antagonistas NMDA y de otros compuestos, como los inhibidores de la sintasa del óxido nítrico, que inhiben los procesos desencadenados por la estimulación de estos receptores. Todo ello sugiere que los receptores NMDA están implicados en la plasticidad neural responsable del desarrollo de tolerancia a los efectos analgésicos de la morfina.

Debemos mencionar que la tolerancia implica tanto componentes asociativos como no asociativos y que dos estudios han examinado el papel de los receptores NMDA en la tolerancia asociativa y en la no asociativa (Ben Eliyahu et al. 1992; Grisel et al. 1996). El antagonismo de los receptores NMDA con MK-801 ha mostrado ser particularmente efectivo en prevenir la tolerancia no asociativa a los efectos de la morfina.

Wolf y colaboradores fueron los primeros en informar sobre la capacidad de los antagonistas de los receptores NMDA de inhibir la sensibilización inducida por opiáceos (Jeziorski et al. 1994; Wolf y Jeziorski, 1993). Estos investigadores

encontraron que tanto el antagonista no competitivo MK-801 como el competitivo CGS19755, inhibían el desarrollo de la sensibilización a los efectos estimulantes locomotores de la morfina. El patrón observado era sorprendentemente parecido al visto con la tolerancia: los antagonistas inhibían el desarrollo pero no la expresión de la sensibilización a la morfina.

Sin embargo, otras investigaciones llevadas a cabo por otros grupos presentan un panorama más complejo. Por ejemplo, Vanderschuren y colaboradores (1997) informaron de que sólo altas dosis de MK-801 (que en combinación con la morfina eran letales en un alto porcentaje) tenían la capacidad de inhibir la sensibilización a los efectos estimulantes locomotores de la morfina en ratas. Por ello sugirieron que el efecto podría deberse a una interacción no específica en vez de a la inhibición de la plasticidad neural (Trujillo, 2003).

Iijima y colaboradores, con estudios hechos en ratones, también hallaron que eran necesarias altas dosis de MK-801 para inhibir la sensibilización inducida por morfina (Iijima et al. 1996). Aunque no se encontró letalidad, las dosis necesarias para inhibir la sensibilización producían por sí mismas una considerable estimulación motora.

No obstante, el grupo de Trujillo ha encontrado que bajas dosis de MK-801 son suficientes para inhibir el desarrollo, aunque no la expresión, de la sensibilización a los efectos locomotores de la morfina (Swadley-Lewellen y Trujillo, 1998; Trujillo y Watorski, 1999).

Wolf ha sugerido una solución potencial a estas discrepancias (Wolf, 1998) según la cual la sensibilización asociativa, o dependiente del contexto, sería menos sensible a la inhibición por antagonistas NMDA que la sensibilización no asociativa, o independiente del contexto. De hecho, los estudios llevados a cabo por Trujillo y colaboradores fueron realizados de forma que se facilitaba el desarrollo de la sensibilización independiente del contexto.

En relación a la dependencia física, tanto el MK-801 como el dextrometorfano y la memantina han demostrado prevenir su desarrollo, utilizando para evaluar el nivel de dependencia, diversos tests tras la inducción del síndrome de abstinencia con naloxona tanto en ratas como en ratones (Fundytus et al. 1994; Jhamandas et al. 1996; Kreeger et

al. 1994; Mao et al. 1996, entre otros). Consistentemente con estos hallazgos, se ha comprobado que los signos de la retirada de morfina en ratas con tolerancia se ven acompañados de la liberación de glutamato en la espina dorsal (Jhamandas et al. 1996).

Parece que los efectos del antagonismo NMDA sobre la dependencia son similares a los efectos sobre la tolerancia: inhibe el desarrollo pero no la expresión. En otras palabras, los antagonistas NMDA inhiben diversos signos de la retirada de morfina si son administrados junto con la morfina durante la adquisición de la dependencia física. Si, por el contrario, son administrados inmediatamente antes de la administración de naloxona, parece que no afectan a los signos emergentes tras la retirada de la droga.

Sin embargo, existen diversos estudios que informan de que los antagonistas de los receptores NMDA inhiben la expresión de la dependencia física a los opiáceos (González et al. 1997; Koyuncuoglu et al. 1990; Rasmussen et al. 1991; Tanganelli et al. 1991; Higgins et al. 1992, entre otros) aunque ello podría ser el resultado de un efecto inespecífico en vez del bloqueo específico de los procesos neurales responsables de los efectos de la retirada de opiáceos. Un punto importante que apoyaría esta posibilidad es el hecho de que son necesarias dosis mayores para inhibir la expresión de la retirada de morfina de las necesarias para inhibir el desarrollo de dependencia física (Trujillo y Akil, 1995; Trujillo y Akil, 1993; Trujillo, 1995). Además, las dosis necesarias para inhibir la expresión de los signos de la retirada tienen, por sí mismas, la capacidad de producir efectos locomotores significativos.

Por último, decir que existe abundante literatura que apoya el hecho de que el glutamato juega un papel en el aprendizaje y otros procesos adaptativos en modelos animales de adicción a drogas (Kauer, 2004; Kelley et al. 2003; Wolf, 1998; Jackson et al. 2000). Tanto la transmisión como los receptores glutamatérgicos se ven modificados durante el aprendizaje asociado a drogas y diversos agentes farmacológicos que actúan en los receptores del glutamato influyen en los aprendizajes asociativos clásico e instrumental (Everitt y Wolf, 2002; Kelley et al. 2003). Antagonistas del receptor NMDA empeoran la conducta de presión de palanca para la administración de cocaína así como la preferencia de lugar en respuesta a cocaína, morfina y metanfetamina (Jackson et al. 2000). Además, los antagonistas NMDA bloquean el desarrollo de la sensibilización inducida por cocaína, anfetamina y morfina.

La plasticidad sináptica, por sus propiedades temporales, parece una buena candidata como mediadora de las adaptaciones neurales rápidas y persistentes en el circuito de la recompensa.

1.5.4 El papel del glutamato en la captación y metabolismo celulares de la glucosa

La técnica de la 2-desoxi-D-glucosa (2-DG) marcada radiactivamente ha sido utilizada con cultivos homogenados de astrocitos y neuronas. Para que estos estudios puedan ser comparados con estudios *in vivo* han de ser llevados a cabo en un medio cuya concentración de glucosa sea similar a la medida en el espacio extracelular cerebral *in vivo* variando los valores medios de 0,5 a 2,0 mM (Silver y Erecińska, 1994; Fellows et al, 1992). Por otra parte, la tasa basal de gasto de glucosa es más alta en astrocitos que en neuronas con unos valores alrededor de 20 y 6 nmol por miligramo de proteína por minuto respectivamente (Magistretti y Pellerin, 1996). Estos valores son similares a los determinados *in vivo* en la sustancia gris cortical (10-20 nmol mg⁻¹ min⁻¹) con la técnica de la autorradiografía (Sokoloff et al, 1977). En vista de esta diferencia y de la preponderancia cuantitativa de los astrocitos en comparación con las neuronas en la sustancia gris estos datos revelan una muy significativa contribución de los astrocitos en el gasto basal de glucosa determinado tanto con la técnica autorradiográfica con 2-DG como con la TEP *in vivo*.

De mayor importancia incluso es la contribución de los astrocitos en el gasto de glucosa durante los procesos de activación. La activación puede ser simulada, *in vitro*, exponiendo las células a glutamato, el principal neurotransmisor activador del sistema nervioso, gracias a que durante la activación de un área cortical se produce un aumento en la concentración de glutamato extracelular debido a su liberación de los terminales axónicos de las vías activadas (Fonnum, 1984). El glutamato estimula la captación de 2-DG y la fosforilación en los astrocitos de manera dependiente de la concentración (Pellerin y Magistretti, 1994; Takahashi et al, 1995). A diferencia de otras acciones del glutamato, la estimulación de la utilización de glucosa en los astrocitos está mediada por transportadores de glutamato y no por receptores específicos (Pellerin y Magistretti, 1994; Takahashi et al, 1995). De hecho, una de las funciones bien asentada en la

literatura de los astrocitos es asegurar la recaptación de ciertos neurotransmisores y, en particular, la recaptación de glutamato en las sinapsis excitatorias (Kimelberg, 1993). Se han clonado al menos tres subtipos de transportadores de glutamato en varias especies incluida la humana: los subtipos GLT-1, EAAC1 y GLAST. La densidad de los transportadores GLT-1 y GLAST es particularmente elevada en los astrocitos que rodean terminales nerviosas y espinas dendríticas de manera consistente con el papel preponderante de estos transportadores en la recaptación del glutamato liberado en las sinapsis (Rothstein et al, 1994; Chaudhry et al, 1995).

1.5.5 La captación de glucosa inducida por glutamato y la TEP *in vivo*.

La captación de glucosa por parte de los astrocitos inducida por el glutamato constituye una importante fuente de información para la comprensión de las bases celulares de los aumentos en la metabolización de la glucosa mediados por activación que pueden ser observados mediante la técnica de la TEP utilizando como radiotrazador la FDG. La activación fisiológica de áreas concretas del cerebro se ve acompañada de aumentos en el uso de glucosa debidos al glutamato liberado en las sinapsis excitatorias lo que nos proporciona un mecanismo directo que liga la actividad neuronal con el uso de glucosa en el cerebro. El mecanismo molecular intracelular de este proceso requiere del papel de las bombas de sodio-potasio (Pellerin y Magistretti, 1994) que, en los astrocitos, responden principalmente a los aumentos intracelulares de Na⁺ para el que muestra una K_m de unos 10 mM (Kimelberg et al, 1978; Erecińska, 1989). En los astrocitos las concentraciones de Na⁺ varían entre 10 y 20 mM de manera que las bombas de sodio-potasio son activadas rápidamente cuando el Na⁺ aumenta de forma concomitante con la captación de glutamato (Bowman y Kimelberg, 1984). En este contexto podríamos afirmar que, *in vivo*, el principal mecanismo responsable de la captación de FDG inducida por activación fisiológica podría ser la actividad de la bomba sodio-potasio.

Por último cabe decir que las señales detectadas durante la activación fisiológica tanto con la técnica de la autorradiografía como con la de la TEP basadas en el uso de 2-DG podrían reflejar principalmente la captación del trazador por parte de los astrocitos. Esta conclusión no invalida estas técnicas sino que proporciona una base molecular y celular para las mismas.

1.6 Metabolismo cerebral de la glucosa.

Diversas drogas de abuso, como la cocaína o los opiáceos, alteran el metabolismo cerebral de la glucosa. Por ello las páginas que siguen están dedicadas a estudiar este parámetro cerebral y su relación con la actividad neural.

1.6.1 Glucosa y cuerpos cetónicos como sustratos energéticos.

El cerebro es uno de los órganos más activos metabólicamente del todo el cuerpo humano. Consume aproximadamente un 20% del total del oxígeno utilizado por todo el organismo aunque su peso representa tan solo el 2% del total. De igual manera, también consume aproximadamente el 25% de la glucosa utilizada por todo el organismo. Aparte de algunas excepciones, la glucosa es el único sustrato energético utilizado por el cerebro (Edvinsson et al 2002). En cualquier tejido la glucosa puede seguir varias vías metabólicas; en el cerebro, casi toda es oxidada dando como productos CO₂ y H₂O. Ello es llevado a cabo través de una secuencia de procesos: la glucólisis, el ciclo de los ácidos tricarboxílicos y la fosforilación oxidativa.

En circunstancias particulares otros sustratos distintos de la glucosa pueden ser utilizados por el cerebro. Por ejemplo, los neonatos que se alimentan de leche materna tienen la capacidad de utilizar los cuerpos cetónicos ácido acetoacético (AcAc) y ácido betahidroxibutírico (3-HB), además de glucosa, como sustratos energéticos cerebrales (Girard et al, 1992) debido a los altos niveles de lípidos presentes en la leche materna (Smith y Abraham, 1975). Hay que tener en cuenta que durante este periodo se está llevando a cabo el proceso de mielinización (Cuzner y Davison, 1968).

1.6.2 Actividad neuronal, flujo sanguíneo y metabolismo energético.

Un aspecto destacado del cerebro es su gran nivel de especialización estructural y funcional. Debido a que los sustratos energéticos son provistos a través del flujo sanguíneo, este sufre aumentos en las áreas específicas que son activadas según la modalidad específica que se trate. Por ejemplo, Charles Sherrington hace más de un siglo observó en animales experimentales aumentos del flujo sanguíneo en la corteza parietal en respuesta a estímulos sensoriales y con gran acierto propuso que en el curso

de la activación neuronal ciertos “productos químicos del metabolismo cerebral” podrían ser el mecanismo mediante el cual podríamos asociar la actividad cerebral con el aumento del flujo sanguíneo (Roy y Sherrington, 1890). Hoy día sabemos que el óxido nítrico (NO) es probablemente uno de estos mediadores pero no el único y aunque existen diversos candidatos como el K⁺, la adenosina, el lactato, la noradrenalina o la serotonina este asunto está aún por resolver. Lo que sí sabemos es que mediante este aumento de flujo sanguíneo se suministran cantidades extra de oxígeno y glucosa a las zonas cerebrales que demandan energía adicional.

Mediante las modernas técnicas de neuroimagen funcional es posible monitorizar *in vivo* el flujo sanguíneo y los dos índices del metabolismo energético: los consumos de glucosa y oxígeno. Por ejemplo, mediante el uso de la TEP y la utilización de isótopos adecuados como el 18F o el 15O es posible estudiar tanto los niveles basales como los cambios inducidos por actividad en parámetros como el flujo sanguíneo local o el consumo de oxígeno. (Frackowiak et al 1980; Raichle et al 1983). También es posible determinar localmente los niveles de consumo de glucosa, LCMRglu (del inglés *local cerebral metabolic rates for glucose*) utilizando 2-desoxyglucosa marcada con 18F (2-DG). El pionero de esta técnica fue Louis Sokoloff y sus inicios se restringieron al estudio de animales de laboratorio (Sokoloff et al 1977 y 1989). Dicho método se basa en el hecho de que la 2-DG atraviesa la barrera hematoencefálica, es captada por las células cerebrales y es fosforilada por la hexocinasa de modo similar a la glucosa. Sin embargo, al contrario que la glucosa-6-fosfato, la 2-desoxiglucosa-6-fosfato no puede ser metabolizada y se acumula en las células.

En los estudios con animales de laboratorio se inyectan por vía intravenosa pequeñas cantidades (traza) de 2-DG radiactiva; los animales son sometidos a las tareas experimentales objeto de estudio y sacrificados al final del experimento para llevar a cabo estudios de autorradiografía.

El principio de que los tres parámetros metabólicos están estrechamente ligados implicaba que si, por ejemplo, se produce un aumento del flujo sanguíneo cerebral durante un proceso de activación fisiológica paralelamente aumentarán los parámetros LCMRglu y LCMRO₂. Sin embargo en la segunda mitad de la década de los ochenta del pasado siglo se encontró que durante la activación de la corteza visual tenía lugar un

desligamiento (*uncoupling*) de estos marcadores de manera que pudo observarse que mientras que se producía un aumento de aproximadamente el 30-40% tanto en el flujo sanguíneo cerebral (CBF) como en el LCMRglu, no sucedía en la misma medida en la tasa metabólica cerebral local de oxígeno (LCMRO₂) ya que el aumento en este indicador era tan solo del 6% (Fox y Raichle 1986; Fox et al 1988). Posteriormente este hecho se ha confirmado en distintas áreas corticales aunque su magnitud varía dependiendo de la modalidad sensorial estudiada (Roland et al, 1987). Parece claro que durante la activación la glucosa extra aportada por la sangre es procesada mediante el proceso de glucólisis más que por el ciclo de los ácidos tricarbónicos y la fosforilación oxidativa y que aunque en estado basal los tres indicadores del metabolismo energético están ligados no sucede lo mismo durante periodos de activación.

1.6.3 Diferencias entre el metabolismo cerebral *in vivo* e *in vitro*.

Aparte de las diferencias habituales entre los estudios *in vivo* e *in vitro* que se pueden observar en cualquier tejido del organismo existen dos peculiaridades que únicamente afectan al SNC. La primera de ellas es que al contrario que las células de otros tejidos, las células nerviosas no funcionan de forma autónoma sino que generalmente forman parte de una compleja red neural de manera que su actividad funcional está integrada con la de otras áreas del sistema nervioso. Además, el metabolismo de las neuronas se encuentra estrechamente ligado al de las células gliales adyacentes. De este modo, cualquier procedimiento que rompa esta integridad funcional y estructural puede alterar cuantitativamente y, quizá cualitativamente, el funcionamiento metabólico normal. En segundo lugar la barrera hematoencefálica limita selectivamente las proporciones de sustancias solubles que pueden atravesarla discriminando entre varios sustratos potenciales para el metabolismo cerebral. Las técnicas *in vitro* únicamente establecen la existencia y la capacidad potencial de los sistemas enzimáticos necesarios para el uso de un sustrato dado pero no determinan hasta qué punto dicha vía metabólica realmente tiene lugar *in vivo*.

1.6.4 Contribución de las células gliales y endoteliales vasculares al metabolismo cerebral.

Existen otros tipos celulares en el sistema nervioso (glía y células endoteliales vasculares) que no solo consumen energía sino que contribuyen activamente en el flujo de sustratos energéticos a las neuronas.

Las células gliales constituyen aproximadamente la mitad del volumen cerebral total (Kimelberg y Norenberg, 1989; O'Kusky y Colonnier, 1982) y, debido a su menor tamaño en comparación con las neuronas, la proporción numérica entre astrocitos y neuronas puede ser tan alta como 10:1 dependiendo de la región, la etapa de desarrollo o la especie estudiada. De hecho, la razón astrocitos-neuronas aumenta en la escala filogenética a medida que aumenta el tamaño cerebral por lo que es alta en los seres humanos (Tower y Young, 1973). Parece claro, pues, que la glucosa que alcanza el parénquima cerebral provee de sustratos energéticos a diversas clases de células siendo solo unas de ellas las neuronas.

Por otra parte, las relaciones citológicas existentes entre los capilares cerebrales, los astrocitos y las neuronas resultan sumamente ilustrativas para la comprensión del papel central de los astrocitos en la provisión de sustratos energéticos a las neuronas. Los astrocitos rodean los capilares por medio de unos procesos especializados llamados pies terminales (Peters et al, 1991). Así, los astrocitos forman la primera barrera celular que encuentra la glucosa al entrar en el parénquima cerebral lo que hace de estas células buenas candidatas como captadoras y distribuidoras de sustratos energéticos. Efectivamente, ya hace más de un siglo que Camilo Golgi y Luigi Sala bosquejaron este principio. Además de rodear los capilares, los astrocitos están en contacto con los contactos sinápticos neuronales (Peters et al, 1991) y también expresan receptores y transportadores con los que los neurotransmisores liberados pueden interactuar (Barres, 1991). Estas características dotan a los astrocitos de una exquisita sensibilidad para detectar aumentos en la actividad sináptica. En resumen, debido a sus características estructurales y funcionales los astrocitos pueden perfectamente responder a cambios locales en la actividad neuronal con adaptaciones coordinadas en el metabolismo energético.

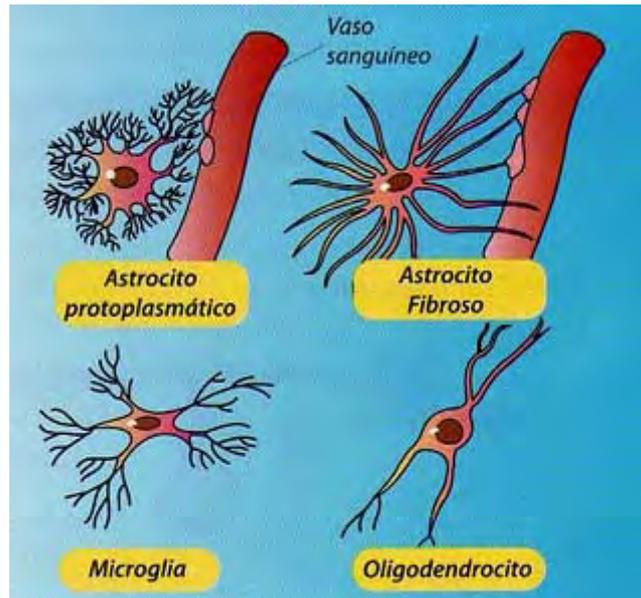


Figura 1-8 Astrocitos en contacto con vasos sanguíneos.

1.6.5 Transportadores de glucosa en el cerebro.

La glucosa es una molécula muy hidrofílica que entra en las células gracias a unos transportadores específicos. Hasta ahora han sido identificados seis genes que codifican estas proteínas además de un pseudogen. Los transportadores de glucosa en el cerebro comprenden desde el GLUT1 hasta el GLUT7. Existen en el cerebro dos formas del GLUT1 con masas moleculares de 55 y 45 kDa respectivamente (Birnbaum et al, 1986). El GLUT1 de 55 kDa se localiza principalmente en pequeños vasos sanguíneos cerebrales, plexo coroideo y células del epéndimo. También se ha encontrado este transportador en posición intracelular en células endoteliales vasculares. La forma de 45 kDa del GLUT1 se encuentra predominantemente en astrocitos en el cerebro *in situ* (Morgello et al, 1995) aunque en condiciones de cultivo celular todas las células neurales, incluyendo a las neuronas y a otros tipos de células gliales, expresan el transportador GLUT1. Este fenómeno parece deberse al hecho de que el estrés celular induce la expresión de dichos transportadores (Maher et al, 1994).

El GLUT3 es el transportador de glucosa específico de las neuronas (Bondy et al, 1992) y parece estar distribuido principalmente en los cuerpos celulares más que en los axones mientras que el GLUT5 se localiza en las células microgliales. La microglía juega un importante papel en las respuestas inflamatoria e inmune en el sistema nervioso (Maher et al, 1994).

Otro transportador de glucosa es el GLUT2 que ha sido localizado selectivamente en astrocitos de ciertas áreas cerebrales como, por ejemplo, en núcleos hipotalámicos y del tronco del encéfalo que participan en la regulación de la ingesta así como en el control central de la liberación de insulina (Leloup et al, 1994).

Es claro que la captación de glucosa que se lleva a cabo en el parénquima cerebral es un proceso altamente regulado por diversos tipos de transportadores. Dicho proceso podría resumirse del siguiente modo: la glucosa entra en el cerebro mediante los transportadores GLUT1 de 55 kDa localizados en las células endoteliales de la barrera hematoencefálica. La captación por parte de los astrocitos tiene lugar a través de los GLUT1 de 45 kDa mientras que los GLUT3 llevan a cabo esta función en las neuronas. Los transportadores GLUT2 situados en los astrocitos pueden “percibir” la presencia de glucosa. Dicha función es llevada a cabo por este subtipo de transportadores de glucosa en las células β pancreáticas.

PLANTEAMIENTO DE LA
INVESTIGACIÓN

2 PLANTEAMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN

La presente investigación es continuación de la línea de trabajo que lleva nuestro grupo para tratar de conocer si se producen cambios neuroadaptativos tras la conducta de autoadministración de morfina y la extinción de esta conducta durante diferentes períodos de tiempo en animales LEW y F344. Concretamente, habíamos analizado la modulación diferencial entre ambas razas en los niveles de receptores μ -opioides, en la funcionalidad de estos receptores y en los niveles de expresión génica de la PENK (Sánchez-Cardoso et al., 2007) después de esas conductas, así como en los niveles de receptores D1 y D2 dopaminérgicos (Sánchez-Cardoso et al, 2009). En otro trabajo previo, además, habíamos estudiado los niveles basales de los receptores NMDA en esas dos cepas (Martín et al. 2003), pero desconocíamos si estos receptores podrían también modularse después de la adquisición y extinción de la conducta de autoadministración de morfina y, por ello, uno de los objetivos principales de la presente investigación ha sido el estudio de esa posible modulación. Dado que, por otra parte, el glutamato participa en gran parte de la activación neuronal del SNC y que ese neurotransmisor estimula la captación de glucosa en las células nerviosas, también hemos querido estudiar si el metabolismo cerebral de la glucosa pudiera cambiar después de la autoadministración de morfina en ambas razas. Finalmente, continuando con nuestro interés en estudiar cambios en el sistema opioide de los animales LEW y F344 por su distinta susceptibilidad ante los efectos reforzantes de los opiáceos, nos pareció necesario estudiar también si los nuevos péptidos opioides endomorfinas 1 y endomorfinas 2 podrían participar en las acciones reforzantes positivas de los opiáceos y si la unión a sus receptores también cambiaba tras la conducta de autoadministración de morfina y su extinción, tal y como parecía que ocurría con los receptores μ -opioides.

MATERIAL Y MÉTODOS

3 MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 Sujetos

Se utilizaron ratas macho de las razas LEW y F344 (Harlan Ibérica) que pesaban entre 300-350 gramos al principio del experimento. Ninguno de los animales había sido expuesto previamente a ninguna situación experimental ni a otras drogas. Los animales se alojaron en las condiciones habituales del laboratorio, esto es, con humedad y temperatura controladas, ciclo luz-oscuridad (luz 08:00-20:00) y libre acceso a comida y bebida. Las instalaciones donde se mantuvieron los animales cumplen las Normas de la Unión Europea sobre Mantenimiento de Animales de Laboratorio.

3.2 La autoadministración intravenosa de drogas

Empleamos 12 cajas de condicionamiento operante (Coulbourn Instruments; EE.UU) para los estudios de autoadministración de morfina. En cada caja había dos palancas situadas a ambos lados de una de las paredes de la caja y separadas entre sí por 14 cm. Las palancas están diseñadas para registrar cada respuesta que se produzca cuando se apliquen al menos 3 gramos de fuerza sobre ellas. La dispensación de la morfina (Dirección General de Farmacia, Subdirección General de Estupefacientes; Ministerio de Sanidad y Consumo; Madrid, España.) y su vehículo (suero salino), se realizó gracias a una bomba automática (Harvard Instruments; EEUU) que operaba fuera de la caja del animal. El registro de los datos y el control de las cajas y de la bomba se realizó mediante un ordenador compatible con IBM y una interfaz (Med Associates; EE.UU).



Figura 3-1 Caja de Skinner preparada para la autoadministración de drogas.

3.2.1.1 Técnica quirúrgica

El primer paso a realizar es la inducción anestésica por medio de la administración de Ketamina (40 mg/kg) y Diazepam (10 mg/kg) por vía intraperitoneal. Unos 10-15 minutos después de la anestesia con ketamina se procede a la administración de diazepam. Una vez anestesiado el animal, se abre un pequeño ojal en la piel hasta llegar al paquete vascular desde donde se aísla la vena yugular. Después se hace una incisión en esa vena y se inserta el catéter (Dural Plastics & Engineering; Auburn, Australia) de forma que llegue hasta la aurícula derecha del animal. Una vez insertado el catéter, éste se fija a la propia vena yugular y a los músculos pectoral y maxilofacial evitando así que varíe su localización. Insertado el catéter en la vena y fijado, se dispone bajo la piel de manera que salga hacia la región escapular media del animal, imposibilitando así que éste pueda llegar a él y manipularlo. Por último, se sutura la zona y se comprueba que la posición del catéter es la correcta y que no existe pérdida o bloqueo de flujo a través del mismo infundiendo con suero salino. Más adelante, se coloca un conector de plástico en el cráneo del animal anclándolo con varios tornillos y fijándolo mediante cemento dental para poder mantener al animal en la caja de condicionamiento operante y llevar a cabo el procedimiento de autoadministración. La

conexión del animal a la caja se realiza a través de un muelle hueco (Alice King Chatman; EEUU) por donde transcurre el catéter, que se une al conector de plástico colocado en el cráneo del animal y a un pivote girador situado en la parte superior de la caja, que permite la total libertad de movimientos del animal durante el tiempo que se encuentre en su interior. A este pivote girador que sale por la parte externa de la caja se une el catéter que llega desde la jeringuilla, donde se encuentra la sustancia a administrar. Posteriormente, se infunden los animales diariamente con suero fisiológico que contiene en disolución 1mg/ml de antibiótico (Gentamicina) y 100 U.I./ml de Heparina 5%, para prevenir infecciones y la formación de coágulos sanguíneos.

3.2.2 Consideraciones teóricas sobre la autoadministración de drogas

Antes de detallar el procedimiento de autoadministración intravenosa de drogas, procederemos a hacer una breve introducción teórica sobre esta metodología.

Los primeros estudios experimentales que sugirieron una posible función de las drogas como reforzadores en animales fueron llevados a cabo por Nichols *et al.* (1956). Posteriormente, en 1962, James Weeks estableció la metodología de la autoadministración intravenosa de drogas, tal y como la conocemos hoy en día. La aportación de J. Weeks fue muy importante, ya que permitió el establecimiento de procedimientos de condicionamiento operante que demostraban que las drogas actuaban como reforzadores positivos. Este autor fue el primero que implantó catéteres de forma permanente en la vena yugular de ratas de laboratorio, conectándolas a una caja de condicionamiento operante y a una bomba que dispensaba inyecciones de morfina automáticamente. Weeks comprobó que los sujetos se autoinyectaban cantidades importantes de morfina. Esta técnica superó los problemas debidos al sabor de las disoluciones de fármacos y al retraso en el refuerzo propios de la vía oral de autoadministración empleada por otros autores, permitiendo el empleo de respuestas operantes diariamente definidas y de programas de reforzamiento. Más adelante, Thompson y Schuster, en 1964, aplicaron este procedimiento con morfina en monos, obteniendo resultados parecidos. Cuatro años más tarde, Pickens y Thompson (1968) comprobaron que las ratas de laboratorio se autoadministraban anfetamina y cocaína con patrones de comportamiento que demostraban el poderoso control que estas drogas ejercen sobre la conducta, de acuerdo con los principios del condicionamiento clásico e

instrumental. La obtención de resultados semejantes en otros laboratorios hizo que la autoadministración intravenosa de drogas se consolidara como una metodología ampliamente empleada en diversas especies animales para estudiar los efectos reforzantes de las drogas.

Habitualmente, las sesiones de autoadministración están limitadas en su duración. En general, cuando los animales inician la sesión se autoadministran varias inyecciones en los primeros minutos para, posteriormente, ir espaciando en el tiempo de forma regular la ingesta de droga.

Parece admitido que la variable más importante para regular la autoadministración de drogas es la dosis. A partir de unos niveles mínimos, las dosis pequeñas producirán un nivel mayor de inyecciones. Después de cada inyección, hay una pausa post-refuerzo que se encuentra directamente relacionada con la dosis. Si la dosis se incrementa, la pausa se alarga con el resultado de un número inferior de inyecciones durante la sesión de autoadministración. Algunos investigadores han sugerido que la pausa post-refuerzo puede deberse a una alteración comportamental generalizada que deja al animal sin capacidad de respuesta por un tiempo. Obviamente, los efectos aversivos de las drogas limitan la tasa de autoadministración y en función de ello se podría predecir la dosis de droga máxima en la autoadministración (Yokel y Pickens, 1974).

3.2.3 Procedimiento experimental

Antes de la implantación del catéter, se entrenó a los animales para que aprendieran a apretar la palanca con bolitas de comida (Noyes Pellets; Reino Unido) como refuerzo, bajo un programa de reforzamiento de Razón Fija 1 (RF1), en el que la presión de la palanca de la izquierda una sola vez se tradujo en la obtención de una bolita de comida (45 mg) y el encendido de un diodo por encima de la palanca. Cuando la conducta operante con comida se mantuvo durante varios días se procedió a la implantación del catéter según el procedimiento quirúrgico mencionado anteriormente.

Tras un período de recuperación postoperatoria se comenzó con la autoadministración intravenosa de sulfato de morfina a una dosis de 1mg/kg. El programa de reforzamiento elegido fue el de razón progresiva (RP) en el que el animal

cada vez tiene que emitir más respuestas para conseguir el reforzador. Así, la serie de presiones de palanca requeridas para obtener los reforzadores es 2,3,5,7,9,12,15.....90....etc, hasta que el animal deja de responder, momento denominado “Punto de Ruptura” (*Breaking point*), que es el valor ordinal de respuesta en el que el animal deja de responder durante un período de 60 minutos y no consigue el reforzador. Cuando el animal satisfacía los requerimientos de respuesta, se encendía un diodo que señalaba la administración de la droga y seguidamente el animal recibía una inyección de sulfato de morfina a una dosis de 1mg/kg. El acceso de los sujetos a la droga se producía en sesiones de doce horas de duración durante el ciclo nocturno y nunca recibían una inyección cebadora (*priming injection*). Se sometió a los animales a la adquisición de la conducta de autoadministración de morfina durante 15 días, tras los cuales se substituyó la droga por suero salino para provocar la extinción de esta conducta. Tras pasar por las condiciones experimentales correspondientes a cada grupo (ver la sección Diseño Experimental), se sacrificó a los animales por decapitación, se extrajeron sus cerebros y acto seguido se procedió a su congelación mediante inmersión en isopentano enfriado con hielo seco, hasta el comienzo de los experimentos de autorradiografía.

3.2.4 Diseño experimental para el estudio de los receptores NMDA

Se utilizaron 6 grupos de animales, 3 de la raza LEW y 3 de la raza F344. En cada una de las razas se establecieron los siguientes grupos: los animales del grupo T=0 fueron sometidos a 15 días de autoadministración de morfina y fueron sacrificados justo después de la última sesión de autoadministración; los animales de los grupos T=7 y T=15 se sometieron igualmente a autoadministración de morfina y fueron sacrificados a los siete y quince días de extinción, respectivamente, después de haber substituido durante este periodo la morfina por suero salino.

3.2.5 Técnica de autorradiografía cuantitativa de receptores

La técnica de autorradiografía permite obtener la distribución espacial de los radioisótopos incorporados a la proteína de interés mediante la exposición de la muestra a emulsiones fotográficas sensibles a la radiación. Esto permite visualizar, localizar y cuantificar la proteína mediante procedimientos de análisis de imágenes. Las proteínas

estudiadas con esta técnica suelen ser enzimas, receptores y lugares de recaptación de neurotransmisores, permitiendo localizar el lugar de acción de ligandos tales como neurotransmisores, hormonas y fármacos.

La utilización de esta técnica “*in vitro*” ofrece múltiples ventajas ya que, aunque es relativamente costosa, ofrece un alto grado de fiabilidad, es fácilmente reproducible y tiene un grado de resolución espacial de micrómetros, lo que proporciona un gran detalle anatómico de la zona a estudiar.

La técnica de autorradiografía es cuantificable, lo que significa obtener medidas absolutas (nCi y/o fmoles/mg de tejido) que facilitan la comparación entre diferentes estudios. Estas ventajas han desplazado a otras técnicas alternativas de fijación basadas en preparados homogeneizados de receptores marcados radiactivamente.

3.2.6 Técnica de autorradiografía cuantitativa de los receptores NMDA

En primer lugar, se procedió a obtener cortes coronales seriados de los encéfalos procedentes de los diferentes grupos experimentales de ambas razas mediante un criostato. En nuestro caso, para cortar los cerebros en el criostato, se montaron convenientemente protegidos en una nuez de criostato con Tissue-Tek[®], un material que se solidifica al enfriarse. Se obtuvieron dos secciones por porta de la región seleccionada. Estos portas se almacenaron a -35°C hasta el día del marcaje con el ligando radiactivo [³H]-MK801. Se siguió un protocolo similar al empleado por Sakurai et al. (1991). De forma resumida, los portas con las secciones cerebrales se prelavaron durante 30 minutos en tampón 50 mM Tris-acetato. Posteriormente, esos mismos portas se incubaron en 50 mM de buffer Tris-acetato (pH 7,4) durante 120 minutos, a temperatura ambiente. El tampón contenía 5 nM de [³H]-MK-801. La unión no específica se determinó en presencia de 100 μM de MK-801 no marcado radiactivamente. Tras la incubación, las secciones se lavaron en 50 mM de tampón Tris-acetato (pH 7,4) a 4°C durante 80 minutos en 250 ml de tampón frío. A continuación se lavaron en agua destilada y, por último, se procedió al secado de los portas con aire seco y frío. Los portas se dejaron con desecante (Drierita; Sigma, España) durante toda la noche y, al día siguiente, se expusieron a películas sensibles al tritio (³H-Hyperfilm;

Amersham, España). Después de transcurridas 8 semanas de exposición, las películas autorradiográficas se revelaron con líquido revelador Kodak-D19 y, posteriormente, se analizaron los autorradiogramas como se indica a continuación.

3.2.7 Técnica de autorradiografía cuantitativa de los receptores endomorfin-1 y endomorfin-2

Tras sacrificar a los animales se extrajeron sus cerebros y fueron sumergidos en isopentano previamente enfriado con hielo seco después de lo cual se almacenaron a -35 °C. Posteriormente se obtuvieron cortes coronales de los encéfalos de un grosor de 20 micras mediante un criostato. Dichos cortes fueron convenientemente montados en portas y almacenados a -35 °C hasta el día del marcaje con ligandos radiactivos.

Como se ha citado más arriba se ha sugerido que las endomorfinas podrían ser los ligandos endógenos para los receptores μ -opioides. Por ello decidimos emplear en primer lugar un protocolo similar al utilizado para medir dichos receptores con un ligando específico como es el DAMGO (Mansour et al., 1987) aunque con pequeñas modificaciones. Resumidamente, los portas con las secciones cerebrales se preincubaron durante 6 minutos en tampón 100 mM Tris-acetato a 25 °C (pH 7,4). Posteriormente se incubaron en tampón 50 nM también a 25 °C y con el mismo pH con [³H]-Endomorfin 1, y [³H]-Endomorfin 2 durante 60 minutos utilizando uno u otro en dos experimentos diferentes. Ambos radioligandos fueron preparados por Géza Tóth del Instituto de Bioquímica del Centro de Investigaciones Biológicas de la Academia de Ciencias de Hungría. Estas incubaciones con las endomorfinas tritiadas se llevaron a cabo en presencia o ausencia del mismo ligando “frío” (sin radiactividad) con una concentración de 10 μ M para determinar de este modo la unión total y la unión no específica de los radioligandos. Transcurrido el tiempo de incubación los portas se lavaron dos veces durante 6 minutos cada vez en tampón Tris frío y luego se enjuagaron otras dos veces en agua destilada. Después se secaron con aire seco enfriado con hielo seco y se almacenaron en cajas adecuadas en presencia de gel de sílice durante 24 horas. Transcurrido este periodo de secado, los portas se expusieron a películas Biomax (Kodak, España) durante 12 semanas y se revelaron con líquido revelador Kodak D-19

3.2.8 Análisis cuantitativo de los autorradiogramas

Una vez obtenidos los autorradiogramas, se cuantificaron mediante un analizador de imágenes computerizado Scion Image (NIH, EE.UU). Para proceder a la digitalización con una cámara, los autorradiogramas fueron situados en un dispositivo que los iluminaba desde abajo. Todas las imágenes capturadas de una misma película fueron corregidas mediante una rutina de código que igualaba la iluminación (contraste y brillo) de la imagen autorradiográfica a un fondo blanco homogéneamente iluminado.

Las imágenes fueron digitalizadas mediante un convertidor analógico-digital con salida de imágenes codificadas en 8 bits, lo que da como resultado imágenes de $2^8=256$ (0-255) tonalidades de gris. La rutina de captación digital de la cámara asegura que cada píxel tenga igual tamaño horizontal y vertical minimizando, de esta manera, la distorsión geométrica y fotográfica a menos del 0.5 sobre la imagen de entrada analógica.

De esta forma, cada píxel (correspondiente a un área de $20 \times 20 \mu\text{m}$) fue convertido en valores de tonalidad de gris de 0 a 255 que representan la transmisión de la luz a través del autorradiograma. Estos valores de gris fueron, a su vez, convertidos en densidad óptica calibrada (OD) mediante la transformación de la escala de gris a la inversa del logaritmo decimal, de forma que $OD=1/\log \text{gris}$. Esta transformación lineal ayuda a corregir la falta de linealidad en los extremos, esto es, para valores de gris muy oscuros o muy claros.

Para traducir los valores de OD de los autorradiogramas a valores de radiactividad (nCi/mg) se emplearon unos patrones radiactivos compuestos de pasta de polímero conteniendo [^3H]-ornitonina. La escala de grises de los patrones fue transformada a OD y ésta, convertida a su vez, a valores de radiactividad por unidad de área del patrón.

Los valores de radiactividad vienen especificados en el catálogo del producto (Amersham, España). Estos valores obtenidos fueron transformados automáticamente por el programa a una escala de logaritmo neperiano (ln), dando como resultado ln OD vs. ln valores de radiactividad.

La calibración mediante logaritmos neperianos en los dos ejes ayuda a corregir la falta de linealidad en los extremos de la escala del patrón, es decir, para valores muy claros y muy oscuros de gris o lo que es lo mismo, para concentraciones muy altas o muy bajas del radioligando. Los valores así obtenidos pueden expresarse en nCi/mg de tejido o traducirse a concentraciones de fmol/mg de tejido.

Para la identificación y discriminación de las estructuras cerebrales de interés se utilizaron imágenes con diferentes niveles de umbral. La identificación, por otra parte, también viene facilitada por el isótopo utilizado, que al ser ^3H , proporciona una gran resolución anatómica. Con este procedimiento se determinan las diferentes regiones y son medidas utilizando la calibración antes descrita. De este valor se resta el correspondiente de la imagen autorradiográfica que representa la unión no específica, obteniendo con ello el valor molar correspondiente de la unión específica del receptor. Todos estos datos fueron convertidos mediante un programa en Visual-Basic a formato Excel y SPSS para su posterior análisis estadístico.

3.3 Tomografía por emisión de positrones

La tomografía por emisión de positrones, más conocida por sus iniciales en inglés (TEP) es una técnica de imagen médica no invasiva que permite obtener información de múltiples fenómenos biológicos y bioquímicos a nivel molecular. Los radioisótopos utilizados en la TEP son trazadores que emiten un positrón como resultado de su desintegración. Este positrón tiene prácticamente las mismas características que el electrón exceptuando la polaridad de su carga que es positiva. Cuando un positrón y un electrón se encuentran durante un determinado intervalo de tiempo se aniquilan dando como resultado la liberación de dos fotones gamma de igual energía (511 keV) y, en teoría, en la misma dirección pero con sentidos opuestos.

Las técnicas que permiten el estudio de las funciones cerebrales *in vivo* en las que se usan individuos experimentales intactos son de especial valor por diversas razones. En primer lugar las relaciones, en cuanto al metabolismo se refiere, entre el cerebro y las

estructuras que le suministran el aporte sanguíneo son procesos muy regulados y dinámicos. La interrupción del aporte de sustratos metabólicos al cerebro tiene como resultado la rápida alteración tanto en la conducta como en el metabolismo cerebral. En segundo lugar, la barrera hematoencefálica, actuando como un filtro, regula la entrada y la salida de metabolitos y otras sustancias como son algunas fuentes energéticas que podría utilizar el cerebro y a las que, de hecho, la barrera hematoencefálica impide entrar. Por último, existe en las poblaciones neuronales una gran heterogeneidad regional con respecto a qué neurotransmisores específicos actúan como mensajeros así como a sus interconexiones anatómicas. Los métodos bioquímicos *in vitro* que utilizan rodajas de tejido, homogeneizados o fracciones subcelulares son, generalmente, poco satisfactorios para el estudio de enfermedades que resultan de la disrupción de estas relaciones metabólicas. La TEP ha tendido un puente entre las mediciones bioquímicas *in vitro* e *in vivo* de la función cerebral. Es un método no invasivo en el que son introducidos en el flujo sanguíneo ciertos radiotrazadores y, posteriormente, mediante detectores externos al organismo es medida la distribución en el cerebro de dichos radiotrazadores.

Para detectar los rayos gamma emitidos cuando los positrones colisionan con electrones se utilizan múltiples detectores dispuestos en uno o más anillos que rodean la cabeza del sujeto. Cada detector está pareado con otro situado enfrente y ambos están conectados mediante la electrónica del escáner. Cada par de detectores identifica los rayos gamma consecuencia de la aniquilación del positrón a lo largo de la línea espacial que los conecta. Cada imagen transversal de la distribución de la radiactividad se crea a partir de la información (cuentas) derivada de las coincidencias acumuladas de cada anillo. El par de detectores que registra una coincidencia define la línea a lo largo de la cual ha tenido lugar la aniquilación. Posteriormente, para reconstruir la imagen, se utilizan técnicas similares a las utilizadas en tomografía computarizada (TC) para reconstruir la imagen derivada de los rayos X.

3.3.1 Adquisición de las imágenes

Las imágenes TEP fueron obtenidas en dos sesiones diferentes: la primera sesión tuvo lugar tras la fase de autoadministración de morfina y la segunda tras la fase de extinción

de esta conducta. La 2-deoxy-2- ^{18}F fluoro-D-glucosa (FDG: 1.99 ± 0.24 mCi) se inyectó a través del catéter que previamente se había implantado a los animales. Dejamos transcurrir 35 minutos para dar tiempo a que los tejidos captaran la FDG transcurridos los cuales, los animales se anestesiaron con isoflurano (5% en la inducción y 1-1.5% en el mantenimiento en O_2 al 100%). Una vez que los animales estaban convenientemente anestesiados se procedió a la recogida de datos para la formación de la imagen durante 60 minutos en un escáner TEP de animal pequeño (rPET, SUINSA Medical Systems, Madrid) Vaquero et al, 2005).

La resolución transaxial del escáner utilizado es de 1,65 mm mientras que la axial es de 1,9 mm (FWHM, "*Full Width at Half-Maximum*").

3.3.2 Reconstrucción y registro de las imágenes

Las imágenes se reconstruyeron con un algoritmo de retroproyección filtrada 3D (3D-FBP) y utilizando un filtro de Butterworth de orden 12 con una frecuencia de corte al 35% de Nyquist (Abella et al, 2009). Se realizaron las correcciones oportunas de alineamiento, decaimiento, normalización y tiempo muerto. El tamaño de los vóxeles que forman las imágenes reconstruidas es isométrico de 0,81 mm.

El registro de las imágenes es un proceso cuyo objetivo es lograr la concordancia espacial de manera que dado un vóxel concreto, este muestre en todas las imágenes la información de la misma zona del encéfalo. Para llevar a cabo dicho registro se seleccionaron visualmente dos imágenes de referencia utilizando la plataforma MMWKS ("Multimodality Workstation") desarrollada por el Laboratorio de Imagen Médica del Hospital General Universitario Gregorio Marañón (Pascau et al, 2006). Esta plataforma de trabajo permite visualizar, segmentar, cuantificar, registrar y fusionar imágenes de distinta modalidad. Al elegir estas dos imágenes de referencia se evitaron las imágenes con poco contraste, movimiento del animal durante la adquisición o calidad deficiente. Ambas imágenes se registraron mediante 7 marcadores anatómicos seleccionados visualmente. Se utilizó como medida de evaluación de dicho registro el umbral de resolución del escáner empleado (1,65 mm) de modo que si el índice de consistencia es menor de 1,65 se considera el registro correcto y en caso contrario,

erróneo. En este último caso se procedió a realizar el registro de la imagen de modo manual mediante marcadores anatómicos (Arun et al, 1987).

3.3.3 Suavizado, enmascaramiento y normalización de las imágenes

El suavizado de las imágenes consiste en promediar los valores de los vóxeles adyacentes con los objetivos de aumentar la relación señal a ruido de las imágenes y asegurar que los cambios entre sujetos en los resultados del estudio tengan lugar en escalas lo suficientemente grandes como para ser significativas. Las imágenes se suavizaron con SPM (SPM5, versión 1782) utilizando un filtro gaussiano isométrico de 2 mm.

Las imágenes obtenidas por el escáner TEP abarcan más espacio del estrictamente necesario para analizar el encéfalo. Por ello y tras el suavizado, se procedió a enmascarar las imágenes para tener en cuenta únicamente los vóxeles correspondientes al encéfalo de los animales experimentales a la hora de realizar los análisis estadísticos. Para ello se utilizó una máscara del encéfalo obtenida sobre una imagen promedio (*template*) de todas las imágenes del estudio.

Como último paso de este procesado de las imágenes antes de llevar a cabo el estudio estadístico es necesario ajustar la intensidad de las imágenes debido a las variaciones en los niveles medios globales en el metabolismo cerebral tanto entre distintos sujetos como en un mismo sujeto con el paso del tiempo. Para llevar a cabo dicha normalización se multiplicaron los valores de cada vóxel por un factor de manera que en todas las imágenes el valor medio del cerebro fuera el mismo (100%).

3.3.4 Fusión de los resultados con imágenes de resonancia magnética

Como ya se ha comentado anteriormente, la resolución anatómica de las imágenes obtenidas con los escáneres TEP es reducida y por ello y con el objetivo de facilitar la localización de las regiones que resultaron estadísticamente significativas, decidimos fusionar los resultados arrojados por SPM con una imagen de resonancia magnética de una rata Wistar adulta macho de la misma edad que los sujetos utilizados en este estudio.

Para obtener dicha imagen el sujeto fue anestesiado con sevofluorano (inducción al 5% y mantenimiento al 3%) y luego introducido en un escáner Bruker Biospec 70/20 (Ultra Shielded, con un campo magnético principal de 7 teslas). A lo largo de la adquisición de la imagen fueron monitorizadas tanto la temperatura como la respiración del animal. Para la adquisición de la imagen se utilizaron tanto una antena de volumen como una *phased array* especial para cerebro de rata. Tras realizar el ajuste de la uniformidad del campo magnético se adquirió la imagen utilizando una secuencia RARE con un tiempo de repetición de 4062 ms, un tiempo de eco de 33 ms, un ángulo de *flip* de 90° y un factor RARE 8. El campo de visión fue de 3,7 x 3,7 cm y la matriz de 256 x 256. Decidimos que el número de rodajas fuera de 37, con un grosor de 0,8 mm cada una. El tiempo de adquisición fue de 11 minutos.

La falta de uniformidad en la intensidad se corrigió con el algoritmo automático *n3* (Sled et al, 1998) tras lo cual la imagen se registró con los resultados obtenidos previamente.

3.4 Análisis estadístico

3.4.1 Estudio NMDA

Para analizar los datos conductuales se utilizó un ANOVA de medidas repetidas con el factor intrasujeto “Día” y el factor intrasujeto “Cepa”. Con el objetivo de comprobar si los animales extinguían su conducta de autoadministración tras sustituir la morfina por suero salino comparamos las medias de las tres últimas sesiones de la fase de extinción con las tres últimas de la fase de adquisición de la conducta mediante *t-tests*.

Los datos de los estudios autorradiográficos no cumplieron los requisitos necesarios para poder llevar a cabo un ANOVA (i.e. distribución normal de los datos y homocedasticidad de las varianzas) por lo que se llevaron a cabo análisis estadísticos no paramétricos. Se hicieron comparaciones entre los diez grupos experimentales (F344: basal, día0, día 7 y día 15 or LEW: basal, día 0, día 7 y día 15) utilizando para ello es estadístico U de Mann-Whitney. El nivel de significación estadística se fijó en $\alpha = 0.05$.

Los análisis estadísticos fueron llevados a cabo con el paquete estadístico SPSS, versión 12.0.

3.4.2 Estudio de las Endomorfinas

En primer lugar se llevó a cabo un ANOVA mixto con un factor intrasujeto (días de autoadministración) y un factor entre grupos (dosis). Posteriormente realizamos análisis *post hoc* (Tukey b) para comparar entre los distintos grupos. Para estudiar si se daba la conducta de autoadministración de E-2 se llevaron a cabo contrastes “t” de Student entre las medias de los 5 últimos días de la fase de autoadministración y los 5 últimos de la fase de extinción

3.4.3 Estudio de microTEP

Para llevar a cabo los análisis estadísticos se utilizó el programa de libre distribución SPM (“Statistical Parametric Mapping”, <http://www.fil.ion.ucl.ac.uk/spm>) muy utilizado en investigación de neuroimagen funcional. Este programa permite realizar análisis paramétricos basados en vóxel.

La estadística llevada a cabo consistió en un análisis de varianza (ANOVA) de tres factores fijos con medidas repetidas en uno de ellos. Los factores son cepa, con dos niveles (LEW y F344), condición, con dos niveles (salino y morfina) y día, con dos niveles (día 0 y día 15). La matriz de diseño (especificación del modelo general lineal al que se ajustan los valores de cada vóxel y que fue implementada en SPM8 mediante la opción “*Flexible Factorial*”) incluyó también el factor sujeto y las interacciones dos a dos de los tres factores fijos mencionados. Se utilizó la corrección estadística por comparaciones múltiples mediante la opción “*Family-WiseError*” (FWE) con un nivel de significación estadística de 0,001.

RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 Autoadministración de morfina y niveles de unión al receptor glutamatérgico NMDA

A continuación pasamos a presentar los resultados del estudio en el que medimos los niveles del receptor NMDA tanto a nivel basal como después de haber adquirido la conducta de autoadministración de morfina durante 15 días así como después de 7 y 15 días tras el inicio de la fase de extinción de dicha conducta. En primer lugar veremos los resultados conductuales.

4.1.1 Autoadministración de morfina

La Figura 4-1 muestra la adquisición y la extinción de la conducta de autoadministración de morfina en las cepas LEW y F344. El anova de medidas repetidas reveló un efecto significativo estadísticamente tanto en el factor “cepa” ($F_{1,66} = 15,31, p < 0.001$) como en el factor “día” ($F_{14,53} = 4,16, p < 0.001$) en la fase de autoadministración. Los animales de la cepa LEW se autoadministraron un mayor número de inyecciones de morfina por sesión que los animales de la cepa F344 durante esta fase. Por el contrario, durante la fase de extinción no se encontraron diferencias significativas entre ambas cepas. La comparación de las medias entre las últimas tres sesiones de la fase de autoadministración *versus* las tres últimas sesiones de la fase de extinción resultó en diferencias significativas estadísticamente en ambas cepas (F344: $t_{10} = 3.66, p < 0.01$; LEW: $t_{6} = 2.79, p < 0.05$) lo que indica que ambas, LEW y F344 redujeron significativamente su tasa de autoadministración tras 15 días después de sustituir la droga por el suero salino.

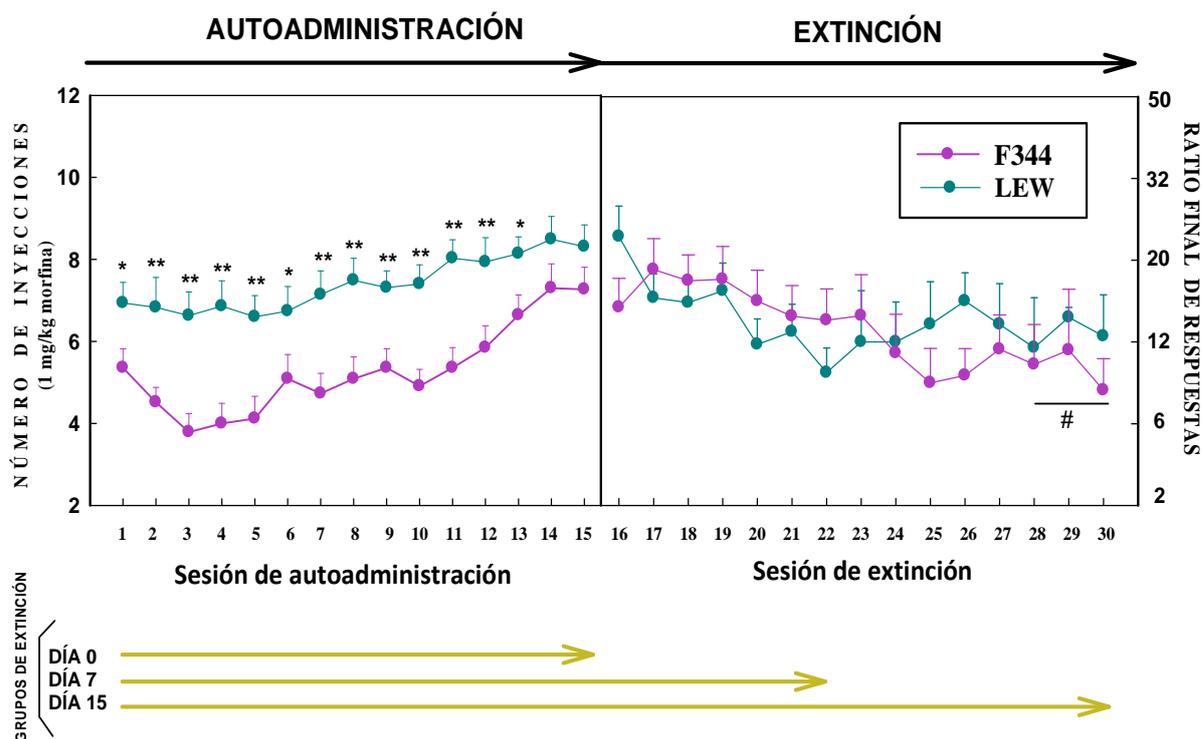


Figura 4-1 Conducta de autoadministración y extinción de la misma. Tasas de respuesta y número de refuerzos (inyecciones de morfina 1 mg/kg)

4.1.2 Niveles de unión del ligando radiactivo [^3H]-MK-801

En el presente trabajo se han estudiado los receptores NMDA glutamatérgicos analizando los niveles basales de unión del ligando radiactivo [^3H]-MK-801, tras la autoadministración de morfina y durante la extinción de esta conducta (a los 7 y 15 días), en el encéfalo de ratas de las cepas LEW y F344. En la figura 4.2. pueden verse autorradiogramas representativos de cada una de las condiciones experimentales en ambas razas. En las Figuras 4.3 a 4.14 se han representado los niveles de unión del ligando a los receptores NMDA en las diferentes regiones cerebrales estudiadas tras la autoadministración de morfina y durante la extinción de esta conducta.

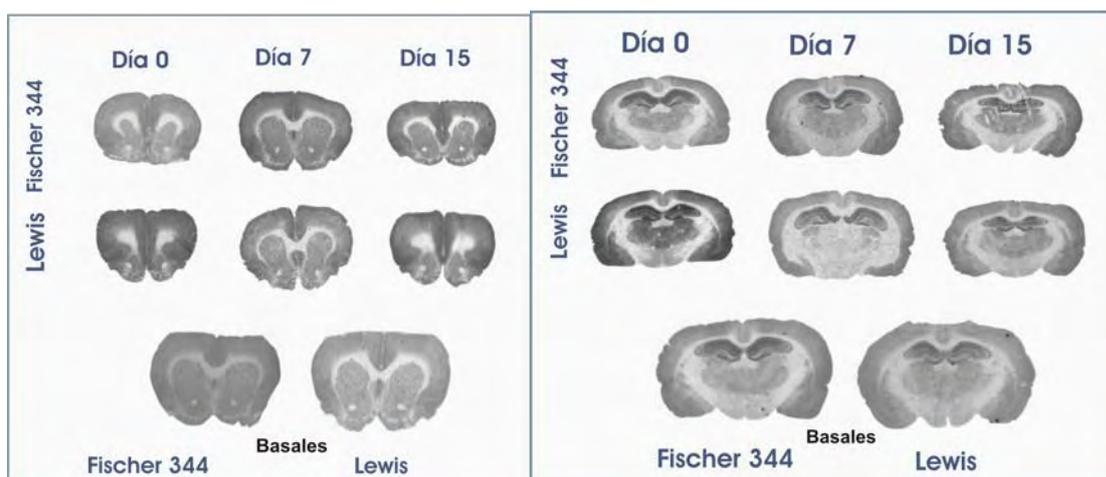


Figura 4-2 Autorradiogramas representativos basales y de cada día de extinción en ambas razas.

En condiciones basales las ratas de la cepa LEW mostraron niveles de unión del ligando utilizado a los receptores NMDA significativamente superiores a los mostrados por los animales F344 en diversas áreas cerebrales ($p < 0.05$). Estas diferencias tuvieron lugar especialmente en el área del ATV (VcX, AuCx, MGNu, RSG, SuG and EntCx).

Tras 15 días de autoadministración de morfina (día 0) podemos observar diferentes patrones en las cepas LEW y F344 según el área estudiada: en el área del NAc los animales LEW no muestran apenas cambios mientras que los animales F344 sufren un incremento en la unión del ligando. Sin embargo en el área del tálamo se observa un aumento de la unión en ambas razas. Por último, en las áreas del ATV y del rafe no se observan cambios.

Existe una tendencia general a la disminución de unión del MK-801 tritiado en los animales de la cepa LEW a lo largo de la fase de extinción. En cambio, en los animales F344 la unión del ligando disminuye el día 7 pero se recupera el día 15.

Más concretamente, tras 15 días de autoadministración de la droga podemos observar que mientras que en las ratas F344 los niveles de unión aumentan en diversas estructuras del encéfalo anterior (M, Par, I, Pir,) y en el resto de estructuras estudiadas se observa una tendencia al alza aunque no significativa, en los animales LEW no se observa cambio alguno. Sin embargo, en la zona del tálamo se observa un aumento en

los niveles de unión del ligando en todas las estructuras estudiadas y en ambas razas. Por último, en las estructuras analizadas en el área del ATV y el Rafe los animales F344 no muestran cambios pero sí lo hacen, al alza, algunas estructuras de los animales LEW (MGNu, EntCx, SuG).

A los 7 después de sustituir la morfina por suero salino puede observarse en ambas razas una disminución de la unión del ligando en prácticamente todas las estructuras analizadas en las zonas del NAc y del tálamo. A la altura del ATV los animales LEW solo varían en RSG, a la baja, mientras que las F344 muestran un descenso en el nivel de los receptores estudiados en todas las regiones exceptuando SuG. Por último, en la zona del Rafe las ratas LEW solo muestran un descenso en el DR mientras que las F344 muestran un incremento en PAG y en SuG.

Transcurridos 15 días tras la sustitución de la morfina se aprecian claramente dos patrones de resultados opuestos en ambas cepas: los animales LEW muestran una clara disminución en la unión del ligando radiactivo tanto en el área del NAc como en el del ATV y en el del Rafe. Por el contrario, los animales F344 muestran un aumento en la unión tanto en el área del NAc como en la del tálamo y en la del ATV en la gran mayoría de las estructuras estudiadas mientras que en el área del Rafe puede observarse una disminución en la unión del ligando.

En cuanto a las diferencias entre ambas cepas, tras finalizar la fase de autoadministración (día 0) se observan diferencias significativas entre las dos cepas en la mayoría de las estructuras estudiadas. Mientras que en las áreas del NAc y el tálamo las ratas de la cepa F344 mayores niveles de unión del ligando, en el ATV y en el Rafe muestran menores niveles.

Transcurridos 7 días desde el inicio de la fase de extinción las dos cepas se igualan no encontrándose diferencias significativas más que en tres estructuras: VcX, MGNu y RSG.

Por último, finalizada la fase de extinción (día 15) se observa que casi en la totalidad de las estructuras estudiadas hay diferencias entre las cepas en cuanto a los niveles de unión del ligando radiactivo.

Niveles de unión del [³H]-MK-801 a los receptores NMDA glutamatérgicos.

	Fischer 344				Lewis			
	Control	Día 0	Día 7	Día 15	Control	Día 0	Día 7	Día 15
AcbC	2.50±0.43	3.17±0.27	2.25±0.15b	2.70±0.14*	1.13±0.08	2.96±0.22	2.13±0.06b	1.63±0.22bc
AcbSh	2.61±0.47	3.42±0.25	2.27±0.12b	2.67±0.13* bc	1.08±0.07	2.89±0.24	2.19±0.10b	1.52±0.17bc
Cg	3.89±0.54	5.36±0.49	3.90±0.18b	4.73±0.21*c	2.07±0.17	4.80±0.24	3.99±0.13b	3.74±0.25b
Mot	3.29±0.47	5.53±0.52a	3.95±0.25b	4.39±0.22*	1.85±0.16	4.82±0.27	3.77±0.13b	3.39±0.23b
Par	3.23±0.45	6.09±0.52*a	3.69±0.23b	4.82±0.18* bc	2.09±0.16	4.70±0.33	3.84±0.14b	3.17±0.35bc
Ins	3.64±0.50	6.67±0.39*a	4.10±0.30b	5.31±0.19* bc	2.23±0.15	5.03±0.30	4.37±0.15	3.88±0.32b
Pir	3.14±0.45	5.31±0.34*a	3.14±0.20b	4.17±0.17* bc	1.74±0.11	3.94±0.39	3.01±0.12	2.49±0.19bc
Cl	2.87±0.50	3.74±0.21	2.51±0.16b	3.11±0.10* bc	1.53±0.11	3.19±0.26	2.35±0.14b	1.62±0.10bc
Tu	2.65±0.43	3.91±0.42	2.63±0.16b	3.48±0.09bc	1.41±0.09	2.51±0.19	2.97±0.10	2.05±0.30c
DG	3.41±0.14*	8.31±0.14*a	4.27±0.15b	5.14±0.56* b	3.94±0.12	6.43±0.21a	3.63±0.35b	3.12±0.24b
CA1	4.41±0.22	10.12±0.29*a	5.26±0.15b	6.63±0.64* b	4.71±0.07	7.32±0.29a	4.98±0.42b	3.42±0.28bc
CA2	3.32±0.16	8.91±0.22*a	3.51±0.13b	5.12±0.55* bc	3.63±0.11	5.74±0.23a	3.73±0.34b	3.08±0.26b
CA3	2.83±0.10*	7.24±0.12*a	3.07±0.13b	4.45±0.46bc	3.43±0.10	5.20±0.34a	3.00±0.28b	2.89±0.23b
VPM	1.14±0.07	3.45±0.12*a	0.97±0.07b	1.67±0.17bc	1.32±0.13	2.00±0.12a	1.08±0.26b	1.38±0.11b
VPL	0.80±0.06	2.58±0.11*a	0.88±0.05b	1.29±0.13* bc	1.00±0.09	1.60±0.09a	0.78±0.24b	0.85±0.05b
VM	1.20±0.06	3.30±0.09*a	1.16±0.07b	1.74±0.19* bc	1.23±0.09	2.15±0.06a	1.08±0.47	1.22±0.09b
Sub	1.17±0.06*	3.41±0.13a	1.57±0.09b	2.20±0.34b	1.62±0.08	3.43±0.19a	1.89±0.64b	1.81±0.15b
Amyg	2.23±0.08*	5.29±0.21*a	2.29±0.06b	3.29±0.28* bc	2.88±0.14	4.28±0.20a	2.82±0.32b	2.28±0.05b
VcX	1.66±0.14*	1.39±0.25*	2.18±0.08* b	3.56±0.30* bc	3.84±0.27	2.66±0.46	2.81±0.08	1.27±0.17bc
AuCx	2.29±0.29*	1.75±0.23*	3.45±0.46b	5.06±0.37* bc	4.84±0.18	3.07±0.47	3.58±0.05	1.64±0.14bc
MGNu	1.14±0.10*	0.89±0.13*	1.28±0.09* b	2.28±0.18* bc	2.64±0.19	1.43±0.16a	1.71±0.08	0.89±0.17bc
RSG	0.83±0.07*	0.67±0.16*	0.90±0.05* b	1.85±0.17* bc	1.75±0.16	1.41±0.24	1.17±0.06b	0.61±0.07bc
SuG	0.50±0.05*	0.47±0.11*	0.50±0.00	0.95±0.18* b	1.19±0.11	0.01±0.15	0.96±0.20	0.43±0.05bc
EntCx	2.04±0.23*	1.73±0.23*	3.14±0.22b	5.17±0.38* bc	4.89±0.18	3.04±0.46a	3.54±0.13	1.87±0.32bc
PAG	0.28±0.04*	0.27±0.04*	0.48±0.06b	0.24±0.07c	0.41±0.05	0.53±0.04	0.52±0.04	0.26±0.05bc
DR	0.29±0.04*	0.29±0.04*	0.35±0.05	0.25±0.05	0.47±0.04	0.62±0.06	0.37±0.04b	0.22±0.04bc
SuG	0.59±0.14	0.67±0.12*	1.21±0.10b	0.58±0.12c	0.78±0.09	1.53±0.11a	1.27±0.09	0.79±0.12bc

Tabla 4-1. Niveles de unión del [³H]-MK-801 a los receptores NMDA glutamatérgicos. Los valores representan la media ± e.e.m. expresados en nCi/mg de tejido equivalente. * p<0.05, ** p<0.01 respecto a la raza LEW, a p<0.05 respecto al control de la misma raza, b p<0.05 respecto al día 0 de la misma raza y c p<0.05 respecto al día 7 de la misma raza.

En general, puede decirse que la raza F344 experimenta mayores cambios (aumentos y disminuciones) en los niveles de receptores NMDA durante la extinción de la conducta de autoadministración de morfina en comparación con la raza LEW aunque los niveles de estos receptores vuelven a los valores observados tras la autoadministración prácticamente en todas las regiones. Por el contrario, la raza LEW muestra cambios (disminuciones) más tardíos y persistentes en los niveles de estos receptores, permaneciendo disminuidos tras 15 días de extinción en muchas de las regiones cerebrales estudiadas.

En las figuras 4.3. a 4.14. pueden verse algunas gráficas de zonas representativas del encéfalo que ilustran lo comentado (los símbolos de las leyendas del pie de figura son: C, diferencias significativas respecto a los animales control de la misma cepa; 0, diferencias significativas respecto a los animales sacrificados el día 0, último día de autoadministración; 7, diferencias significativas respecto a los animales sacrificados el día 7 después de la sustitución de morfina por suero salino).

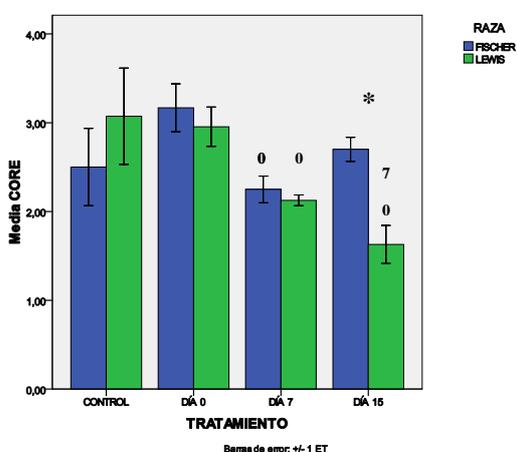


Figura 4-3. Niveles de unión de [3 H]-MK-801 a los receptores NMDA glutamatérgicos en NAcc Core.

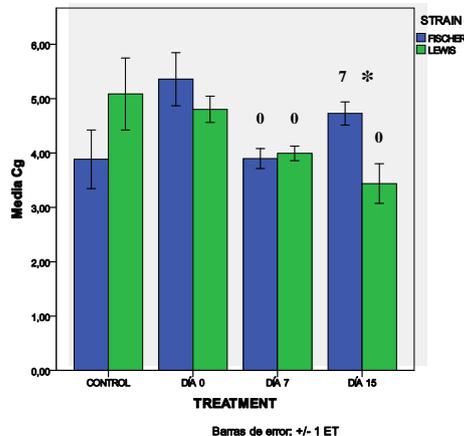


Figura 4-4. Niveles de unión de [3 H]-MK-801 a los receptores NMDA glutamatérgicos en corteza cingulada.

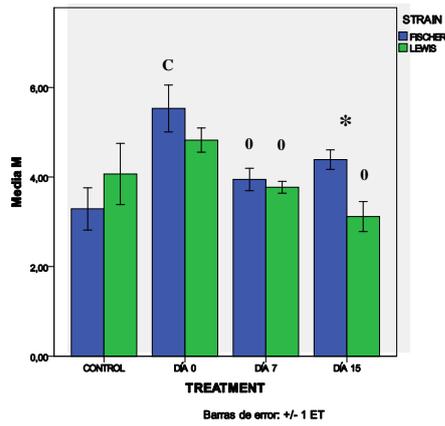


Figura 4-5. Niveles de unión de [3 H]-MK-801 a los receptores NMDA glutamatérgicos en la corteza motora.

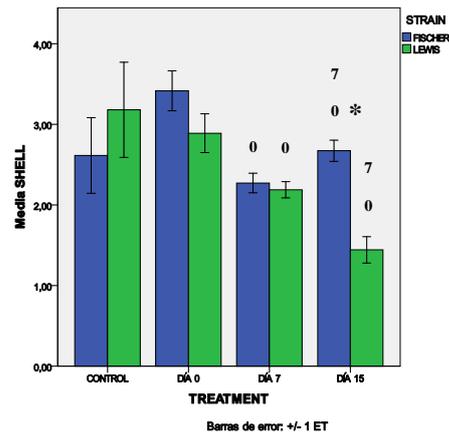


Figura 4-6. Niveles de unión de [3 H]-MK-801 a los receptores NMDA glutamatérgicos en NAcc Shell.

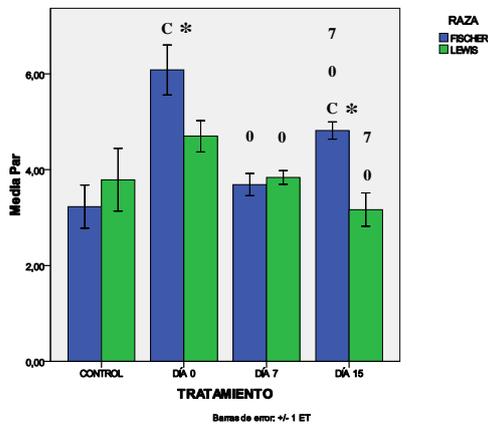


Figura 4-7. Niveles de unión de [3 H]-MK-801 a los receptores NMDA glutamatérgicos en la corteza parietal.

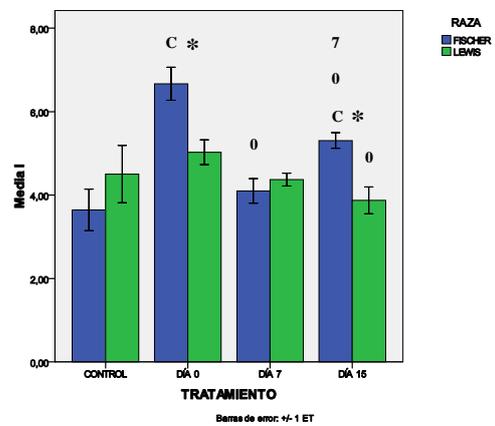


Figura 4-8. Niveles de unión de [3 H]-MK-801 a los receptores NMDA glutamatérgicos en la corteza insular.

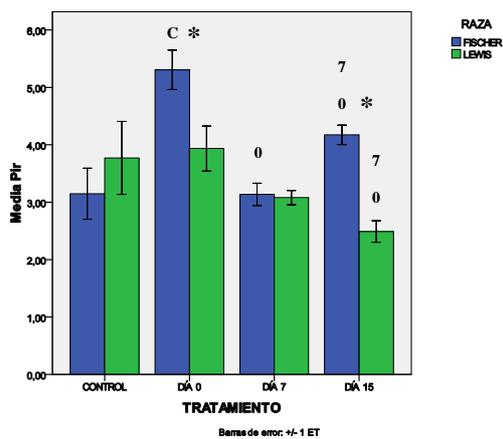


Figura 4-9. Niveles de unión de [3 H]-MK-801 a los receptores NMDA glutamatérgicos en la corteza piriforme.

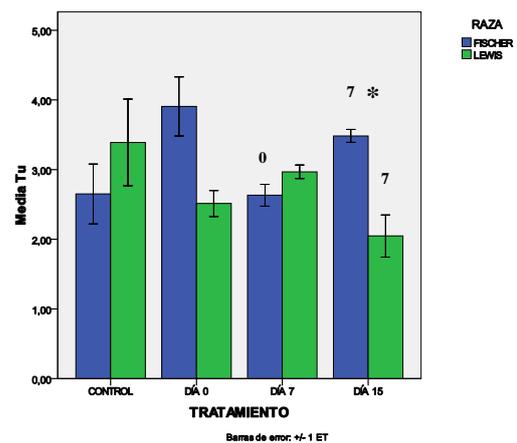


Figura 4-10. Niveles de unión de [3 H]-MK-801 a los receptores NMDA glutamatérgicos en el tubérculo olfatorio.

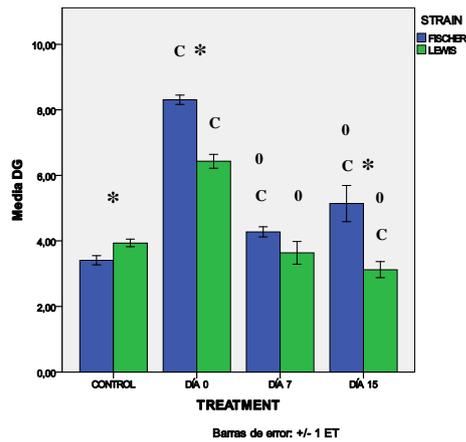


Figura 4-11. Niveles de unión de [3 H]-MK-801 a los receptores NMDA glutamatergicos en el giro dentado.

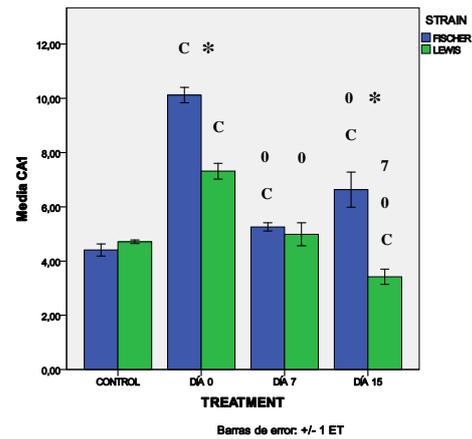


Figura 4-12. Niveles de unión de [3 H]-MK-801 a los receptores NMDA glutamatergicos en la región CA1

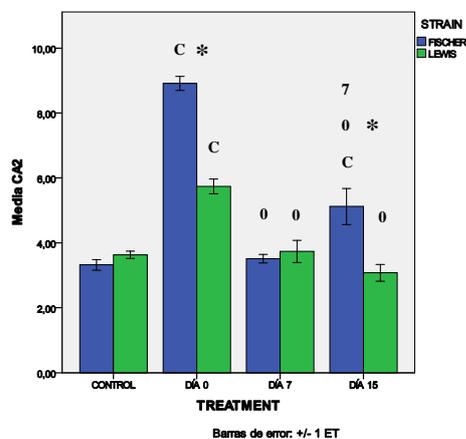


Figura 4-13. Niveles de unión de [3 H]-MK-801 a los receptores NMDA glutamatergicos en la región CA2.

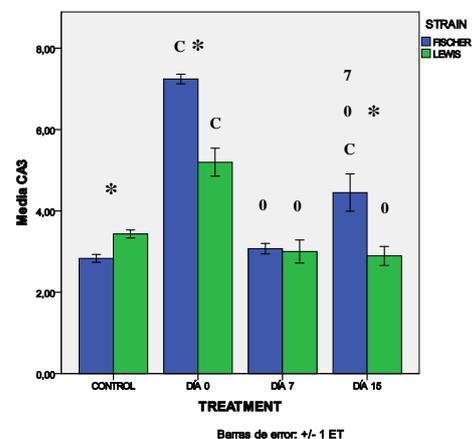


Figura 4-14. Niveles de unión de [3 H]-MK-801 a los receptores NMDA glutamatergicos en la corteza piriforme.

Una vez vistos los resultados del estudio de los receptores glutamatergicos NMDA pasaremos a abordar los del estudio en el que quisimos indagar acerca del metabolismo cerebral de la glucosa en los animales LEW y F344 tras la adquisición de la conducta de autoadministración de morfina y tras la retirada de esta.

4.2 Metabolismo cerebral de la glucosa medido por TEP

De nuevo, empezaremos con los resultados sobre la conducta para ver, posteriormente, los obtenidos tras medir los cambios en el metabolismo de la glucosa.

4.2.1 Autoadministración de morfina.

La Figura 4-15 muestra la adquisición de la conducta de autoadministración de morfina en las cepas LEW y F344. El ANOVA de medidas repetidas reveló un efecto estadísticamente significativo en la fase de autoadministración. Los animales de la cepa LEW se autoadministraron un mayor número de inyecciones de morfina por sesión que los animales de la cepa F344 durante esta fase ($p < 0,001$).

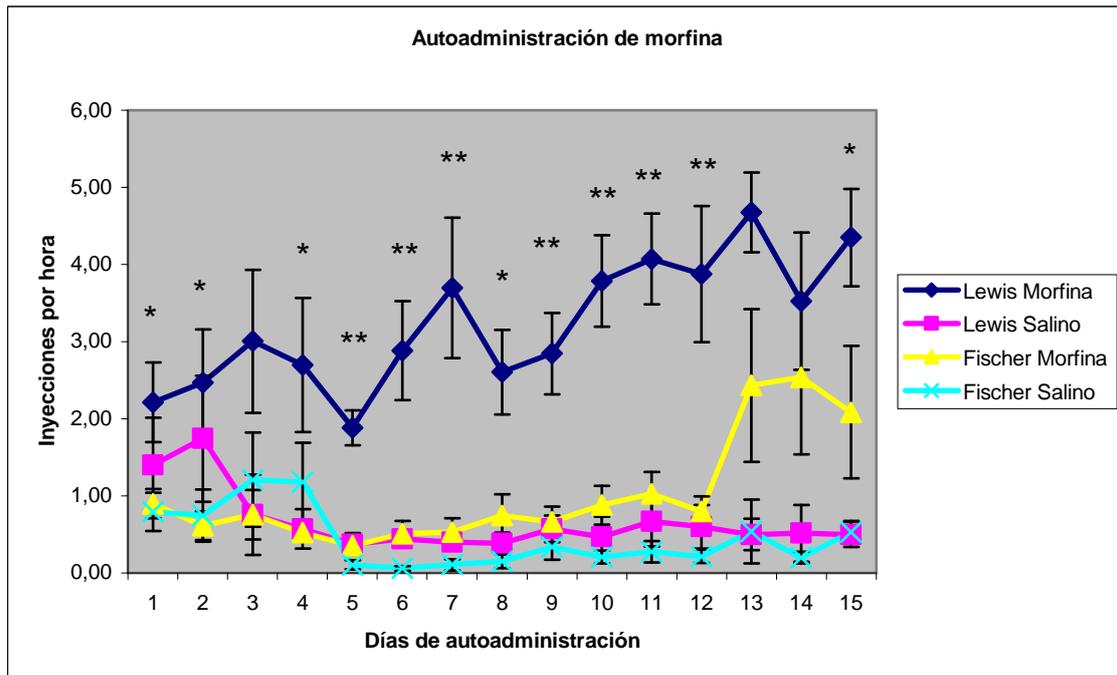


Figura 4-15. Conducta de autoadministración. Tasas de respuesta y número de refuerzos (inyecciones de morfina por hora 1 mg/kg)

4.2.2 Diferencias en el metabolismo cerebral de la glucosa.

El diseño experimental contaba con dos cepas de ratas (LEW y F344), dos condiciones (salino y morfina) y dos días (0 y 15). En total, 8 grupos de imágenes a contrastar: Lewis salino 0 (LS0), Lewis salino 15 (LS15), Lewis morfina 0 (LM0), Lewis morfina 15 (LM15), Fischer salino 0 (FS0), Fischer salino 15 (FS15), Fischer morfina 0 (FM0) y Fischer morfina 15 (FM15). La estadística llevada a cabo consistió en un análisis de varianza (ANOVA) de tres factores fijos con un nivel de significación estadística de 0,001.

Llevamos a cabo contrastes para comprobar si la autoadministración crónica de morfina afectaba al metabolismo de la glucosa cerebral en la cepa LEW (LS0 vs. LM0) y en la F344 (FS0 vs. FM0). También hicimos los contrastes oportunos para ver si la extinción de la conducta de autoadministración de morfina modificaba este metabolismo de la glucosa (LM0 vs. LM15 y FM0 vs. FM15). Incluso comparamos las imágenes de los animales que se autoadministraron suero salino en la primera fase con las imágenes de estos mismos animales tras el período de extinción (LS0 vs. LS15 y FS0 vs. FS15) como medida de control. Ninguno de los contrastes mencionados arrojó ningún resultado significativo. En cambio, cuando cuando comparamos a las dos razas entre sí salieron a la luz resultados significativos claros tanto en los animales de la condición salino (días 0 y 15) como en los que se habían autoadministrado morfina (LS0 vs. FS0, LS15 vs. FS15, LM0 vs. FM0 y LM15 vs. FM15).

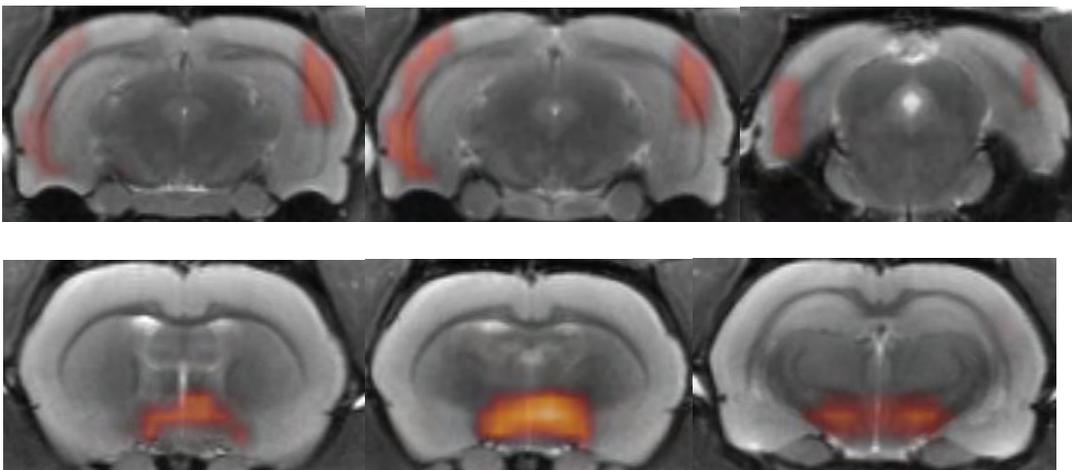


Figura 4-16. Imágenes representativas del contraste (salinos a día 0) en el que se iluminan los vóxeles correspondientes a las zonas del encéfalo en las que los animales Lewis muestran mayor metabolismo de la glucosa que los Fischer 344.

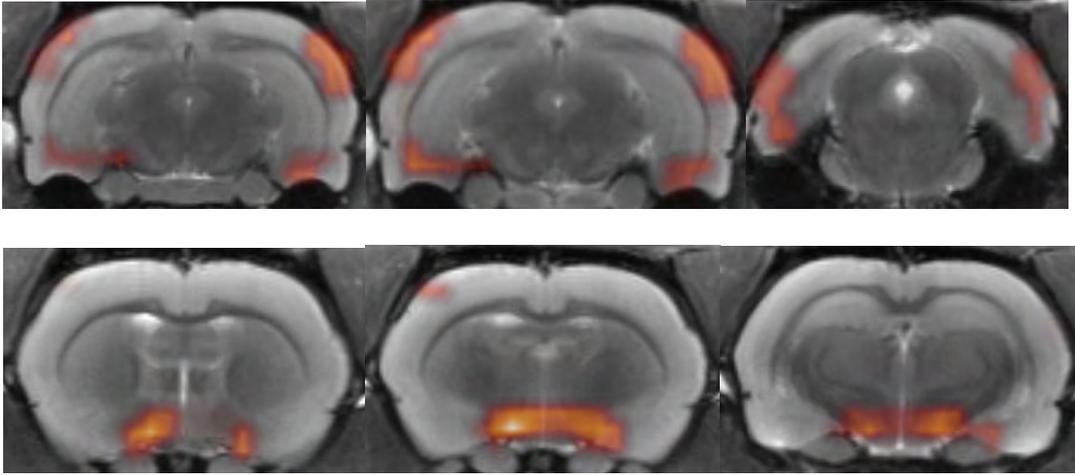


Figura 4-17. Imágenes representativas del contraste (salinos a día 15) en el que se iluminan los vóxeles correspondientes a las zonas del encéfalo en las que los animales Lewis muestran mayor metabolismo de la glucosa que los Fischer 344.

Las ratas Lewis mostraron mayor metabolismo cerebral de la glucosa que las ratas Fischer 344 en las cortezas entorrinal y perirrinal así como en una amplia zona que comprende el hipotálamo, los cuerpos mamilares, la sustancia negra, el área tegmental ventral y el haz prosencefálico medial, influyendo en menor medida los factores condición y día (ver Figuras 4.16 a 4.19). Esto es, parece que la variable causante de estas diferencias es la cepa. Sin embargo se puede apreciar claramente que tras 15 días de autoadministración de morfina estas diferencias disminuyen notablemente, tanto en el número de vóxeles como en que pierden la bilateralidad, aunque solo en las zonas corticales y no en las subtalámicas.

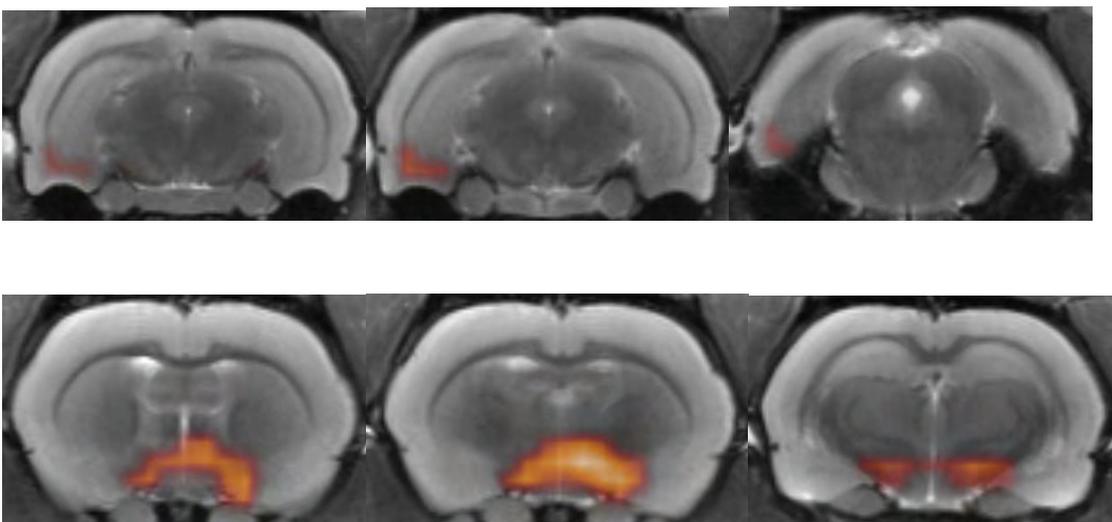


Figura 4-18. Imágenes representativas del contraste (morfina a día 0) en el que se iluminan los vóxeles correspondientes a las zonas del encéfalo en las que los animales Lewis muestran mayor metabolismo de la glucosa que los Fischer 344.

Sin embargo, tras otros 15 de extinción se observa cierta tendencia a la recuperación de estas diferencias. Las diferencias en cuanto al metabolismo de la glucosa se mantenían en mayor o menor extensión dependiendo del registro aplicado, del parámetro FWHM del suavizado, del *jackknifing* (procedimiento consistente en realizar los contrastes eliminando al azar a uno de los animales) y del nivel de significación. La magnitud de estas diferencias entre razas depende del contraste que se realice. Por ejemplo, la corteza lateral aumenta de 107 vóxeles significativos (contraste Lewis Salino Día 0 > Fischer 344 Salino Día 0) a 125 vóxeles (contraste Lewis Salino Día 15 > Fischer 344 Salino Día 15).

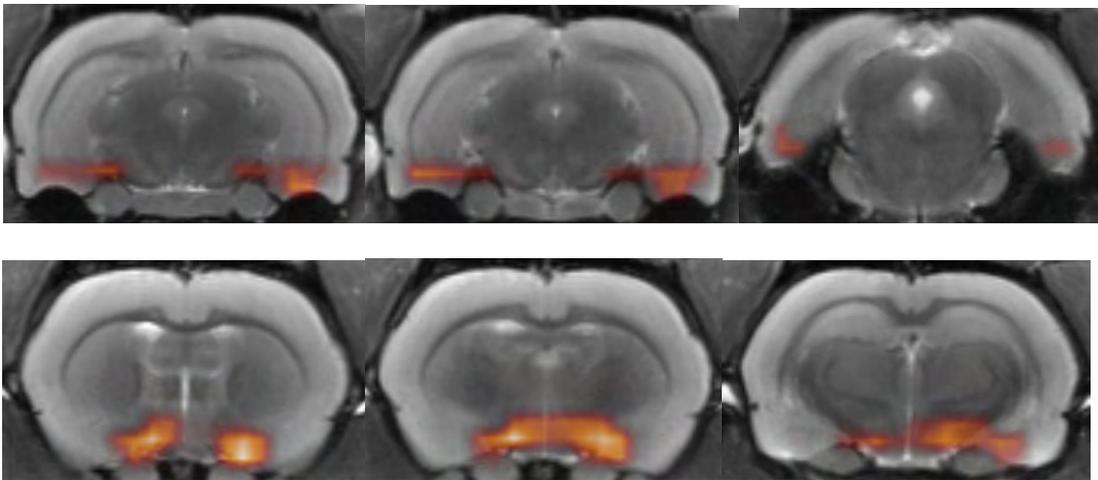


Figura 4-19. Imágenes representativas del contraste (morfina a día 15) en el que se iluminan los vóxeles correspondientes a las zonas del encéfalo en las que los animales Lewis muestran mayor metabolismo de la glucosa que los Fischer 344.

Seguidamente veremos los resultados correspondientes del estudio con las endomorfina. En primer lugar veremos los niveles de unión de ambas endomorfina.

4.3 Niveles de unión de las endomorfinas 1 y 2 tritadas a sus receptores.

En primer lugar mostraremos algunos autorradiogramas representativos de las uniones total e inespecífica de las endomorfinas tritadas. En la figura 4-30 podemos apreciar cómo las imágenes de la unión inespecífica difieren poco de las de la unión total en el caso de la E-1.

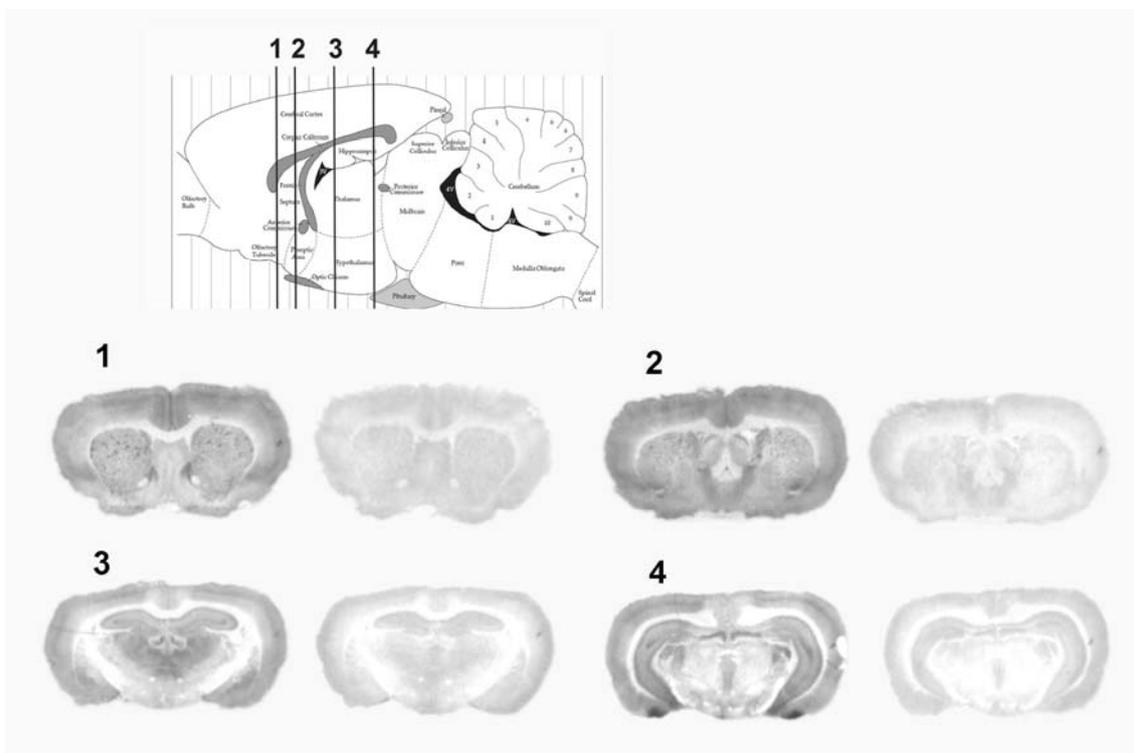


Figura 4-20. Autorradiogramas representativos de la unión total y la inespecífica de E-1.

Sin embargo, las imágenes de la E-2 muestran que la unión inespecífica es claramente inferior en comparación con la E-1.

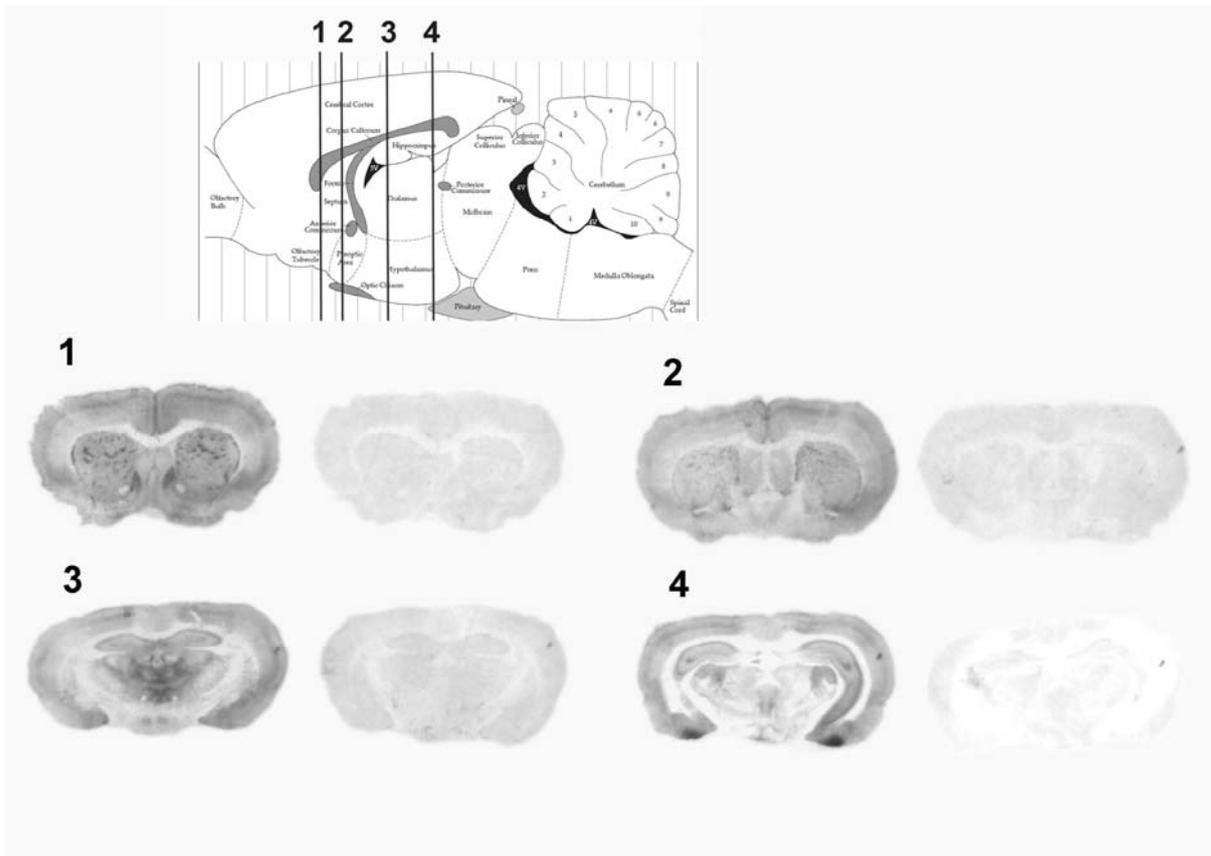


Figura 4-21. Autorradiogramas representativos de la unión total y la inespecífica de E-2.

4.3.1 Niveles de unión de la endomorfin-1

A continuación se presentan las gráficas que muestran los resultados encontrados tras el análisis de las imágenes obtenidas con la concentración 3 nM tanto con E1 como con E2 en distintas regiones del encéfalo de la rata. En primer lugar se muestran los niveles de unión total del ligando (niveles obtenidos cuando los cortes fueron incubados únicamente en presencia del ligando radiactivo) así como los de unión inespecífica (niveles obtenidos al incubar los cortes en presencia tanto del ligando radiactivo como del ligando no radiactivo). Los resultados se muestran presentando en primer lugar diversas estructuras a la altura del Núcleo del Lecho de la Estría Terminal (BNST) y a continuación a las alturas del Núcleo Accumbens (NAc), Hipocampo, (HIP), Área Tegmental Ventral, (VTA) y Locus Coeruleus, (LC). Para localizar todas las estructuras que se mencionan en el presente trabajo se ha utilizado el atlas del encéfalo de la rata de Paxinos y Watson (2004).

Las gráficas de la E1 muestran que hay diferencias entre la unión total y la unión inespecífica en la mayoría de las regiones estudiadas. Sin embargo, el desplazamiento en la unión del ligando radiactivo es menor de lo esperado.

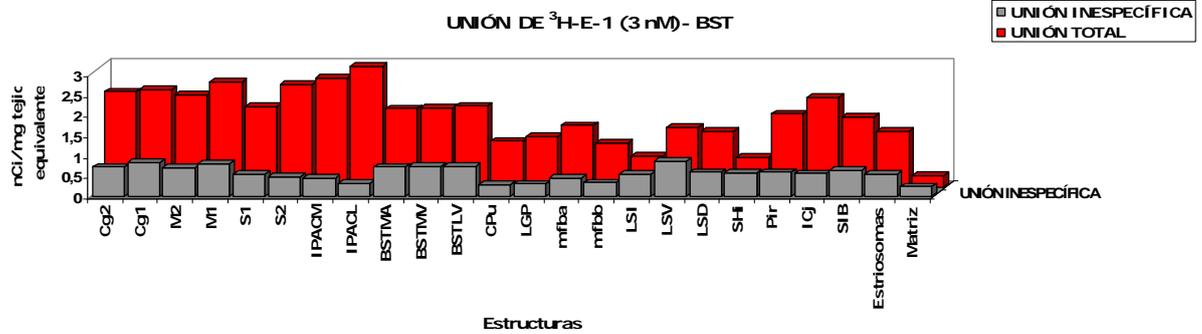


Figura 4-22. Niveles de unión de E-1 a nivel de BST (Cg1- área 1 corteza cingulada, Cg2- área 2, M1- corteza motora primaria, M2- secundaria, S1- corteza somatosensorial primaria, S2- secundaria, IPACM-L- núcleo intersticial medial y lateral, BSTMA-V- bed núcleo medial y ventral, CPU- caudado / putamen, LPG- globo pálido ventral, mfba-b- haz prosencefálico medial, LSI-V-D- Septum intermedio, ventral y dorsal, SHi- Septum hipocampal, Pir- corteza piriforme, ICj- isla de calleja, SIB- sustancia innominada, Estriosomas del estriado, Matriz del estriado).

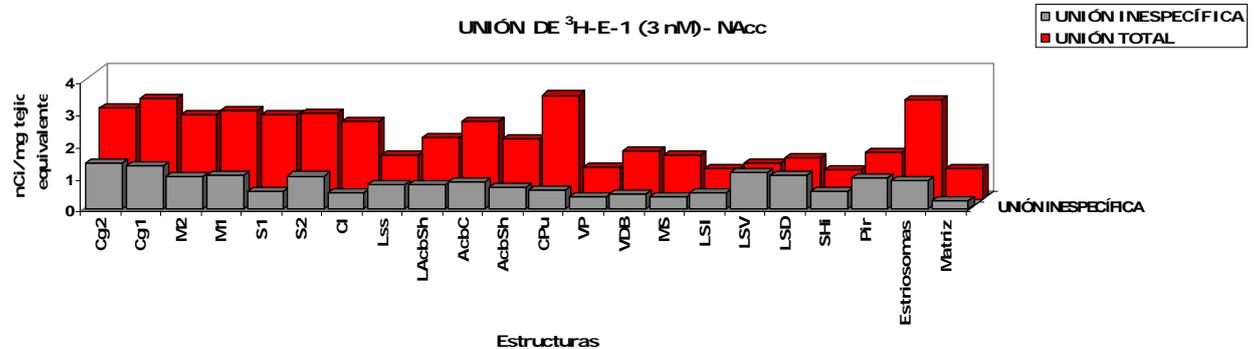


Figura 4-23. Niveles de unión de E-1 a nivel de NAcc (Cg1- área 1 corteza cingulada, Cg2- área 2 corteza cingulada, M1- corteza motora primaria, M2- corteza motora secundaria, S1- corteza somatosensorial primaria, S2- corteza somatosensorial secundaria, Cl- células adrenérgicas, LSS- banda lateral del estriado, LAcSh- núcleo accumbens shell, AcCb- núcleo accumbens core, CPU- caudado / putamen, VP- pálido ventral, VDB- banda diagonal núcleos límbicos, MS- Septum medial, LSi- Septum intermedio lateral, LSV- Septum ventral, LSD- Septum dorso lateral, SHi- Septum hipocampal, PIR- corteza piriforme, Estriosomas del estriado, Matriz del estriado).

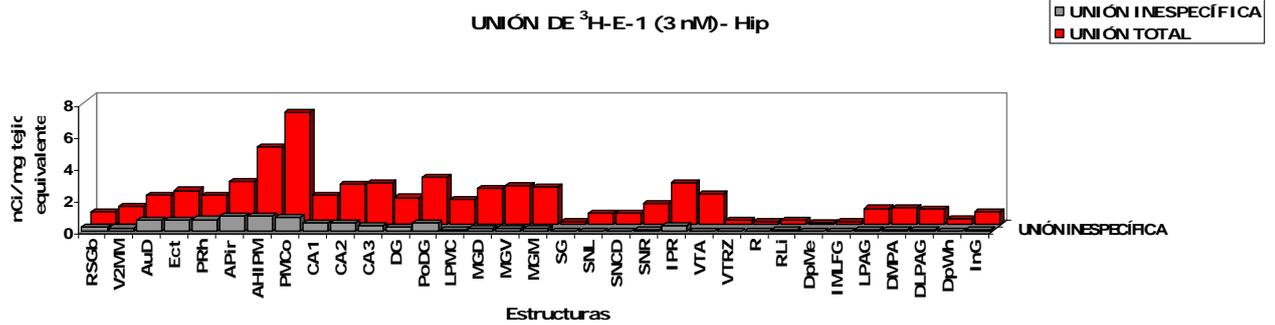


Figura 4-24. Niveles de unión de E-1 a nivel de Hip (RGSb- corteza retrosplenial granular b, RSA- corteza retrosplenial agranular, M2- corteza motora secundaria, M1- corteza motora primaria, S1- corteza somatosensorial primaria, S2- corteza somatosensorial secundaria, Ect- corteza entorrinal, CA1- hipocampo área 1, CA2- “ área 2, CA3- “ área 3, PoDG- giro dentado superior, DG-giro dentado, CPU- caudado / putamen, LGP- globo pálido lateral, Lhb- núcleo habenular lateral, PV-núcleo talámico paraventricular, VPM-núcleo talámico posterior ventral, MDC- núcleo talámico medio dorsal, LDVL- núcleo talámico dorsolateral, Subv-núcleo talámico submedio ventral, MGP- globo pálido medial, LH- área hipotalámica lateral, DMD- núcleo dorsomedial hipotalámico, VMHDM- núcleo ventromedial hipotalámico, VM- núcleo talámico ventromedial, VMHVL- núcleo talámico ventrolateral, MePD- núcleo posterior dorsal de la amígdala, MeAD- núcleo anterodorsal de la amígdala, MePC- núcleo medial dorsal de la amígdala, BMA- núcleo basomedial de la amígdala, B- núcleo basal de Meynert, LaDL- núcleo lateral de la amígdala, Rt- núcleo reticular talámico).

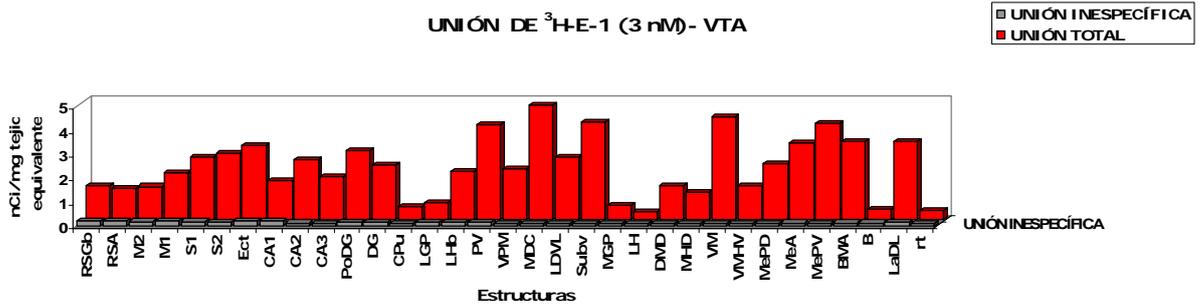


Figura 4-25. Niveles de unión de E-1 a nivel de VTA (RSGb- corteza retrosplenial granular b, V2MM- corteza visual secundaria, Aud- corteza auditiva secundaria, Ect- corteza entorrinal, PRb- corteza peririnal, APir- área piriforme de la amígdala, AHIPM- área de la amígdala hipocampal posterior, PMCo- núcleo amigdalóide posterior, CA1, CA2 CA3- áreas 1, 2, y 3 del hipocampo, DG- giro dentado, PoDG- giro dentado superior, LPMC- núcleo talámico posterior, MGD-V-M- núcleo geniculado dorsal, medial y ventral, SG- núcleo talámico supragenículado, SNL-D-R- sustancia negra lateral, dorsal y reticular, IPR- núcleo interpeduncular, VTA- área tegmental ventral, VTRZ- zona tegmental visual, R- núcleo rojo, RLi- núcleo rostral del raphe, DpMe- núcleos mesencefálicos, IMLFG- núcleos intersticiales, LPAG- sustancia gris periacueductal lateral, DMPAG- sustancia gris periacueductal dorsomedial, DLPAG- sustancia gris periacueductal dorsolateral, DpWn- deep white layer colículo superior, Ing- colículo superior intermedio).

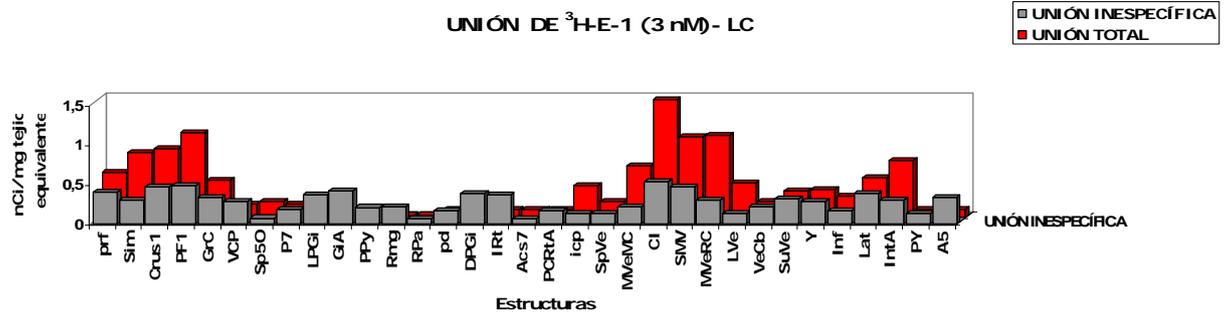


Figura 4-26. Niveles de unión de E-1 a nivel de LC (prf- fisura primaria., Sim- lobulo simple, Crus1- crus 1 lobulo ansiform, PF1- parafloclulus, DC- núcleo dorsal coclear, GRC- núcleo coclear granular, VCP- núcleo coclear ventral, SpSo- núcleo espinal trigemino, P7- zona perifacial, LGPI- núcleo lateral paragigantocelular, GIA- núcleo del bulbo olfatorio accesorio, PPy- núcleo parapiramidal, Rmg- núcleos mayores del raphe, Rpa- núcleo pálido raphe, pd- bundle predorsal, DPGI.- núcleo dorsal paragigantocelular, IRt- núcleo reticular intermedio, Acs7- núcleo facial accesorio, PCRtA- núcleo reticular parvocelular, icp- pedúnculo inferior cerebral, Spve- núcleo espinal vestibular, MVeMC- núcleo medial vestibular parvocelular, CI- núcleo intersticial caudado, SMV- velum superior medular, MVeRC- núcleo medial vestibular, LVE- núcleo vestibular lateral, Vecg- núcleo vestibuceleberal, Suve- núcleo superior vestibular, Y- núcleo Y, Lat- núcleo cerebral lateral, IntA- núcleo anterior cereberal, Py- tracto piramidal, A5- células noradrenérgicas).

4.3.2 Niveles de unión de la endomorfina-2

Por otra parte, las gráficas de la E2 muestran que también existen diferencias entre la unión total y la unión inespecífica pero, a diferencia de los resultados con la E1, en este caso el desplazamiento producido por el ligando no radiactivo es mayor y más consistente.

La distribución observada tanto con la E1 como con la E2 coincide en gran medida a la ya descrita para el DAMGO (Mansour et al., 1987), agonista específico de los receptores μ -opioides.

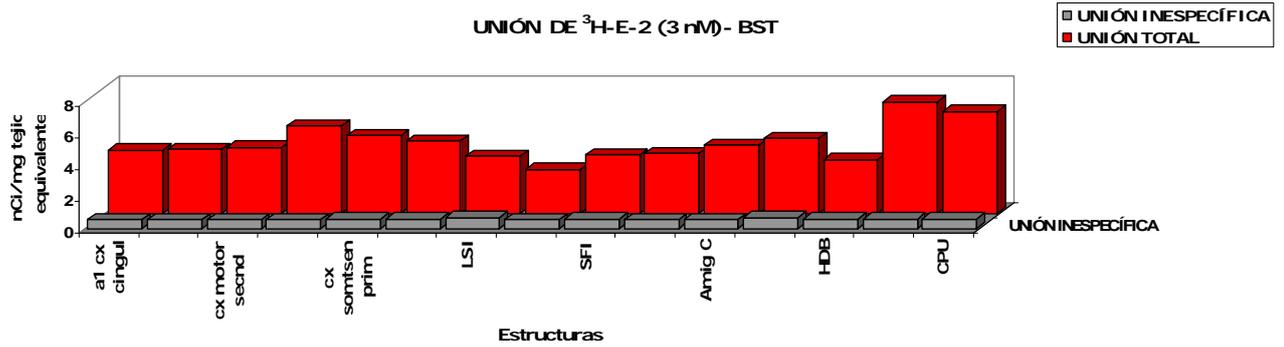


Figura 4-27. Niveles de unión de E-2 al nivel de la estría terminal. Cg1- área 1 corteza cingulada, Cg2- área 2 corteza cingulada, M2- corteza motora secundaria, M1- corteza motora primaria, S1- corteza somatosensorial primaria, LSV- Septum ventral, LSi- Septum intermedio lateral, MnPo- núcleo preóptico mediano, SFi- núcleo septofimbrial, BSTMA- núcleo de la estría terminal, Amig- amígdala, MCPO- núcleo preóptico magnocelular, HDB- núcleo horizontal de la banda diagonal, LGP- globo pálido lateral, CPU- caudado putamen, MPOL, núcleo preóptico medial lateral, AVPe, núcleo periventricular anteroventral, Patches, Matriz.

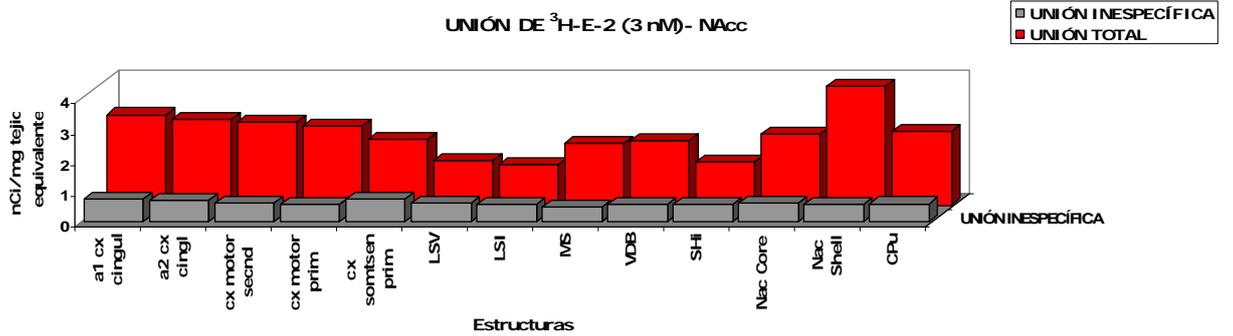


Figura 4-28. Niveles de unión de E-2 al nivel del NAcc. A1cx cing- área 1 corteza cingulada, a2 cx cing- área 2 corteza cingulada, cx motor sec- corteza motora secundaria, cx motor prim- corteza motora primaria, cx somatsens prim- corteza somatosensorial primaria, LSV- Septum ventral, LSi- septum intermedio lateral, MS- septum medial, VDB- banda diagonal núcleos límbicos, SHI- septum hipocampal, amig- amígdala, Cpu- caudado putamen, patches.

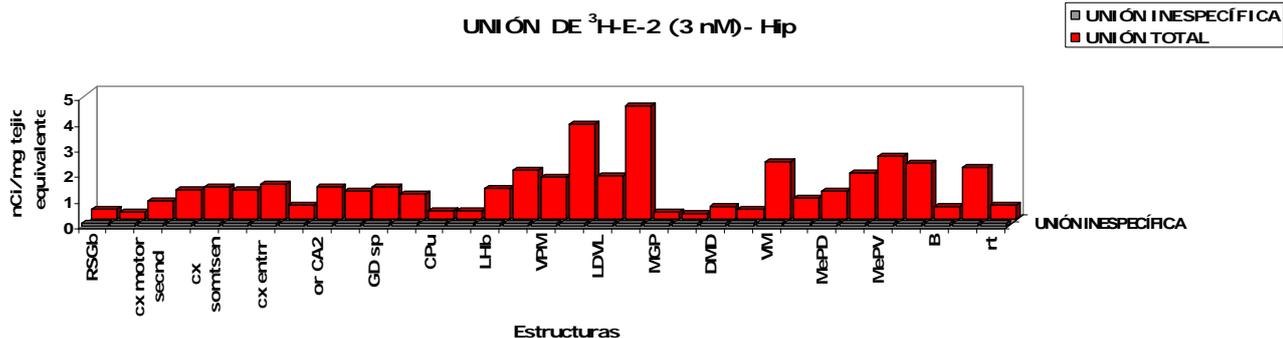


Figura 4-29. Niveles de unión de E-2 al nivel del hipocampo. RGSb- corteza retrosplenial granular b, RSA- corteza retrosplenial agranular, M2- corteza motora secundaria, M1- corteza motora primaria, S1- corteza somatosensorial primaria, S2- corteza somatosensorial secundaria, Ect- corteza entorrinal, CA1- hipocampo área 1, CA2- “ área 2, CA3- “ área 3, PODG- giro dentado superior, DG-giro dentado, CPU- caudado / putamen, LGP- globo pálido lateral, LHb- núcleo habenular lateral, PV-núcleo talámico paraventricular, VPM- núcleo talámico posterior ventral, MDC-núcleo talámico medio dorsal, LDVL- núcleo talámico dorsolateral, Subv- núcleo talámico submedio ventral, MGP- globo pálido medial, LH- área hipotalámica lateral, DMD- núcleo dorsomedial hipotalámico, VMHDM- núcleo ventromedial hipotalámico, VM- núcleo talámico ventromedial, VMHVL- núcleo talámico ventrolateral, MePD- núcleo posterior dorsal de la amígdala, MeAD- núcleo anterodorsal de la amígdala, MePC- núcleo medial dorsal de la amígdala, BMA- núcleo basomedial de la amígdala, B- núcleo basal de Meynsert, LaDL- núcleo lateral de la amígdala, Rt- núcleo reticular talámico.

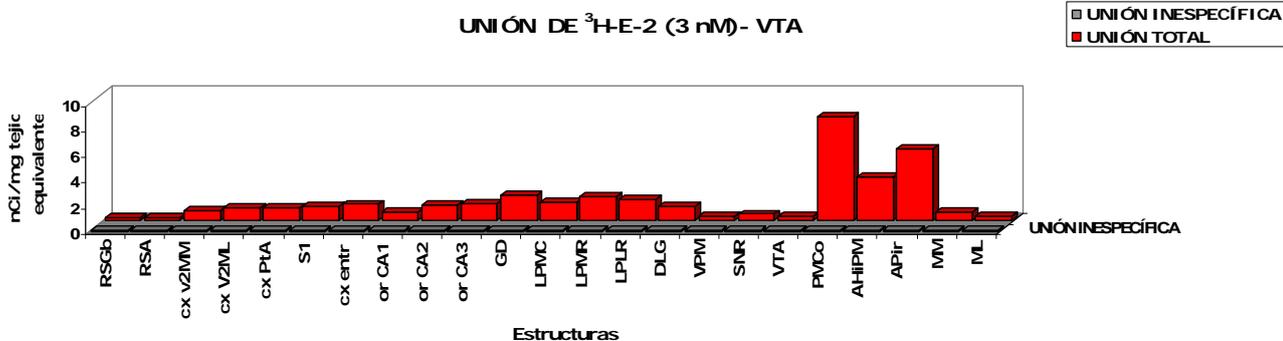


Figura 4-30. Niveles de unión de E-2 al nivel del VTA. RsGb- corteza retrosplenial granular b, RSA- corteza agranular retrosplenial, cx V2mm-corteza visual secundaria mediomedial, cx V2ml- corteza visual secundaria mediolateral, cx PtA, corteza de asociación parietal, S1- corteza somatosensorial primaria, CA1, CA2, CA3, GD- giro dentado, LPMC- núcleo talámico posterior lateral mediocaudal, LPMR- núcleo talámico posterior lateral mediodorsal, LPLR- núcleo talámico posterior lateral laterorostral, DLG-núcleo geniculado lateral dorsal, VPM- núcleo talámico ventral posteromedial, SNR- sustancia negra reticulada, VTA- área tegmental ventral, PMCo, núcleo amigdaloides cortical posteromedial, AHIPM-área de la amígdala hipocampal posterior, APir- área piriforme de la amígdala, MM- núcleo mamilar medial, ML- núcleo mamilar medial lateral.

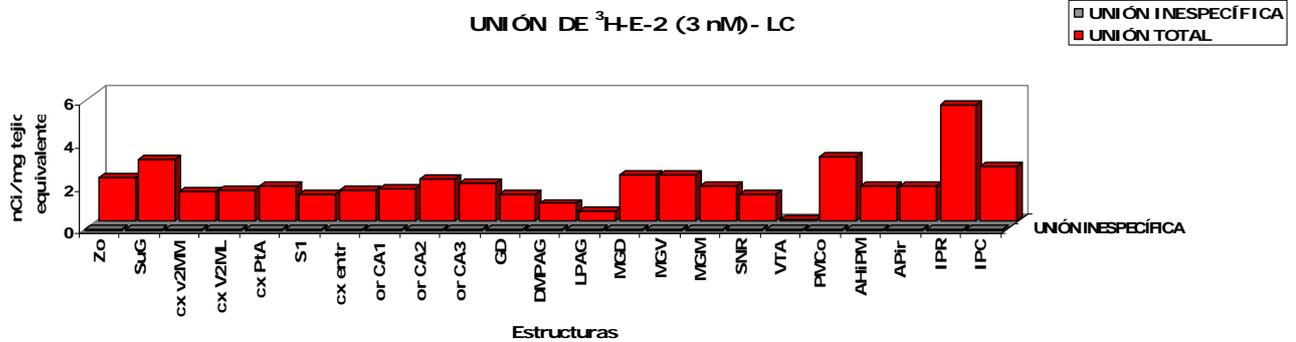


Figura 4-31. Niveles de unión de E-1 a nivel de LC (prf- fisura primaria., Sim- lobulo simple, Crus1- crus 1 lobulo ansiform, PF1- parafloculus, DC- núcleo dorsal coclear, GRC- núcleo coclear granular, VCP- núcleo coclear ventral, SpSo- núcleo espinal trigemino, P7- zona perifacial, LGPI- núcleo lateral paragigantocelular, GIA- núcleo del bulbo olfatorio accesorio, PPy- núcleo parpiramidal, Rmg- núcleos mayores del raphe, Rpa- núcleo pálido raphe, pd- bundle predorsal, DPGI.- núcleo dorsal paragigantocelular, IRt- núcleo reticular intermedio, Acs7- núcleo facial accesorio, PCRtA- núcleo reticular parvocelular, icp- pedúnculo inferior cerebral, Spve- núcleo espinal vestibular, MVeMC- núcleo medial vestibular parvocelular, CI- núcleo intersticial caudado, SMV- velum superior medular, MVeRC- núcleo medial vestibular, LVE- núcleo vestibular lateral, Vecg- núcleo vestibuceleberal, Suve- núcleo superior vestibular, Y- núcleo Y, Lat- núcleo cerebral lateral, InTA- núcleo anterior cereberal, Py- tracto piramidal, A5- células noradrenérgicas).

Nuestra intención inicial era comparar los niveles de unión de la endomorfina 2 entre las dos cepas de rata (LEW y F344). Sin embargo, no pudimos llevar a cabo dicha comparación a consecuencia de la degradación del ligando. Por ello, mostramos a continuación varias imágenes en las que se puede apreciar cómo los niveles son inusualmente bajos y, en consecuencia, no susceptibles de someter a análisis.



Figura 4-32. Autorradiogramas representativos realizados con E-2 tritiada degradada.

4.3.3 Autoadministración de endomorfin-2

En vista de los resultados obtenidos decidimos llevar a cabo el estudio de autoadministración con la E2. Comenzamos con la concentración 100 nM a la que siguieron 600 nM, 1200 nM y 2400 nM. Para el análisis de estos resultados realizamos un ANOVA mixto con un factor intrasujeto (días de autoadministración) y un factor entre grupos (dosis). Obtuvimos un efecto del factor intrasujeto “días” ($F_{14,406}=6,029$; $p<0,001$). También obtuvimos un efecto de la interacción “días x dosis” ($F_{42,406}=2,289$; $p<0,001$). El efecto del factor entre grupos “dosis” también fue estadísticamente significativo ($F_{3,29}=6,979$; $p<0,01$). Los análisis *post hoc* (Tukey b) revelaron diferencias estadísticamente significativas entre las dosis de 100 nM y 600 nM ($p<0,01$) así como entre 100 nM y 2400 nM ($p<0,05$).

También realizamos comparaciones entre los 5 últimos días de la fase de adquisición con los 5 últimos días de la fase de extinción. Una vez realizados los análisis estadísticos se observó que solo existían diferencias significativas entre el número de inyecciones que los animales se autoadministraron durante las fases de adquisición y extinción en la concentración de 2400 nM ($t_9=5,377$; $p<0,001$). En cuanto a la extinción obtuvimos un efecto de la variable “días” ($F_{6,192}=2,689$; $p<0,05$) y de la interacción “días x dosis” ($F_{18,192}=2,629$; $p<0,01$). En este caso el efecto del factor entre grupos “dosis” no fue estadísticamente significativo.

También comparamos los 5 últimos días de autoadministración con los 5 últimos de extinción entre las distintas dosis no encontrando diferencias significativas.

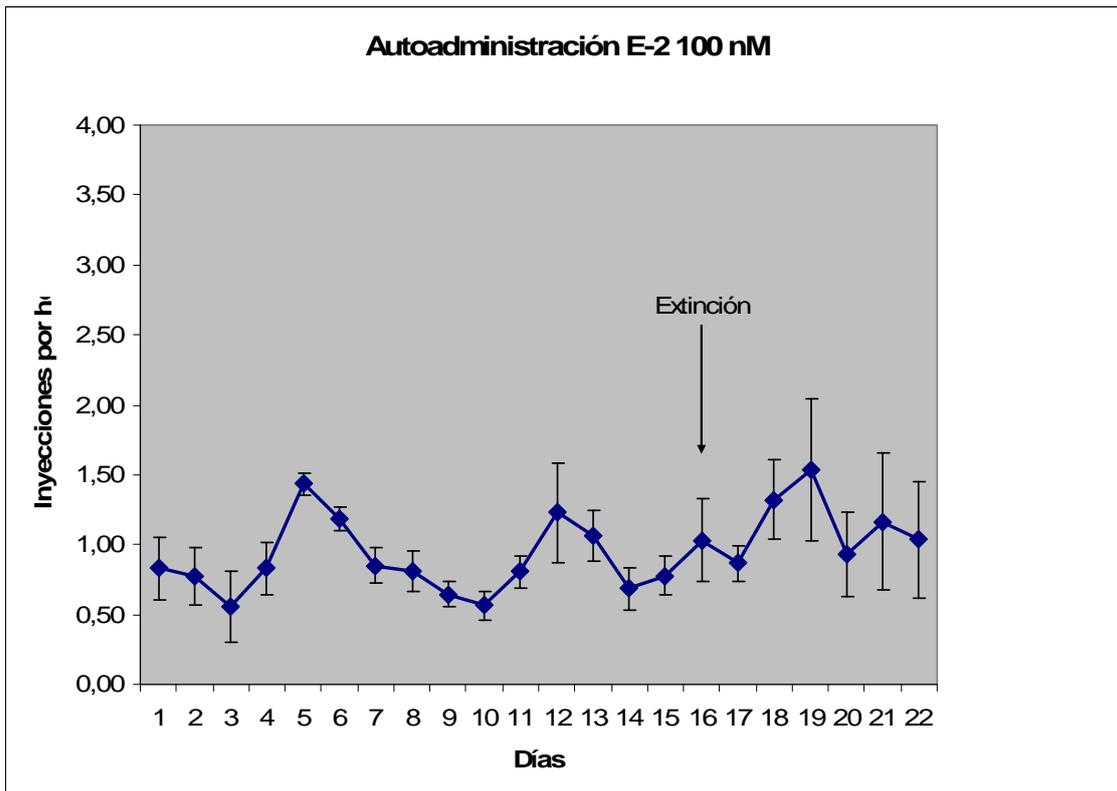


Figura 4-33. Curva de autoadministración de E-2 (concentración 100nM).

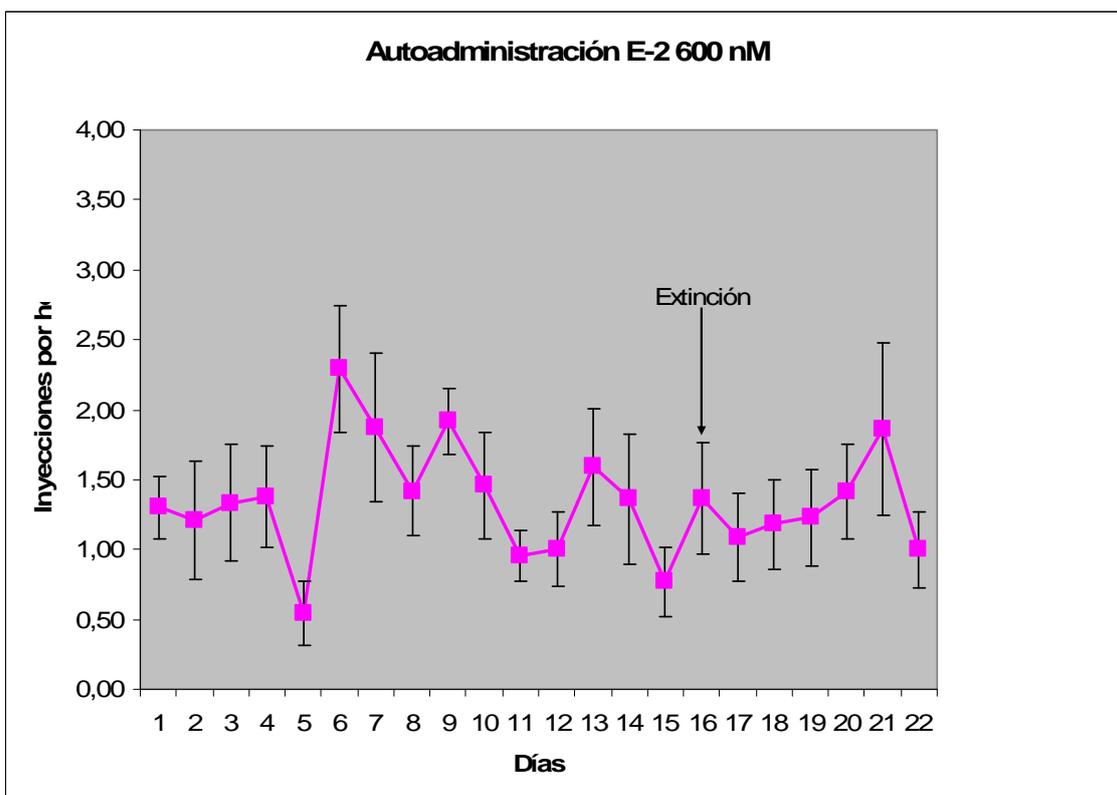


Figura 4-34. Curva de autoadministración de E-2 (concentración 600nM).

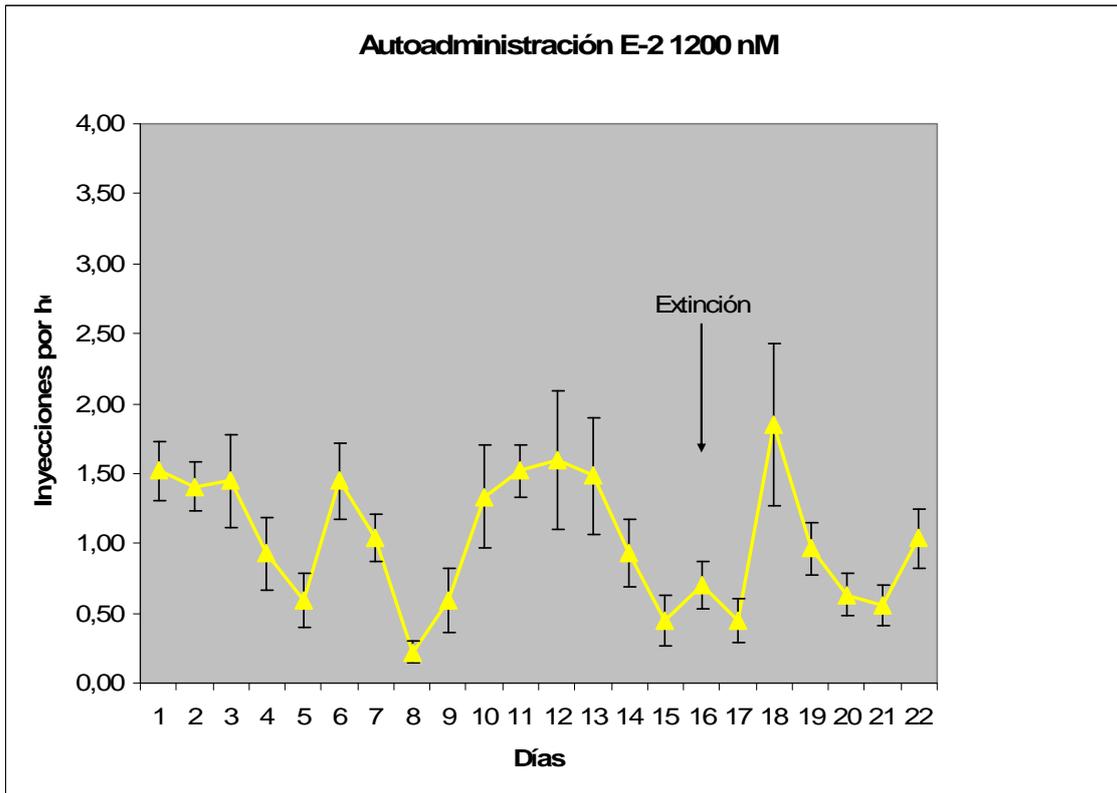


Figura 4-35. Curva de autoadministración de E-2 (concentración 1200nM).

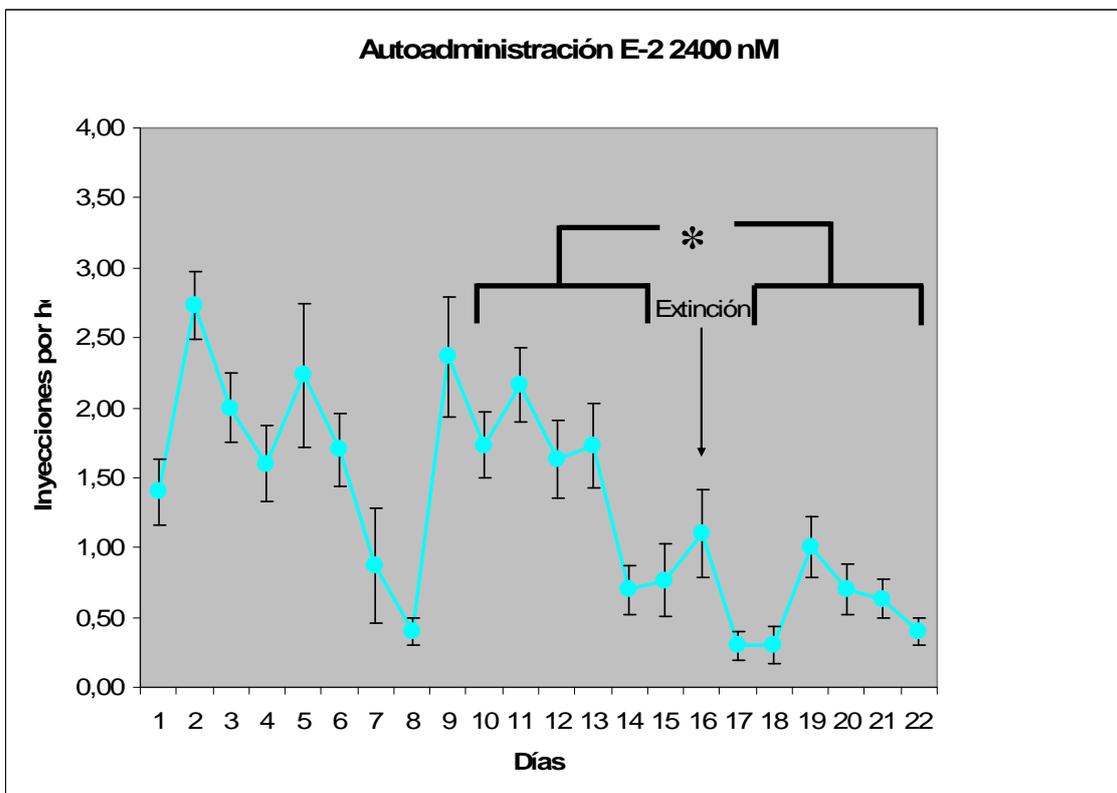


Figura 4-36. Curva de autoadministración de E-2 (concentración 2400nM).

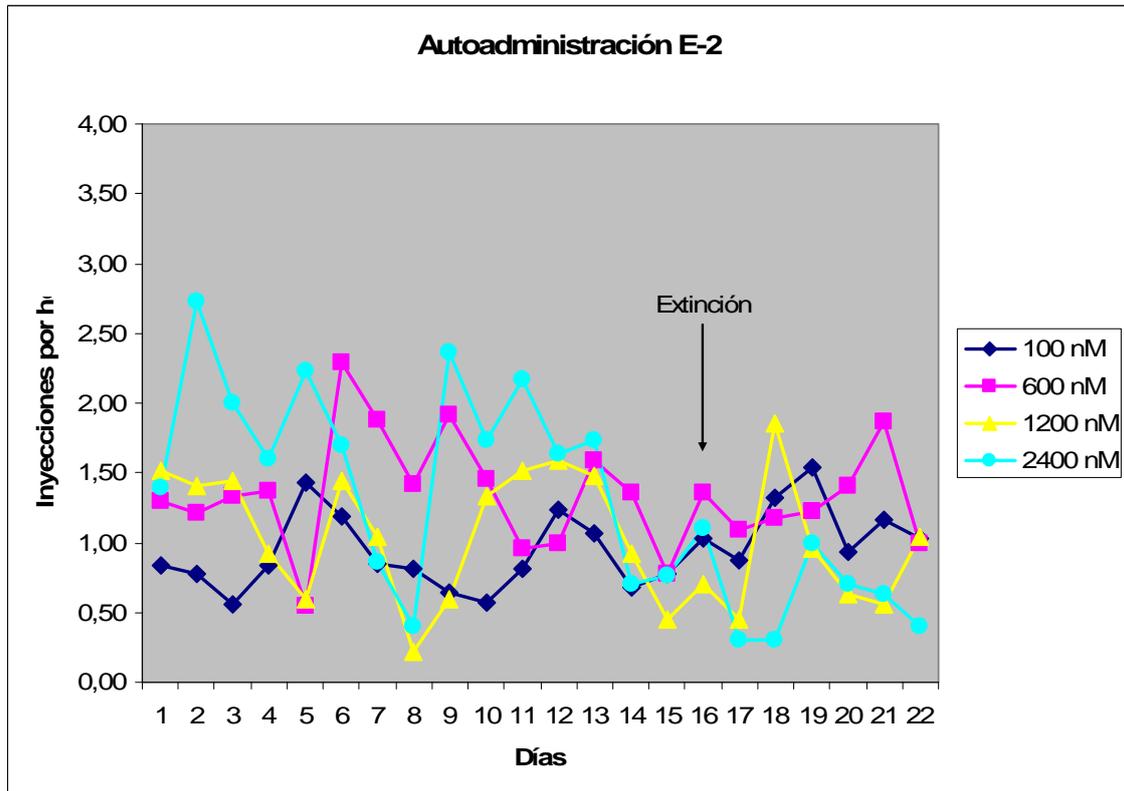


Figura 4-37. Conducta de autoadministración de E-2 con las cuatro concentraciones probadas.

Por último, comparamos la cantidad total de droga ingerida por los animales a lo largo de toda la fase de autoadministración en cada concentración. Transformamos los datos originales aplicando una transformación logarítmica obteniendo homocedasticidad en los datos por lo que se llevó a cabo un ANOVA unifactorial con el factor “dosis” arrojando como resultado que había un efecto de la dosis ($F_{3,38}=98,508$; $p<0,001$). Tras realizar las pruebas *post hoc* (Tukey b) pudimos comprobar que las cantidades de droga total ingerida por los cuatro grupos eran todas diferentes entre sí ($p<0,05$ para todas las comparaciones).

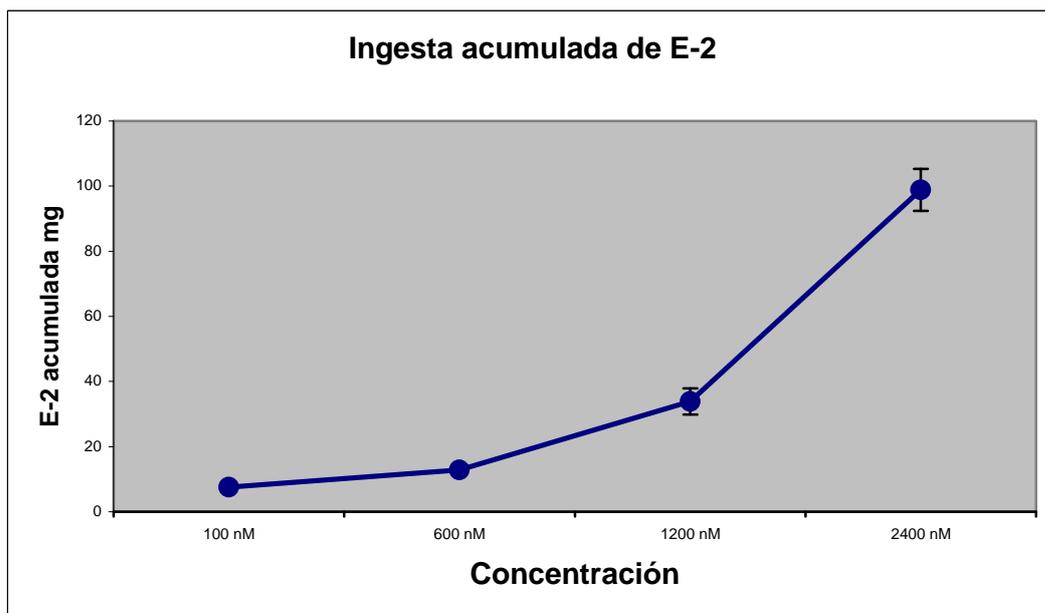


Figura 4-38. Curva de la ingesta acumulada total según cada concentración.

4.3.4 Administración pasiva de endomorfina-2

Tras observar que los animales no mostraban el patrón conductual característico de autoadministración con drogas de abuso y dada la rápida metabolización a la que son sometidos estos péptidos decidimos realizar una prueba para asegurarnos de que la sustancia llegaba al cerebro de los animales por vía intravenosa. Para ello inyectamos a dos animales una dosis alta de E2 para a continuación extraerles el encéfalo y llevar a cabo posteriormente un estudio autorradiográfico. Ambos animales murieron en el acto, seguramente a consecuencia de sobredosis. En la figura 4-39 podemos observar unas imágenes representativas de dicho estudio. De esta manera comprobamos que, efectivamente, la sustancia llegaba al cerebro y se unía a sus receptores.

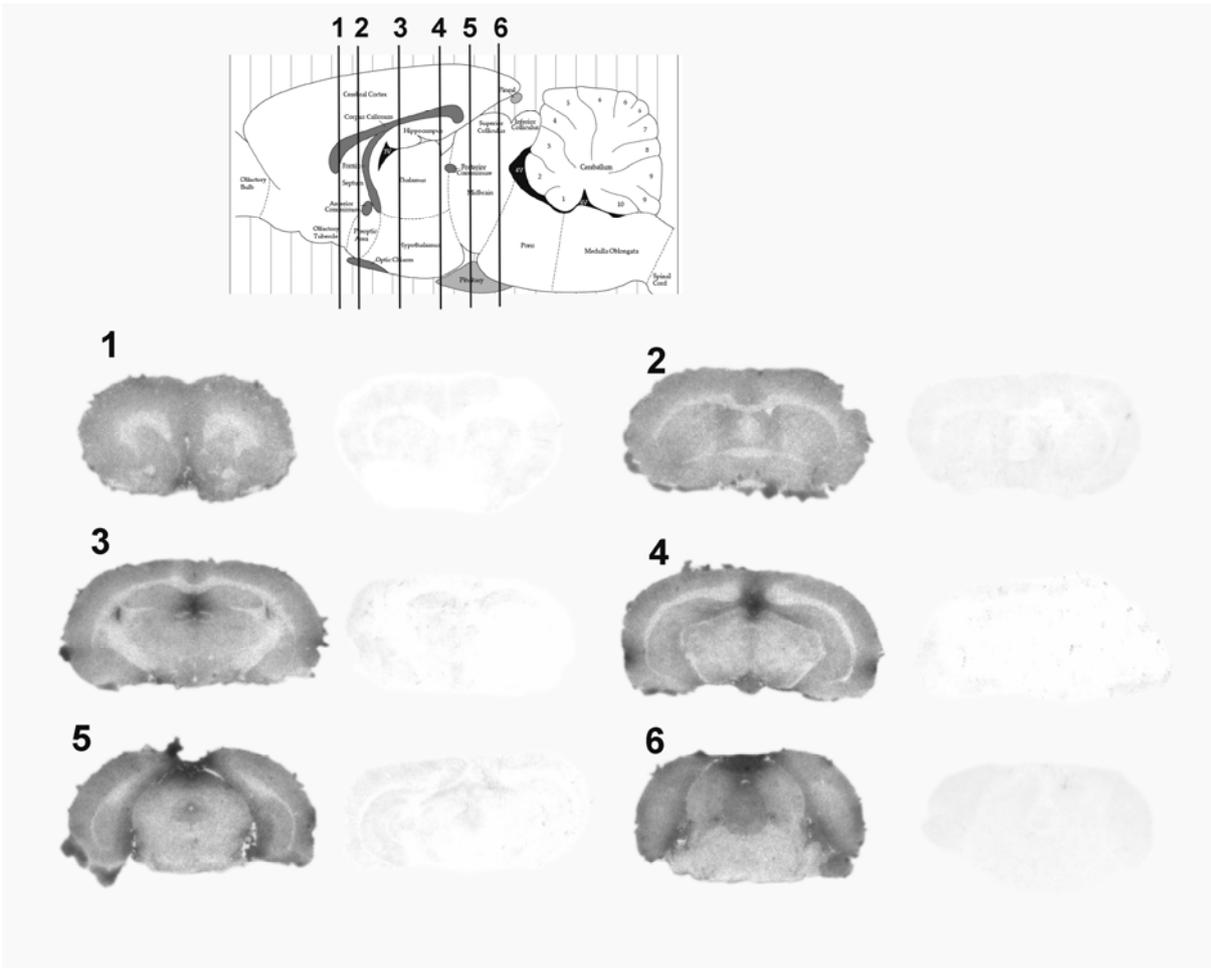


Figura 4-39. Autorradiogramas representativos de unión de E-2 tritiada tras la administración intravenosa.

DISCUSIÓN

5 DISCUSIÓN

5.1 Niveles del receptor glutamatérgico NMDA

Uno de los objetivos del presente trabajo de investigación ha sido estudiar los niveles del receptor NMDA glutamatérgico en las razas Fischer 344 y Lewis tanto en niveles basales como tras la autoadministración de morfina y durante la extinción de dicha conducta.

Los resultados basales coinciden con los de nuestro anterior estudio (Martín et al. 2003) en el sentido de que los animales lewis muestran un mayor nivel de NMDAR que los animales de la raza fischer en la mayoría de las estructuras estudiadas si bien estas diferencias solo son estadísticamente significativas en las áreas más posteriores del encéfalo (área del VTA y área del Rafe) de las analizadas en el presente estudio.

En este punto hemos de añadir el hecho de que los animales F344 tienen niveles basales de glutamato en el NAcc superiores a los animales LEW (Selim and Bradberry, 1996).

Tras 15 días de autoadministración de morfina los animales Lewis muestran un aumento en los niveles del receptor estudiado pero solo en las estructuras pertenecientes a la zona del Tálamo permaneciendo estables en el resto del encéfalo e incluso disminuyendo en alguna estructura. Por su parte las ratas Fischer muestran asimismo un aumento del receptor en numerosas estructuras de las áreas del Nac y del Tálamo permaneciendo estables en el resto del encéfalo.

En cuanto al periodo de extinción de la conducta de autoadministración de morfina nos encontramos con dos patrones bien distintos. Por un lado los animales de la cepa Lewis muestran una disminución mantenida de los niveles del receptor NMDA durante los 15 días que dura la extinción mientras que en los sujetos de la cepa Fischer se observa como en las zonas más anteriores de las estudiadas (NAc y Tálamo) los niveles del receptor NMDA disminuyen tras 7 días de extinción para volver a aumentar el día 15 de extinción. Sin embargo en el área de la VTA muestran un aumento progresivo de los

niveles del receptor que alcanza su máximo el día 15. Por último en la zona del Rafe el día 7 estos niveles se ven aumentados para disminuir el día 15.

Estas diferencias entre razas en la unión a los receptores NMDA no parecen correlacionar con el transcurso temporal de la conducta de extinción. En efecto, si se observa la curva de extinción puede comprobarse que ambas cepas extinguen de una manera muy similar pero, como ya se ha comentado, un patrón de disminución mantenida en la unión a receptores NMDA solo se observa en la cepa LEW, si bien esta disminución es estadísticamente significativa solamente en los últimos días de dicha extinción.

Dadas las características funcionales del receptor NMDA y del ligando que hemos empleado en estos experimentos, el MK-801, que se une al canal del receptor cuando el ión magnesio ha sido desplazado, podemos afirmar que hay diferencias en la transmisión glutamatérgica entre ambas razas. Esto es, una mayor unión del ligando MK-801 implica que más canales del receptor NMDA han estado abiertos con lo que la entrada de Na^+ y Ca^{2+} ha sido posible y, por tanto, una mayor probabilidad del aumento del disparo neuronal.

Mientras que la exposición aguda a morfina disminuye los niveles de glutamato extracelular en regiones como la corteza cerebral (Hao et al. 2005), el estriado dorsal (Enrico et al. 1998), el NAc (Martin et al 1999), el globo pálido y el pálido ventral (Huffman et al. 1989 and Johnson et al. 1997) y el hipocampo (Guo et al. 2005) pero no en el ATV (Ojanen et al. 2007) la exposición crónica puede producir tolerancia a este efecto e, incluso, podría acabar provocando una supersensibilidad neuronal al glutamato (Satoh et al. 1976; Fry et al. 1980). Por otra parte, la exposición crónica a morfina disminuye la recaptación de glutamato en FC, estriado e hipocampo (Ronnback et al 1983), así como la expresión en el estriado de EAAT2 (Ozawa et al 2001). También sabemos que se producen disminuciones en la unión de [3H] MK-801 o [3H] glutamato en varias regiones cerebrales tras la exposición repetida a la morfina (Gudehithlu et al. 1994; Bhargava et al. 1995) mientras que la unión aumenta en el hipocampo (Gudehithlu et al. 1996). Por otra parte la retirada de morfina ha sido descrita como un estado de hiperactividad glutamatérgica (Rasmussen, 2003).

Los resultados de nuestro estudio arrojan un aumento en el número de receptores NMDA glutamatérgicos tras 15 días de autoadministración de morfina en diversas estructuras en ambas cepas lo cual coincide con el estudio de Koyuncuoglu y colaboradores de 1999 y con el de Gudehithlu y colaboradores de 1996 pero difiere de el estudio de este último de 1994.

Estas diferencias en los resultados podrían deberse a las distintas metodologías empleadas. Koyuncuoglu y colaboradores utilizaron la vía subcutánea para administrar la morfina durante 9 días con una dosis de 3 mg/kg⁻¹ disuelto en 2.5 ml/kg⁻¹ de suero salino. Por otra parte utilizaron 3H glutamato y tejido cerebral homogeneizado (*binding*) para medir los niveles de unión del ligando a los receptores. Por su parte Gudehithlu y colaboradores utilizaron pellets de morfina (75 mg) subcutáneos durante un periodo de 7 días. Además utilizaron 3H MK 801 como ligando y homogeneizados de diferentes estructuras (*binding*) para medir la unión a los receptores.

En nuestro caso, utilizamos la técnica de la autoadministración intravenosa de morfina (1mg/kg) y la técnica de autorradiografía con 3H MK-801 como ligando.

Este aumento del número de receptores podría ser debido a un mecanismo compensatorio desplegado por el hecho de que uno de los efectos de la morfina es la disminución de los niveles de glutamato.

Por otra parte, en el día 7 de retirada observamos una disminución de la unión del ligando utilizado a los receptores NMDA en ambas cepas. Ello apunta al aumento de los niveles de glutamato que tiene lugar durante la retirada de la droga.

De este modo nos encontramos con que los animales de ambas cepas muestran, el último día de autoadministración de morfina niveles aumentados de NMDAR y que según Rasmussen, 2003 la retirada de esta droga implica un aumento de los niveles de glutamato. Ello se ajusta bien al patrón temporal característico de la retirada de morfina, asumiendo que la hiperactividad de estos receptores tenga una relación directa con el componente aversivo de la retirada de la droga. Apoya esta idea el hecho de que la administración de antagonistas NMDA como el MK-801 o el LY274614 tiene como consecuencia la reducción de algunos síntomas característicos del “síndrome de

abstinencia” producido por la brusca retirada de la droga tras su administración crónica (Rasmussen, 2003).

No obstante en las mediciones realizadas el día 15 tras la retirada de la morfina podemos observar que mientras que las ratas Lewis siguen mostrando dicha disminución en el número de receptores NMDA en los animales Fischer se puede apreciar una recuperación en el mismo.

Esta recuperación de los niveles de receptores NMDA en las ratas Fischer podría reflejar un componente plástico superior a las Lewis lo que podría traducirse en un menor riesgo de recaída al haber desaparecido el componente aversivo que implicaría altos niveles de glutamato circulante. Sin embargo los animales Lewis siguen mostrando una disminución en el número de NMDAR tras 15 días de retirada de la droga lo que podría estar debido a que aun existen altos niveles de glutamato. La posibilidad de que este hecho podría traducirse en una mayor propensión a las recaídas se ve apoyado por el hecho de que los animales LEW muestran mayor propensión que los F344 a volver a instaurar una respuesta a la metanfetamina tras una inyección de esta droga previamente extinguida así como una mayor sensibilidad a la recaída inducida por cocaína en comparación con los animales F344 (Kruzich and Xi, 2006 a, b). Así mismo en otro estudio de autoadministración llevado a cabo por nuestro grupo, esta vez de cocaína, se comprobó que inyecciones de cocaína indujeron una mayor tasa de presiones de palanca en animales LEW que en F344 (Miguéns et al, 2010).

El patrón de cambios neuroadaptativos durante la extinción en los receptores NMDA en todas las regiones cerebrales de nuestro estudio es similar al encontrado en el caso de los receptores mu-opioides, especialmente en el caso de la raza F344 (Sánchez-Cardoso et al 2007). En la cepa Lewis, sin embargo, en el día 15 de extinción se inicia una vuelta a los niveles del día 0 en el caso de los receptores mu-opioides y ello no ocurre en los de NMDA, como describimos en el presente trabajo. Si consideramos en conjunto ambos estudios estos resultados apuntan a que, en las primeras etapas de la abstinencia de opiáceos, elementos reguladores (como son sus receptores) de las transmisiones opioidérgica y glutamatérgica están afectados de un modo similar en ambas razas. Además, parece que los cambios en la transmisión glutamatérgica son más duraderos en la cepa lewis y por ello de posible mayor influencia que la opioidérgica en los efectos de

la abstinencia retardada. Esto sugiere, en última instancia, que en sujetos con una mayor susceptibilidad genética a los efectos reforzantes de los opiáceos un cambio neural con efectos sostenidos en el tiempo (la disminución de la transmisión glutamatérgica) puede ser un factor a considerar en las recaídas después de un muy apreciable tiempo de abstinencia.

A este respecto disponemos de fármacos antagonistas de los receptores NMDA que parecen prometedores en la clínica de la dependencia a opiáceos. Por ejemplo, existen estudios preliminares en los que se ha tratado la dependencia a opiáceos con sustancias como el dextrometorfano o la memantina tanto en la fase de desintoxicación como en la prevención de recaídas cuyos resultados son esperanzadores (Bisaga & Fischman, 2002).

5.2 Metabolismo cerebral de la glucosa

En este estudio hemos usado la técnica de la TEP registrando las imágenes obtenidas con imágenes de resonancia magnética con el objetivo de ganar precisión espacial a la hora de juzgar los resultados. Estos fueron analizados con el programa SPM para comparar las respuestas metabólicas en el cerebro a la autoadministración crónica de morfina en animales de las cepas F344 y LEW.

Al contrastar los niveles del metabolismo de la glucosa del grupo salino de animales Lewis con el grupo salino de animales F344 el día 0 obtenemos claras diferencias entre ambas cepas en el sentido de mayor metabolismo de la glucosa en las Lewis que en las F344. Esto sucede en las cortezas entorrinal y piririnal así como en una amplia zona que comprende estructuras como el hipotálamo, los cuerpos mamilares, el área tegmental ventral y el haz prosencefálico medial. Estas diferencias permanecen tras la autoadministración de morfina exceptuando las cortezas entorrinal y piririnal en cuyo caso disminuyen notablemente para iniciar cierta recuperación tras el período de extinción de la conducta de autoadministración.

Sin embargo, en ninguno del resto de contrastes llevados a cabo encontramos diferencias.

Es bien sabido que la morfina aguda disminuye el metabolismo de la glucosa en el cerebro tanto en humanos (London et al. 1990), como en ratas (Beck et al. 1989; Cohen et al. 1991). Sin embargo tras un tratamiento crónico de 15 días de duración no hemos encontrado diferencias en los contrastes realizados. La exposición repetida a morfina va generalmente acompañada del desarrollo de tolerancia y dependencia y, aunque los mecanismos exactos que subyacen a estos fenómenos no se conocen aún completamente, se cree que están relacionados con neuroadaptaciones inducidas por la droga. Es posible que algún mecanismo compensatorio sea responsable de dicha falta de resultados como ya ha sido sugerido en la literatura (Sharma et al. 2003). En concreto en este estudio se muestra que tras la administración aguda de morfina se produce un significativo decremento en los niveles de glicina y glutamato. Sin embargo, tras 7 días de administración estos niveles eran ligeramente superiores a los de los animales tratados de forma aguda. Por último, a un grupo se le administró naloxona para provocar los efectos de la retirada y mostraron niveles muy superiores a los registrados en la administración aguda lo que apunta a que la administración crónica de morfina puede haber puesto en marcha mecanismos compensatorios. En otro estudio (Gao et al 2007) se muestra que después de 10 días de administración de morfina los niveles de glutamato se vieron reducidos tanto en la corteza prefrontal (PFC) como en el hipocampo. También los niveles de GABA se vieron modificados: aumentaron en el PFC pero disminuyeron en el hipocampo. Sin embargo tras un periodo de 5 días de retirada de la droga todos los niveles medidos volvieron a sus valores iniciales. Teniendo en cuenta que en nuestro estudio el tratamiento crónico fue de 15 días es posible que esta compensación sea mayor y que incluso llegue a igualar los niveles respecto a los basales lo cual explicaría nuestros resultados.

El estudio de la actividad neural puede basarse en el metabolismo del cerebro cuantificando el consumo de glucosa. Los cambios en la tasa del metabolismo de la glucosa reflejan cambios en la neurotransmisión (Barros et al 2005) y es la neurotransmisión excitatoria la que más energía consume. La neurotransmisión inhibitoria consume mucho menos energía debido a su relativamente pequeño impacto en los gradientes iónicos (Barros y Deitmer, 2010). De esta manera las medidas que nos proporciona la técnica TEP utilizando FDG como radioligando nos están informando indirectamente de la transmisión glutamatérgica.

Por otra parte existen datos recientes en la literatura que indican que los animales LEW y los F344 muestran diferencias genéticas en la plasticidad sináptica en el hipocampo (Prakash et al 2009). En otro estudio se muestran diferencias en tareas de aprendizaje espacial indicando que los animales F344 son menos efectivas tanto en la ejecución de la tarea en el laberinto radial (*radial arm maze*) como en el test de Morris (*water maze*) que los animales LEW (van der Staay et al, 2009). En el mismo sentido en otro reciente estudio utilizando de nuevo el laberinto radial se muestra que también hay diferencias genéticas entre estas dos cepas en cuanto a la memoria y al aprendizaje espacial en el sentido de que los animales F344 cometen más errores y necesitan más tiempo para aprender la tarea (Fole et al 2011). Por otra parte, existe la hipótesis de que la adicción es un aprendizaje patológico en el que están implicados procesos neurales implicados en el aprendizaje relacionado con la recompensa que subyacen a la memoria asociativa a largo plazo (Nestler, 2004). Todo ello podría indicar que las ratas de la cepa LEW podrían tener una mayor capacidad de aprendizaje en comparación con las de la cepa F344.

Nuestros resultados muestran un mayor nivel del metabolismo de la glucosa en los animales LEW en áreas cerebrales como la corteza entorrinal que está íntimamente relacionada con la memoria y el aprendizaje y conecta el hipocampo con la neocorteza: de hecho, la corteza entorrinal es tanto la principal fuente de aferencias hacia el hipocampo como la principal vía de salida de este. (Kandel et al, 2000).

También obtenemos diferencias en la corteza perirrinal, implicada tanto en la percepción visual como en la memoria para objetos, contextos y eventos (Murray et al 2007; Eacott y Gaffan, 2005). Asimismo hemos encontrado diferencias en los cuerpos mamilares, implicados (junto a los núcleos anterior y dorsomedial del tálamo) en la memoria de reconocimiento (Aggleton et al 2010). También se encuentra entre el grupo de estructuras en las que hay diferencias significativas el ATV y el haz prosencefálico medial, estructuras que forman parte del sistema de recompensa (Wise, 2005).

5.3 Distribución de las endomorfinas y autoadministración de E-2

Con este trabajo hemos tratado de caracterizar la unión de los neuropéptidos opioides E-1 y E-2 en el encéfalo de ratas F344 y LEW así como comprobar si las ratas de la raza LEW, propensas a la autoadministración de drogas de abuso, tienden a autoadministrarse la E-2.

Los resultados apuntan a que la E-2 en la concentración de 3 nM se une a los receptores μ -opioides con alta afinidad en todas las regiones analizadas. Esta afinidad parece comparable a la del DAMGO, agonista selectivo de dichos receptores. También la distribución de los sitios de unión es similar a la observada para el DAMGO.

Sin embargo, en el caso de la E-1 con esta misma concentración los resultados no son tan claros. Por ejemplo en muchas de las regiones estudiadas el desplazamiento producido por E-1 fría (no marcada con tritio) no alcanza el 70% mientras que en el caso de la E-2 llega al 80% en la mayoría de las regiones. Además, nuestro grupo ha llevado a cabo un estudio (datos no publicados) en el que se realizó una curva de saturación con E-1 tritiada con las concentraciones 1, 2, 4, 6, 8 y 10 nM y utilizando E-1, DAMGO y naloxona para determinar las uniones inespecíficas. Los resultados de este trabajo apuntan a que la unión de la E-1 no es tan homogénea como la de la E-2 y que, incluso, parece que ambas endomorfinas podrían unirse de desigual manera a distintos receptores. De hecho existe literatura al respecto que apunta en esta dirección: por ejemplo, la analgesia inducida por E-1 no es revertida tras la administración de naloxonacina (un antagonista de los receptores μ_1 -opioides) pero sí lo es la inducida por E-2 (Sakurada et al, 1999). Además, ambas endomorfinas producen un efecto bifásico en la respiración en ratas, una breve depresión inicial seguida de un aumento de mayor duración. Mientras que el decremento en la tasa respiratoria está mediado por receptores opioides el incremento parece no estarlo ya que ni la naloxona ni la metilnaloxona revierten dicho efecto (Czapala et al. 2000) e incluso lo aumentan en el caso de la E-2 pero no en el caso de la E-1. Todo ello apunta al hecho de que la E-1 se une a receptores distintos a los que se une la E-2. Por otra parte ambas endomorfinas presentan cierta afinidad por un lugar de unión de reciente descubrimiento del fragmento SP1-7 de la sustancia P en el ATV. Dicha afinidad es cinco veces mayor en el ATV para la E-2 que para la E-1 (Botros et al. 2006).

Nuestros resultados apuntan también a que las dos endomorfinas se unen a distintos receptores. Como hemos comentado en el apartado de Resultados, el desplazamiento producido por la E-1 fría es distinto, menor, que el producido por la E-2 fría. Por este motivo decidimos utilizar la E-2 en nuestro estudio sobre autoadministración. A este respecto nuestros resultados muestran que los animales LEW, que adquieren la conducta de autoadministración de diversas drogas de abuso con mayor facilidad que los F344, no adquirieron dicha conducta utilizando las concentraciones 100, 600 o 1200 nM. Sin embargo, con la concentración 2400 nM se aprecian diferencias respecto al resto de concentraciones. Estas concentraciones se eligieron teniendo en cuenta un estudio de Czaplá y colaboradores sobre los efectos cardiorrespiratorios de las endomorfinas del DAMGO y de la morfina (Czaplá et al 2000). El análisis estadístico en el que se comparaban los últimos 5 días de la fase de autoadministración con los últimos 5 de la de extinción arroja diferencias significativas solo en esta concentración. Por otra parte al comparar el efecto del factor entre grupos “dosis” y realizar los análisis pertinentes también hallamos diferencias entre los grupos 100 y 600 nM y 100 y 2400 nM.

Diversos estudios han abordado la posibilidad de que las endomorfinas sean reforzantes tanto en ratones como en ratas arrojando resultados contradictorios. Algunos de estos estudios se llevaron a cabo mediante el procedimiento de la administración intracerebroventricular (i.c.v.). Por ejemplo, en dos estudios con ratones se informó de que la E-1 producía condicionamiento de lugar mientras que la E-2 producía aversión al lugar (Narita et al 2001a, b). Esta aversión era inhibida cuando se pretrataba al animal con un antisuero dirigido a la dinorfina, agonista endógeno del receptor κ -opioide, y cuando se coadministraba un antagonista de este receptor (Wu et al 2004). También los resultados en ratas empleando la administración i.c.v. son contradictorios. En el primer estudio llevado a cabo no se encontraron efectos reforzantes con el paradigma del condicionamiento de lugar incluso con dosis que claramente producían antinocepción (Wilson et al 2000). En otro estudio sobre la relación dosis-efecto se encontró que con una dosis baja (15 μ g) no se logró el condicionamiento de lugar mientras que con una dosis alta (30 μ g) los resultados fueron distintos en ambas endomorfinas: mientras que la E-1 produjo una severa alteración motora (*barrel rotation of the body trunk*) la E-2 indujo preferencia de lugar (Huang et al 2004). Otro estudio abordó si las endomorfinas producían preferencia de lugar pero esta vez inyectando las sustancias en el ATV

posterior, una región cerebral crítica para los efectos de los opiáceos, y en Nac, uno de los principales componentes del circuito de recompensa (Zangen et al 2002). Ambas endomorfina inyectadas en el ATV posterior dieron como resultado la preferencia condicionada al lugar así como efectos psicomotores estimulantes, del mismo modo que lo hacen la morfina y el DAMGO. Además, la E-1 inyectada en esta estructura cerebral produjo claros efectos reforzantes utilizando el paradigma de autoadministración. Sin embargo ni la administración de E-1 ni la de DAMGO en el Nac produjeron ningún efecto reforzante (Zangen et al 2002).

Por lo que sabemos, nuestro estudio es el primero en utilizar la técnica de la autoadministración intravenosa con las endomorfina. Esta técnica le confiere a nuestro estudio una mayor validez en cuanto que se trata de una manera sistémica de administrar la sustancia.

Si analizamos en conjunto todos estos datos podemos decir que la autoadministración crónica de morfina produce cambios neuroadaptativos en elementos reguladores del sistema glutamatérgico, como es el caso de los receptores NMDA, en diferentes regiones cerebrales. Dichos cambios pueden ser distintos en función del genotipo del sujeto y, concretamente, en el caso de sujetos vulnerables pueden conllevar reducciones mantenidas en el tiempo de los niveles de dichos receptores que, hipotéticamente, podrían participar en una mayor facilidad para las recaídas. También que los sujetos vulnerables, en comparación con los más resistentes, parecen tener una mayor activación cerebral basal, diferencia que se mantiene durante la autoadministración de morfina, aunque esté más reducida y que no parece ser muy duradera porque se inicia una recuperación hacia los niveles basales después de 15 días de ausencia de la droga. Finalmente, parte de las acciones reforzantes positivas de los opiáceos pueden ser mediadas por el péptido endógeno endomorfina-2 a través de su unión a sus receptores E-2 centrales, los cuales tienen una distribución cerebral muy similar a la de agonistas sintéticos específicos de los receptores mu-opioides.

CONCLUSIONES

6 CONCLUSIONES

1. Existen diferencias significativas entre las razas Fischer 344 y Lewis en los niveles de receptores NMDA glutamatérgicos tanto a nivel basal como durante la extinción de la conducta de autoadministración de morfina. Los animales LEW muestran una disminución mantenida desde el último día de autoadministración hasta el día 15 de extinción. Los animales F344, por el contrario, muestran un descenso el día 7 y el inicio de la recuperación el día 15.

2. Existen diferencias significativas entre las razas Fischer 344 y Lewis en el metabolismo cerebral de la glucosa. Estas diferencias son evidentes al comparar los dos grupos salino tanto el día 0 como el día 15 tanto en la corteza como en el área subtalámica.

3. Si bien las distribuciones anatómicas tanto de la endomorfina-1 como de la endomorfina-2 coinciden en general con la distribución anatómica del DAMGO se observa que esta última se une a sus receptores de manera más específica.

4. Los animales de la cepa Lewis se autoadministran endomorfina-2 a concentraciones altas lo cual sugiere que parte de las acciones reforzantes positivas de los opiáceos pueden ser mediadas por el péptido endógeno endomorfina-2 a través de la unión a sus receptores E-2 cerebrales.

REFERENCIAS

7 REFERENCIAS

Abella M, Vaquero JJ, Soto-Montenegro ML, Lage E, Desco M. (2009). Sinogram bow-tie filtering in FBP PET reconstruction. *Med Phys.* 2009 May; 36(5):1663-71.

Aggleton JP, O'Mara SM, Vann SD, Wright NF, Tsanov M, Erichsen JT. (2010). Hippocampal-anterior thalamic pathways for memory: uncovering a network of direct and indirect actions. *Eur J Neurosci.* Jun;31(12):2292-307.

Agranoff BW, Frey KA.(1984). A regional metabolic contrast method for the study of brain pathology. *Ann Neurol.*;15 Suppl:S93-7.

Akil, H., Bronstein, D. y Mansour, A. (1988). Overview of the endogenous opioid systems : Anatomical, biochemical and functional issues. En Rodgers, R.J. y Cooper, S.J. (Eds) *Endorphins, Opiates and Behavioural Processes*, páginas 1-23. Wiley, Nueva York.

Albin RL, Makowiec RL, Hollingsworth ZR, Dure LS 4th, Penney JB, Young AB. (1992). Excitatory amino acid binding sites in the basal ganglia of the rat: a quantitative autoradiographic study. *Neuroscience.*46(1):35-48.

Alt A, Mansour A, Akil H, Medzihradsky F, Traynor JR, Woods JH. (1998) Stimulation of guanosine-5'-O-(3-[³⁵S]thio)triphosphate binding by endogenous opioids acting at a cloned mu receptor. *J Pharmacol Exp Ther.* Jul;286(1):282-8.

Ambrosio, E., Goldberg, S.R. y Elmer, G.I., (1995). Behavior genetic investigation of the relationship between spontaneous locomotor activity and the acquisition of morphine self-administration behavior. *Behavioural Pharmacology* Vol 6 páginas 229-237.

Antón B, Martínez I, Calva JC et al.(1998) Immunohistochemistry for Endomorphins in the rat CNS. *Neurosci Abstr*; 24[1], 851.

Ariano MA, Sibley DR.(1994).Dopamine receptor distribution in the rat CNS: elucidation using anti-peptide antisera directed against D1A and D3 subtypes. *Brain Res.* 27;649(1-2):95-110.

Arun KS, Huang TS, Blostein SD. (1987). Least-squares fitting of two 3-D point sets. *IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence*, vol 9, sup 5, pp 698-700.

Barres B.A. (1991). New roles for glia. *J Neurosci.* Dec; 11(12):3685-94.

Barros LF, Porrás OH, Bittner CX. (2005). Why glucose transport in the brain matters for PET. *Trends Neurosci.* Mar;28(3):117-9.

Barros LF, Deitmer JW. (2010). Glucose and lactate supply to the synapse. *Brain Res Rev.* May;63(1-2):149-59.

Bear MF, Malenka RC. (1994). Synaptic plasticity: LTP and LTD. *Curr Opin Neurobiol.* 1994 Jun;4(3):389-99.

Beitner-Johnson, D., Guitart, X. y Nestler, E.J., (1991). Dopaminergic brain reward regions of Lewis and Fischer rats display different levels of tyrosine hydroxylase and other morphine- and cocaine-regulated phosphoproteins. *Brain Research* Vol 561 páginas 146-149.

Bell, S.M., Macenski, M.J., Silverman, P.B. Y Meisch, R.A., (1993). Water deprivation-induced oral self-administration of cocaine in the Lewis rat: evidence for locomotor effects but not reinforcement. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior* Vol 45 páginas 749-754.

Bhargava HN, Reddy PL, Gudehithlu KP. (1995). Down-regulation of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors of brain regions and spinal cord of rats treated chronically with morphine. *Gen Pharmacol.* Jan;26(1):131-6.

Birnbaum MJ, Haspel HC, Rosen OM. (1986). Cloning and characterization of a cDNA encoding the rat brain glucose-transporter protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Aug;83(16):5784-8.

Bisaga A, Fischman MW. (2002). Clinical studies using NMDA receptor antagonists in cocaine and opioid dependence. In: Herman BH, editor. *Glutamate and Addiction*. New Jersey: Humana Press; p.261-70.

Bliss TV, Lomo T. (1973). Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol*. Jul;232(2):331-56.

Bochet, P., Audinat, E., Lambolez, B., Crèpel, F., Rossier, J., Iino, M., Tsuzuki, K., y Ozawa, S. (1994). Subunit composition at the single-cell level explains functional properties of a glutamate-gated channel. *Neuron*, 12, 383-388.

Böhm SK, Grady EF, Bunnett NW. (1997) Regulatory mechanisms that modulate signalling by G-protein-coupled receptors. *Biochem J*. Feb 15;322 (Pt 1):1-18.

Bonci, A. y Malenka, R. C. (1999). Properties and plasticity of excitatory synapses on dopaminergic and GABAergic cells in the ventral tegmental area. *J. Neurosci*. 19, 3723-3730.

Bonci, A., Bernardi, G., Grillner, P. y Mercuri, N. B. (2003). The dopamine-containing neuron: maestro or simple musician in the orchestra of addiction? *Trends Pharmacol Sci*. 24, 172-177.

Bondy CA, Lee WH, Zhou J. (1992). Ontogeny and cellular distribution of brain glucose transporter gene expression. *Mol Cell Neurosci*. Aug;3(4):305-14.

Botros M, Johansson T, Zhou Q, Lindeberg G, Tömböly C, Tóth G, Le Grevès P, Nyberg F, Hallberg M. (2006). Endomorphins interact with the substance P (SP)

aminoterminal SP(1-7) binding in the ventral tegmental area of the rat brain. *Peptides*. 29(10):1820-4.

Bowman CL, Kimelberg HK. (1984). Excitatory amino acids directly depolarize rat brain astrocytes in primary culture. *Nature*. Oct 18-24;311(5987):656-9.

Brodkin, E.S. Carlezon, W.A., Haile, C.N., Kosten, T.A., Heninger, G.R. y Nestler, E. J., (1998). Genetic analysis of behavioral, neuroendocrine, and biochemical parameters in inbred rodents: initial studies in Lewis and Fischer 344 rats and in A/J and C57BL/6J mice. *Brain Research Vol 805* páginas 55-68.

Broman, J., Anderson, S. y Ottersen, O. P. (1993). Enrichment of glutamate-like immunoreactivity in primary afferent terminals throughout the spinal cord dorsal horn. *Eur. J. Neurosci.*, 5, 1050-1061.

Cadoni C, Di Chiara G. (2007). Differences in dopamine responsiveness to drugs of abuse in the nucleus accumbens shell and core of Lewis and Fischer 344 rats. *J Neurochem*. Oct;103(2):487-99. Epub 2007 Jul 31.

Calabresi, P., Centonze, D. y Bernardi, G. (2000). Electrophysiology of dopamine in normal and denervated striatal neurons. *Trends Neurosci*. 23,S57-63.

Camí, J y Barrio, G. (1992). Drug consumption in Spain: trends, implications and policies. Conference on American and European drug policies: comparative perspectives. Washington D.C. Rand Corporation.

Camp, D.M., Browman, K.E. y Robinson, T.E., (1994). The effects of methamphetamine and cocaine on motor behavior and extracellular dopamine in the ventral striatum of Lewis versus Fischer 344 rats. *Brain Research Vol 668* páginas 180-193

Camps M, Kelly PH, Palacios JM. (1990). Autoradiographic localization of dopamine D 1 and D 2 receptors in the brain of several mammalian species. *J Neural Transm Gen Sect*.80(2):105-27.

Cardinal, R.N., Everitt, B. J. (2004). Neural and psychological mechanisms underlying appetitive learning: links to drug addiction. *Curr. Opin. Neurobiol.* 14, 156-162.

Carlezon, W. A. y Nestler, E. J. (2002). Elevated levels of GluR1 in the midbrain: a trigger for sensitization for drugs of abuse? *Trends Neurosci.* 25, 610-615.

Carr, G.D., Fibiger, H.C. Y Phillips, A.G., (1989). Conditioned place preference as a measure of drug reward. In: J. Liebman and S. Cooper (Editors), *The Neuropharmacological Basis of Reward*. Oxford University Press, New York, pp. 264-319.

Carroll, R. C., Beattie, E. C., Von Zastrow, M. y Malenka, R. C. (2001). Role of AMPA receptor endocytosis in synaptic plasticity. *Nature Rev. Neurosci.* 2, 315-324.

Chaouloff, F., Kulikov, A., Sarrieau, A., Castanon, N. Y Mormede, P., (1995). Male Fischer 344 and Lewis rats display differences in locomotor reactivity, but not in anxiety-related behaviours: relationship with the hippocampal serotonergic system. *Brain Research Vol 693 páginas 169-178.*

Chaudhry FA, Lehre KP, van Lookeren Campagne M, Ottersen OP, Danbolt NC, Storm-Mathisen J. (1995). Glutamate transporters in glial plasma membranes: highly differentiated localizations revealed by quantitative ultrastructural immunocytochemistry. *Neuron. Sep;15(3):711-20.*

Chen G, Greengard P, Yan Z. (2004). Potentiation of NMDA receptor currents by dopamine D1 receptors in prefrontal cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 24;101(8):2596-600.

Chen JC, Tao PL, Li JY, Wong CH, Huang EY. (2003) Endomorphin-1 and -2 induce naloxone-precipitated withdrawal syndromes in rats. *Peptides. Mar;24(3):477-81.*

Chergui K, Lacey MG. (1999). Modulation by dopamine D1-like receptors of synaptic transmission and NMDA receptors in rat nucleus accumbens is attenuated by the protein kinase C inhibitor Ro 32-0432. *Neuropharmacology.*38(2):223-31.

Childers, S.R. (1993). Opioid receptor-coupled second messenger systems. En A.Herz (Ed). Opioids I, Handbook of experimental Pharmacology, Vol 104. Springer-Verlag. Nueva York.

Colpaert, F.C., (1978). Discriminative stimulus properties of narcotic analgesic drugs. Pharmacology, Biochemistry and Behavior, Vol 9 páginas 863-887.

Comas, D. (1985). El uso de drogas en la juventud. Madrid. Ministerio de Cultura.

Comb M, Seeburg PH, Adelman J, Eiden L, Herbert E. (1982) Primary structure of the human Met- and Leu-enkephalin precursor and its mRNA. Nature. Feb 25;295(5851):663-6.

Cooper, J. R., Bloom, F. E. y Roth, R. H. (2003). The Biochemical Basis of Neuropharmacology. 8th Edition. Oxford University Press. New York.

Cotman, C. W., J. S., Kahle, S. E. Miller, J. Ulas, y R. J. Bridges (1995). Excitatory amino acid neurotransmission. In Psychopharmacology: The Fourth Generation of Progress (F. E. Bloom y D. J. Kupfer, eds.). Raven Press, New York, pp. 75-85.

Crespo JA, Oliva JM, Ghasemzadeh MB, Kalivas PW, Ambrosio E. (2002). Neuroadaptive changes in NMDAR1 gene expression after extinction of cocaine self-administration. Ann N Y Acad Sci.965:78-91.

Cuzner ML, Davison AN. (1968). The lipid composition of rat brain myelin and subcellular fractions during development. Biochem J. Jan;106(1):29-34.

Czapla MA, Gozal D, Alea OA, Beckerman RC, Zadina JE (2000). Differential cardiorespiratory effects of endomorphin 1, endomorphin 2, DAMGO, and morphine. Am J Respir Crit Care Med.162(3 Pt 1):994-9.

De la Fuente, L. et al. (1995). The impact of drug-related deaths on mortality among young adults in Madrid. *American Journal of Public Health*. 85, 102-105.

Defer N, Best-Belpomme M, Hanoune J. Defer N, Best-Belpomme M, Hanoune J. (2000) Tissue specificity and physiological relevance of various isoforms of adenylyl cyclase. *Am J Physiol Renal Physiol*. Sep;279(3):F400-16.

DGPND (Delegación del Gobierno para el Plan Nacional Sobre Drogas). (1994). Plan Nacional Sobre Drogas. Memoria 93. Madrid.

Dhabhar FS, McEwen BS, Spencer RL. (1993). Stress response, adrenal steroid receptor levels and corticosteroid-binding globulin levels--a comparison between Sprague-Dawley, Fischer 344 and Lewis rats. *Brain Res*. Jul 9;616(1-2):89-98.

Di Ciano, P. y Everitt, B. J. (2004). Contribution of the ventral tegmental area to cocaine-seeking maintained by a drug-paired conditioned stimulus in rats. *Eur. J. Neurosci*. 19, 1661-1667.

Doyere V, Laroche S. (1992). Linear relationship between the maintenance of hippocampal long-term potentiation and retention of an associative memory *Hippocampus*. Jan;2(1):39-48.

Dumont M, Lemaire S. (1994). Dynorphin potentiation of [3H]CGP-39653 binding to rat brain membranes. *Eur J Pharmacol*. 271(1):241-4.

Dunah AW, Standaert DG. (2001). Dopamine D1 receptor-dependent trafficking of striatal NMDA glutamate receptors to the postsynaptic membrane. *J Neurosci*. 1;21(15):5546-58.

Dunah AW, Sirianni AC, Fienberg AA, Bastia E, Schwarzschild MA, Standaert DG. (2004). Dopamine D1-dependent trafficking of striatal N-methyl-D-aspartate glutamate receptors requires Fyn protein tyrosine kinase but not DARPP-32. *Mol Pharmacol*. 65(1):121-9.

Eacott MJ, Gaffan EA. The roles of perirhinal cortex, postrhinal cortex, and the fornix in memory for objects, contexts, and events in the rat. *Q J Exp Psychol B*. Jul-Oct;58(3-4):202-17.

Edvinsson L, Krause DN. (Eds). *Cerebral blood flow and metabolism*. Lippincott Williams-Wilkins. Philadelphia. 2002: 423-51.

Egleton RD, Abbruscato TJ, Thomas SA, Davis TP. (1998).Transport of opioid peptides into the central nervous system. *J Pharm Sci*. Nov; 87(11):1433-9.

Elde, R. Y Hokfelt, T. (1993).Coexistence of opioide peptide with other neurotransmitters. En Herz, A. (Ed) *Opioids I, Handbook of Experimental Pharmacology*, Vol 104, páginas 585-624. Springer-Verlag, Nueva York.

Enrico P, Mura MA, Esposito G, Serra P, Migheli R, De Natale G, Desole MS, Miele M, Miele E. (1998).Effect of naloxone on morphine-induced changes in striatal dopamine metabolism and glutamate, ascorbic acid and uric acid release in freely moving rats. *Brain Res*. Jun 22;797(1):94-102.

Erecińska M. (1989).Stimulation of the Na⁺/K⁺ pump activity during electrogenic uptake of acidic amino acid transmitters by rat brain synaptosomes. *J Neurochem*. Jan;52(1):135-9.

Everitt, B. J. y Wolf, M. E. (2002). Psychomotor stimulant addiction: a neural systems perspective. *J. Neurosci*. 22, 3312-3320.

Faleiro, L. J., Jones S. y Kauer, J. A. (2004). Rapid synaptic plasaticity of glutamatergic synapses on dopamine neurons in the ventral tegmental area in response to acute amphetamine injection. *Neuropsychopharmacology*. 29(12):2115-25.

Fan GH, Wang LZ, Qiu HC, Ma L, Pei G. (1999). Inhibition of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II in rat hippocampus attenuates morphine tolerance and dependence. *Mol Pharmacol.*56(1):39-45.

Feldman, R. S., Meyer, J. S. y Quenzer, L, F. (1997). *Principles of Neuropsychopharmacology*. Sinauer Associates. Sunderland, MA.

Fellows LK, Boutelle MG, Fillenz M. (1992). Extracellular brain glucose levels reflect local neuronal activity: a microdialysis study in awake, freely moving rats. *J Neurochem.* Dec;59(6):2141-7.

Fichna J, Janecka A, Costentin J, Do Rego JC. (2007).The endomorphin system and its evolving neurophysiological role. *Pharmacol Rev.* Mar;59(1):88-123.

Fields H.L. and Basbaum A.I. (1994). Central nervous system mechanisms of pain modulation, in *Textbook of Pain* (Wall PD and Melzack R eds) pp 243–257, Churchill Livingstone, New York.

Fiorentini C, Missale C. (2004). Oligomeric assembly of dopamine D1 and glutamate NMDA receptors: molecular mechanisms and functional implications. *Biochem Soc Trans.*32(Pt 6):1025-8

Flores G, Valencia J, Rosales MG, Sierra A, Aceves J. (1993). Appearance of EMG activity and motor asymmetry after unilateral lesions of the dopaminergic innervation to the subthalamic nucleus in the rat. *Neurosci Lett.* Nov 12;162(1-2):153-6.

Flores, G., Wood, G.K., Barbeau, D., Quirion, R. y Srivastava, L.K., (1998). Lewis and Fischer rats: a comparison of dopamine transporter and receptors levels. *Brain Research* Vol 814 páginas 34-40.

Flores-Hernandez J, Cepeda C, Hernandez-Echeagaray E, Calvert CR, Jokel ES, Fienberg AA, Greengard P, Levine MS. (2002). Dopamine enhancement of NMDA currents in dissociated medium-sized striatal neurons: role of D1 receptors and DARPP-32. *J Neurophysiol.*;88(6):3010-20.

Flórez, J. (2004). *Farmacología Humana*. Masson, Madrid

Fole A, González-Martín C, Huarte C, Alguacil LF, Ambrosio E, Olmo ND. (2011). Effects of chronic cocaine administration on spatial learning and hippocampal spine density in two genetically different strains of rats. *Neurobiol Learn Mem.* May;95(4):491-7.

Fonnum, F. (1984). Glutamate: A neurotransmitter in mammalian brain. *J. Neurochem.*, 42, 1-11.

Fox PT, Raichle ME. (1986). Focal physiological uncoupling of cerebral blood flow and oxidative metabolism during somatosensory stimulation in human subjects. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Feb;83(4):1140-4.

Fox PT, Raichle ME, Mintun MA, Dence C. (1988). Nonoxidative glucose consumption during focal physiologic neural activity. *Science.* Jul 22;241(4864):462-4.

Frackowiak RS, Lenzi GL, Jones T, Heather JD. (1980). Quantitative measurement of regional cerebral blood flow and oxygen metabolism in man using ¹⁵O and positron emission tomography: theory, procedure, and normal values. *J Comput Assist Tomogr.* 1980 Dec;4(6):727-36.

Fry JP, Herz A, Zieglgänsberger W. (1980). A demonstration of naloxone-precipitated opiate withdrawal on single neurones in the morphine-tolerant/dependent rat brain. *Br J Pharmacol.* Mar;68(3):585-92.

Fujita T, Kumamoto E. (2006). Inhibition by endomorphin-1 and endomorphin-2 of excitatory transmission in adult rat substantia gelatinosa neurons. *Neuroscience.* 139(3):1095-105.

Funes, J y Romaní, O. (1985). *Dejar la heroína*. Cuadernos técnicos de toxicomanías 6. Dirección General de Acción Social. Madrid.

- Gamella, J. F. (1991). La lógica de lo endovenoso. Claves de razón práctica 72-80.
- Gass JT, Olive MF. (2008). Glutamatergic substrates of drug addiction and alcoholism. *Biochem Pharmacol.* Jan 1;75(1):218-65. Epub 2007 Jun 30.
- Geisler S, Derst C, Veh RW, Zahm DS. (2007). Glutamatergic afferents of the ventral tegmental area in the rat. *J Neurosci.* May 23;27(21):5730-43.
- George FR, Goldberg SR. (1988). Genetic differences in responses to cocaine. *NIDA Res Monogr.*;88:239-49.
- George, F.R. y Goldberg, S.R., (1989). Genetic approaches to the analysis of addiction processes. *Trends in Pharmacological Science* Vol 10 páginas 78-83.
- George, F.R., Porrino, L.J., Ritz, M.C. Y Goldberg, S.R., (1991). Inbred rat strain comparisons indicate different sites of action for cocaine and amphetamine locomotor stimulant effects. *Psychopharmacology* Vol 104 páginas 457-462.
- Gerdeman, G. L., Ronesi, J. y Lovinger, D. M. (2002). Postsynaptic endocannabinoid release is critical to long-term depression in the striatum. *Nature Neurosci.* 5, 446-451.
- Gerdeman, G. L., Partridge, J. G, Lupica, C. R., Lovinger, D. M. (2003). It could be habit forming: drugs of abuse and striatal synaptic plasticity. *Trends. Neurosci.* 26, 184-192.
- Girard J, Ferré P, Pégorier JP, Duée PH. (1992). Adaptations of glucose and fatty acid metabolism during perinatal period and suckling-weaning transition. *Physiol Rev.* Apr;72(2):507-62.
- Glowa, J.R. y Hansen, C.T., (1994). Differences in response to an acoustic startle stimulus among forty-six rat strains. *Behavior Genetics* Vol 24 páginas 79-84.
- Goldman D, Oroszi G, Ducci F. (2008). Genetic approaches to addiction: genes and alcohol. *Addiction.* Sep;103(9):1414-28. Epub 2008 Apr 16.

Goldstein A, Tachibana S, Lowney LI, Hunkapiller M, Hood L. (1979). Dynorphin-(1-13), an extraordinarily potent opioid peptide. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. Vol 76(12) páginas 6666-6670.

Goldstein, A. y Ghazarossian, V.E. (1980). Immunoreactive dynorphin in pituitary and brain. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. Vol 77(10) páginas 6207-6210.

González Duro, E. (1979). Consumo de drogas en España, Madrid, Villalar.

Gracy KN, Svingos AL, Pickel VM. (1977). Dual ultrastructural localization of mu-opioid receptors and NMDA-type glutamate receptors in the shell of the rat nucleus accumbens. J Neurosci. 17(12):4839-48.

Gracy KN, Pickel VM. (1996). Ultrastructural immunocytochemical localization of the N-methyl-D-aspartate receptor and tyrosine hydroxylase in the shell of the rat nucleus accumbens. Brain Res.739(1-2):169-81.

Grakalic I, Schindler CW, Baumann MH, Rice KC, Riley AL. (2006). Effects of stress modulation on morphine-induced conditioned place preferences and plasma corticosterone levels in Fischer, Lewis, and Sprague-Dawley rat strains. Psychopharmacology (Berl). Dec;189(3):277-86. Epub 2006 Oct 3.

Grass S, Xu IS, Wiesenfeld-Hallin Z, Xu XJ. (2002). Comparison of the effect of intrathecal endomorphin-1 and endomorphin-2 on spinal cord excitability in rats. Neurosci Lett. May 24; 324(3):197-200.

Greenamyre JT, Olson JM, Penney JB Jr, Young AB. (1985). Autoradiographic characterization of N-methyl-D-aspartate-, quisqualate- and kainate-sensitive glutamate binding sites. J Pharmacol Exp Ther. 1985 Apr;233(1):254-63.

Grigson, P.S. y Freet, C.S., 2000. The suppressive effects of sucrose and cocaine, but not lithium chloride, are greater in Lewis than in Fischer rats: evidence for the reward comparison hypothesis. *Behavioral Neuroscience* 114, 353-363.

Groenewegen HJ, Galis-de Graaf Y, Smeets WJ. (1999). Integration and segregation of limbic cortico-striatal loops at the thalamic level: an experimental tracing study in rats. *J Chem Neuroanat.* May;16(3):167-85.

Gudehithlu KP, Reddy PL, Bhargava HN. (1994). Effect of morphine tolerance and abstinence on the binding of [3H]MK-801 to brain regions and spinal cord of the rat. *Brain Res.* Mar 14;639(2):269-74.

Gudehithlu KP, Bhargava HN. (1996). Differential binding of [3H]MK-801 to brain regions and spinal cord of mice treated chronically with morphine. *Gen Pharmacol.* Jan;27(1):91-4.

Guitart, X., Beitner-Johnson, D., Marby, D.W., Kosten, T.A. y Nestler, E.J., (1992). Fischer and Lewis rat strains differ in basal levels of neurofilament proteins and their regulation by chronic morphine in the mesolimbic dopamine system. *Synapse* Vol 12 páginas 242-253.

Guitart, X., Kogan, J.H., Berhow, M., Terwilliger, R.Z., Aghajanian, G.K. y Nestler, E.J., (1993). Lewis and Fischer rat strains display differences in biochemical, electrophysiological and behavioral parameters: studies in the nucleus accumbens and locus coeruleus of drug naive and morphine-treated animals. *Brain Research* Vol 611 páginas 7-17.

Guo M, Xu NJ, Li YT, Yang JY, Wu CF, Pei G. (2005). Morphine modulates glutamate release in the hippocampal CA1 area in mice. *Neurosci Lett.* Jun 10-17;381(1-2):12-5.

Gurden H, Takita M, Jay TM. (2000). Essential role of D1 but not D2 receptors in the NMDA receptor-dependent long-term potentiation at hippocampal-prefrontal cortex synapses in vivo. *J Neurosci.*20(22):RC106.

Gutlerner, J. L., Penick, E. C., Snyder, E. M. y Kauer, J. A. (2002). Novel protein kinase A-dependent long-term depression of excitatory synapses. *Neuron*. 36, 921-931.

Haile, C.N. y Kosten, T.A., (2000). Differential effects of D1- and D2-like compounds on the discriminative stimulus and reinforcing effects of cocaine in Lewis and Fischer rats. *College on Problems of Drug Dependence*.

Haile CN, Hiroi N, Nestler EJ, Kosten TA. (2001). Differential behavioral responses to cocaine are associated with dynamics of mesolimbic dopamine proteins in Lewis and Fischer 344 rats. *Synapse*. Sep 1;41(3):179-90.

Haile CN, Kosten TA. (2001). Differential effects of D1- and D2-like compounds on cocaine self-administration in Lewis and Fischer 344 inbred rats. *J Pharmacol Exp Ther*. Nov;299(2):509-18.

Haile CN, Kosten TR, Kosten TA. (2007). Genetics of dopamine and its contribution to cocaine addiction. *Behav Genet*. Jan;37(1):119-45. Epub 2006 Oct 25.

Hamberger, A., Chiang, G. H., Nylén, E. S., Scheff, S. W., y Cotman, C. W. (1979). Glutamate as a CNS transmitter. I. Evaluation of glucose and glutamine as precursors for the synthesis of preferentially released glutamate. *Brain Res.*, 168, 513-530.

Hamdy MM, Noda Y, Miyazaki M, Mamiya T, Nozaki A, Nitta A, Sayed M, Assi AA, Gomaa A, Nabeshima T. (2004). Molecular mechanisms in dizocilpine-induced attenuation of development of morphine dependence: an association with cortical Ca²⁺/calmodulin-dependent signal cascade. *Behav Brain Res*.152(2):263-70.

Hao Y, Yang JY, Guo M, Wu CF, Wu MF. (2005). Morphine decreases extracellular levels of glutamate in the anterior cingulate cortex: an in vivo microdialysis study in freely moving rats. *Brain Res*. Apr 8;1040(1-2):191-6.

Hartnoll, R. et al. (1985). *Drug problems: assessing local needs*. London. Drug Indicators Project. University of London

Harris, G. C. y Ashton-Jones, G. (2003). Critical role for ventral tegmental glutamate in preference for a cocaine-conditioned environment. *Neuropsychopharmacology*. 28, 73-76.

Hebb, D. (1949). *The organization of behaviour*. John Wiley & Sons. New York.

Heffner, T.G., Hartman, J.A. y Seiden, L.S., (1980). Feeding increases dopamine metabolism in the rat brain. *Science* Vol 208 páginas 1168-1170.

Heimer L, Alheid GF, de Olmos JS, Groenewegen HJ, Haber SN, Harlan RE, Zahm DS. (1997). The accumbens: beyond the core-shell dichotomy. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci*. Summer;9(3):354-81.

Heyne A, May T, Goll P, Wolffgramm J. (2000). Persisting consequences of drug intake: towards a memory of addiction. *J Neural Transm*; 107(6):613-38.

Heynen AJ, Abraham WC, Bear MF. (1996). Bidirectional modification of CA1 synapses in the adult hippocampus in vivo. *Nature*. 1996 May 9;381(6578):163-6.

Higashida H, Hoshi N, Knijnenik R, Zadina JE, Kastin AJ. (1998). Endomorphins inhibit high-threshold Ca²⁺ channel currents in rodent NG108-15 cells overexpressing mu-opioid receptors. *J Physiol*. Feb 15; 507 (Pt 1):71-5.

Hollmann, M., Hartley, M. y Heinemann, S., (1991). Ca²⁺ permeability of KA-AMPA-gated glutamate receptor channels depends on subunit composition. *Science*, 252, 851-853.

Holtt, V. (1993). Regulation of Opioid peptide gene expression. En Herz, A. (Ed) *Opioids I, Handbook of Experimental Pharmacology*, Vol 104, páginas 307-346. Springer-Verlag, Nueva York.

Horan, B., Smith, M., Gardner, E.L., Lepore, M. Y Ashby, C.R., (1997). (-)-Nicotine produces conditioned place preference in Lewis, but not in Fischer 344 rats. *Synapse* Vol 26 páginas 93-94.

Horvath G. (2000). Endomorphin-1 and endomorphin-2: pharmacology of the selective endogenous mu-opioid receptor agonists. *Pharmacol Ther.* Dec;88(3):437-63.

Huang EY, Chen CM, Tao PL. (2004). Supraspinal anti-allodynic and rewarding effects of endomorphins in rats. *Peptides.* Apr;25(4):577-83.

Huffman RD, Frey JM. (1989). Response of rat globus pallidus neurons to microinjection of mu and kappa opioid receptor agonists. *Eur J Pharmacol.* Nov 7;170(3):179-91.

Hughes, J. (1975) Isolation of an endogenous compound from the brain with pharmacological properties similar to morphine. *Brain Research Vol 2;88(2)* páginas 295-308

Inturrisi, C. E. (1997). Preclinical evidence for a role of glutamatergic systems in opioid tolerance and dependence. *Semin. Neurosci.* 9, 110-119.

Jackson, A., Mead, A. N. y Stephens, D. N. (2000). Behavioural effects of alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionate-receptor antagonists and their relevance to substance abuse. *Pharmacol. Ther.* 88, 59-76.

Janecka A, Kruszynski R, Fichna J, Kosson P, Janecki T. (2006). Enzymatic degradation studies of endomorphin-2 and its analogs containing N-methylated amino acids. *Peptides.* Jan;27(1):131-5.

Janecka A, Staniszewska R, Gach K, Fichna J. (2008). Enzymatic degradation of endomorphins. *Peptides.* Nov;29(11):2066-73. Epub 2008 Jul 31.

Jentsch, J. D. y Taylor, J. R. (1999). Impulsivity resulting from frontostriatal dysfunction in drug abuse: implications for the control of behavior by reward related stimuli. *Psychopharmacology.* 146, 373-390.

Jeziorski M, White FJ, Wolf ME. (1994). MK-801 prevents the development of behavioral sensitization during repeated morphine administration. *Synapse*.16(2):137-47.

Johnson PI, Napier TC. (1997).Morphine modulation of GABA- and glutamate-induced changes of ventral pallidal neuronal activity. *Neuroscience*. Mar;77(1):187-97.

Johnson SW, North RA. (1992). Opioids excite dopamine neurons by hyperpolarization of local interneurons. *J Neurosci*. Feb;12(2):483-8.

Jones, S., Kornblum, J. L. y Kauer, J. A. (2000). Amphetamine blocks long-term synaptic depression in the ventral tegmental area. *J. Neurosci*. 20, 5575-5580.

Jones, S. y Gutlerner, J. L. (2002). Addictive drugs modify excitatory synaptic control of midbrain dopamine cells. *NeuroReport*. 13, A29-A33.

Jones, S. y Bonci, A. (2005). Synaptic plasticity and drug addiction. *Curr Opin Pharmacol*.5(1):20-5.

Julien, M.J. (2001). A primer of drug action. A concise non-technical guide to the actions, uses and side effects of psychoactive drugs. Worth Publishers, Nueva York.

Kalivas, P.W. Y Stewart, J., (1991). Dopamine transmission in the initiation and expression of drug- and stress-induced sensitization of motor activity. *Brain Research Reviews* Vol 16 páginas 223-244.

Kalivas PW. (2004). Recent understanding in the mechanisms of addiction. *Curr Psychiatry Rep*. Oct;6(5):347-51.

Kalivas PW, O'Brien C. (2008).Drug addiction as a pathology of staged neuroplasticity. *Neuropsychopharmacology*. Jan;33(1):166-80. Epub 2007 Sep 5.

Kandel, ER; Schwartz, JH; Jessell, TM (2000). Principles of Neural Science (4th ed.). New York: McGraw-Hill.

Karler R, Calder LD, Chaudhry IA, Turkanis SA. (1989). Blockade of "reverse tolerance" to cocaine and amphetamine by MK-801. *Life Sci.*;45(7):599-606.

Karler R, Chaudhry IA, Calder LD, Turkanis SA. (1990). Amphetamine behavioral sensitization and the excitatory amino acids. *Brain Res.* Dec 24;537(1-2):76-82.

Kauer, J. A., (2004). Learning mechanisms in addiction: synaptic plasticity in the ventral tegmental area as a result of exposure to drugs of abuse. *Annu. Rev. Physiol.* 66, 447-475.

Kelley, A. E., Andrzejewski, M. E., Baldwin, A. E., Hernandez, P. J. y Pratt, W. E. (2003). Glutamate-mediated plasticity in corticostriatal networks: role in adaptive motor learning. *Ann. NY Acad. Sci.* 1003, 159-168.

Kim, J. A., Pollak, K. A., Hjelmstad, G. O., y Fields, H. L. (2004). A single cocaine exposure enhances both opioid reward and aversion through a ventral tegmental area-dependent mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 5664-5669.

Kimelberg HK, Biddelcome S, Narumi S, Bourke RS. (1978). ATPase and carbonic anhydrase activities of bulk-isolated neuron, glia and synaptosome fractions from rat brain. *Brain Res.* Feb 10;141(2):305-23.

Kimelberg HK, Norenberg MD. (1989). Astrocytes. *Sci Am.* Apr;260(4):66-72, 74, 76.

Kimelberg HK, Jalonen T, Walz W. (1993). Regulation of the brain microenvironment: transmitters and ions. In: Murphy S, editor. *Astrocytes: pharmacology and function*. San Diego, CA: Academic Press;

Kombian, S. B. y Malenka, R. C. (1994). Simultaneous LTP of non-NMDA and LTD of NMDA-receptor-mediated responses in the nucleus accumbens. *Nature* 368, 242-246.

Komendantov, A. O., Komendantova, O. G. y Johnson, S. W. (2004). A modeling study suggests complementary roles for GABA A and NMDA receptors and the SK channel

in regulating the firing pattern in midbrain dopamine neurons. *J Neurophysiol* 91, 346-357.

Kosten, T.A., Miserendino, M.J.D., Chi, S. Y Nestler, E.J., (1994). Fischer and Lewis rat strains show differential cocaine effects in conditioned place preference and behavioral sensitization but not in locomotor activity or conditioned taste aversion. *Journal of Pharmacological and Experimental Therapeutics* Vol 269 páginas 137-144.

Kosten, T.A., Miserendino, M. J. D., Haile, C.N., Decaprio, J.L.Jatlow, P.I. y Nestler, E.J., (1997). Acquisition and maintenance of intravenous cocaine self-administration in Lewis and Fischer inbred rat strains. *Brain Research* Vol 778 páginas 418-429.

Kosten, T.A. Y Ambrosio, E. (2002). HPA axis function and drug addictive behaviors: insights from studies with Lewis and Fischer 344 inbred rats. *Psychoneuroendocrinology* Vol 27 páginas 35-69

Koyuncuoglu H, Nurten A, Yamantürk P, Nurten R. (1999). The importance of the number of NMDA receptors in the development of supersensitivity or tolerance to and dependence on morphine. *Pharmacol Res. Apr;39(4):311-9.*

Kruzich PJ, Xi J. (2006). Differences in extinction responding and reinstatement of methamphetamine-seeking behavior between Fischer 344 and Lewis rats. *Pharmacol Biochem Behav. Mar;83(3):391-5. Epub 2006 Mar 6.*

Kruzich PJ, Xi J. (2006). Different patterns of pharmacological reinstatement of cocaine-seeking behavior between Fischer 344 and Lewis rats. *Psychopharmacology (Berl). Jul;187(1):22-9.*

Lancellotti, D., Glowa, J.R., Bayer, B.M., Houghtling, R.A. y Riley, A.L., 2000. Morphine-induced conditioned taste aversions in LEW/N and F344/N rat strains, College on Problems of Drug Dependence, San Juan, Puerto Rico, pp. 89.

Law PY, Wong YH, Loh HH. (2000). Molecular mechanisms and regulation of opioid receptor signaling. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.;40:389-430.*

Lee FJ, Xue S, Pei L, Vukusic B, Chery N, Wang Y, Wang YT, Niznik HB, Yu XM, Liu F. (2002). Dual regulation of NMDA receptor functions by direct protein-protein interactions with the dopamine D1 receptor. *Cell*.18;111(2):219-30.

Lee FJ, Liu F. (2004). Direct interactions between NMDA and D1 receptors: a tale of tails. *Biochem Soc Trans.(Pt 6)*:1032-6.

Leloup C, Arluison M, Lepetit N, Cartier N, Marfaing-Jallat P, Ferré P, Pénicaud L. (1994).Glucose transporter 2 (GLUT 2): expression in specific brain nuclei. *Brain Res. Feb 28*;638(1-2):221-6.

Li, T.K. y Lumeng, L., (1984). Alcohol preference and voluntary intakes of inbred rat strains and the National Institutes of Health heterogeneous stock of rats. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research Vol 8* páginas 485-486.

Li, Y. y Kauer, J. (2002). Effects of amphetamine on long-term potentiation in the nucleus accumbens. *Soc. Neurosci. Abstr.* 26, 1398.

Liang D, Li X, Clark JD. (2004). Increased expression of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II alpha during chronic morphine exposure. *Neuroscience*.123(3):769-75.

Liu F, Wan Q, Pristupa ZB, Yu XM, Wang YT, Niznik HB. (2000). Direct protein-protein coupling enables cross-talk between dopamine D5 and gamma-aminobutyric acid A receptors. *Nature*. 20;403(6767):274-80.

Lou L, Zhou T, Wang P, Pei G. (1999). Modulation of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II activity by acute and chronic morphine administration in rat hippocampus: differential regulation of alpha and beta isoforms. *Mol Pharmacol*.55(3):557-63.

Lu L, Zeng S, Liu D, Ceng X. (2000). Inhibition of the amygdala and hippocampal calcium/calmodulin-dependent protein kinase II attenuates the dependence and relapse to morphine differently in rats. *Neurosci Lett*.22;291(3):191-5.

Luedtke, R.R., Artymyshyn, R.P., Monks, B.R. y Molinoff, P.B., (1992). Comparison of the expression, transcription and genomic organization of D2 dopamine receptors in outbred and inbred strains of rat. *Brain Research* Vol 584 páginas 45-54.

Magistretti PJ, Pellerin L. (1996). Cellular bases of brain energy metabolism and their relevance to functional brain imaging: evidence for a prominent role of astrocytes. *Cereb Cortex*. Jan-Feb;6(1):50-61.

Maher F, Vannucci SJ, Simpson IA. (1994). Glucose transporter proteins in brain. *FASEB J*. Oct;8(13):1003-11.

Malenka, R. C. (2003). Synaptic plasticity and AMPA receptor trafficking. *Ann NY Acad Sci* 1003, 1-11.

Malinow R y Malenka, R. C. (2002). AMPA receptor trafficking and synaptic plasticity. *Annu Rev Neurosci*. 25, 103-126.

Mansour, A., Khachaturian, H., Lewis, M.E., Akil, H., y Watson, S.J. (1987). Autoradiographic differentiation of mu, delta kappa opiod receptors in the rat forebrain and midbrain. *Journal of Neuroscience*. 7 2445-2464

Mansour, A., y Watson, S.J. (1993). Anatomical distribution of opiod receptors in mammals: An Overview. En Herz, A. (Ed). *Opioids I, Handbook of Experimental Pharmacology*, 104 79-106

Mao J, Price DD, Mayer DJ. (1995). Mechanisms of hyperalgesia and morphine tolerance: a current view of their possible interactions. *Pain*.62(3):259-74.

Mao J. (1999). NMDA and opiod receptors: their interactions in antinociception, tolerance and neuroplasticity. *Brain Res Brain Res Rev*.30(3):289-304.

Marek P, Ben-Eliyahu S, Gold M, Liebeskind JC. (1991). Excitatory amino acid antagonists (kynurenic acid and MK-801) attenuate the development of morphine tolerance in the rat. *Brain Res.* 26;547(1):77-81.

Margolis EB, Hjelmstad GO, Bonci A, Fields HL. (2003). Kappa-opioid agonists directly inhibit midbrain dopaminergic neurons. *J Neurosci.* Nov 5;23(31):9981-6.

Martin, W.R., Eades, C.G., Thompson, J.A., Huppler, R.E. y Gilbert, P.E. (1976). The effects of morphine and nalorphine-like drugs in the nondependent and morphine-dependent chronic spinal dog. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 197, 517-532

Martin G, Przewlocki R, Siggins GR. (1999a). Chronic morphine treatment selectively augments metabotropic glutamate receptor-induced inhibition of N-methyl-D-aspartate receptor-mediated neurotransmission in nucleus accumbens. *J Pharmacol Exp Ther.*288(1):30-5.

Martin G, Ahmed SH, Blank T, Spiess J, Koob GF, Siggins GR. (1999b). Chronic morphine treatment alters NMDA receptor-mediated synaptic transmission in the nucleus accumbens. *J Neurosci.*19(20):9081-9.

Martin-Schild S, Gerall AA, Kastin AJ, Zadina JE. (1999). Differential distribution of endomorphin 1- and endomorphin 2-like immunoreactivities in the CNS of the rodent. *J Comp Neurol.* Mar 22;405(4):450-71.

Martín, S. Manzanares, J., Corchero, J., García-Lecumberri, C., Crespo, J.A., Fuentes, J.A. y Ambrosio, E., (1999). Differential basal proenkephalin gene expression in dorsal striatum and nucleus accumbens, and vulnerability to morphine self-administration in Fischer 344 and Lewis rats. *Brain Research* Vol 821 páginas 350-355.

Martín, S., Lyupina, Y., Crespo, J.A., González, B., García-Lecumberri, C. y Ambrosio, E., (2003). Genetic differences in NMDA and D1 receptors, and operant responding for food and morphine in Lewis and Fischer 344 rats. *Brain Research* Vol 973 (2) páginas 205-213

Martín, I. y Goicoechea, C. (2004). Fármacos analgésicos opiodes. En Lorenzo, P., Moreno, A., Leza, J.C., Lizasoain, I. y Moro, M.A. (Eds.) Velázquez. Farmacología Básica y Clínica. Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires.

Mazzucchelli, C. y colaboradores. (2002). Knockout of ERK1 MAP kinase enhances synaptic plasticity in the striatum and facilitates striatal-mediated learning and memory. *Neuron*, 34, 807-820.

McConalogue K, Grady EF, Minnis J, Balestra B, Tonini M, Brecha NC, Bunnett NW, Sternini C. (1999). Activation and internalization of the mu-opioid receptor by the newly discovered endogenous agonists, endomorphin-1 and endomorphin-2. *Neuroscience*. Mar;90(3):1051-9.

Miguens, M. Botreau F. Olias, O. Higuera-Matas, A., Bazan E. García-Lecumberri C. Ambrosio, E. (2008). Different patterns of glutamate and GABA responsiveness to cocaine-induced reinstatement of drug-seeking in the nucleus accumbens of Lewis and Fischer-344 rats. *Neuroscience Meeting Planner*. Washington, DC: Society for Neuroscience, 2008. Online.

Minabe Y, Emori K, Ashby CR Jr. (1995). Significant differences in the activity of midbrain dopamine neurons between male Fischer 344 (F344) and Lewis rats: an in vivo electrophysiological study. *Life Sci*. Mar 3;56(15):PL261-7.

Morgan, D., Cook, C.D. y Pickar, M.J., (1999). Sensitivity to the discriminative stimulus and antinociceptive effects of mu-opioids: role of strain of rat, stimulus intensity, and intrinsic efficacy at the mu-opioid receptor. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutic* Vol, 289 páginas 965-975.

Morgello S, Uson RR, Schwartz EJ, Haber RS. (1995). The human blood-brain barrier glucose transporter (GLUT1) is a glucose transporter of gray matter astrocytes. *Glia*. May;14(1):43-54.

Moro, M. A. y Leza, J. C. (1998). Opiáceos (I). Farmacología. Intoxicación aguda, en Lorenzo, P., Ladero, J. M., Leza, J. C. y Lizasoain, I. (eds) *Drogodependencias*. Editorial Panamericana. Madrid.

Morris RG, Schenk F, Tweedie F, Jarrard LE. (1990). Ibotenate Lesions of Hippocampus and/or Subiculum: Dissociating Components of Allocentric Spatial Learning. *Eur J Neurosci.* ;2(12):1016-1028.

Mucha, R.F., (1987). Is the motivational effect of opiate withdrawal reflected by common somatic indices of precipitated withdrawal? A place conditioning study in the rat. *Brain Research Vol 418* páginas 214-220.

Musto, D. F. (1991). Opium, cocaine and marijuana in American history. *Sci Am*, 265, 40-47

Narita M, Ozaki S, Ioka M, Mizoguchi H, Nagase H, Tseng LF, Suzuki T. (2001a). Different motivational effects induced by the endogenous mu-opioid receptor ligands endomorphin-1 and -2 in the mouse. *Neuroscience.*;105(1):213-8.

Narita M, Ozaki S, Ioka M, Mizoguchi H, Nagase H, Tseng LF, Suzuki T. (2001b). Lack of the involvement of mu1-opioid receptor subtype on motivational effects induced by the endogenous mu-opioid receptor ligands endomorphin-1 and -2 in the mouse. *Neurosci Lett.* Jul 27;308(1):17-20.

Nestler, E.J., Hyman, S.E., Malenka, R.C., 2001. *Molecular Neuropharmacology: A Foundation for Clinical Neuroscience*. McGraw-Hill, New York.

Nestler EJ. (2004). Molecular mechanisms of drug addiction. *Neuropharmacology.* 2;47 Suppl 1:24-32.

Nichols, J.R., Headlee, C.P. y Coppock, H.W. (1956). Drug addiction I. Addiction by space training. *Journal of the American Pharmaceutical Association Vol 45.* 788-791.

Nieuwenhuys, R. (1985). *Chemoarchitecture of the Brain*. Springer-Verlag, Berlin.

Nishioku T, Shimazoe T, Yamamoto Y, Nakanishi H, Watanabe S. (1999). Expression of long-term potentiation of the striatum in methamphetamine-sensitized rats. *Neurosci Lett.* 18;268(2):81-4.

Nothacker HP, Reinscheid RK, Mansour A, Henningsen RA, Ardati A, Monsma FJ Jr, Watson SJ, Civelli O. (1996). Primary structure and tissue distribution of the orphanin FQ precursor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Aug 6;93(16):8677-82.

Nylander, I., Vlaskovska, L. y Terenius, L., (1995). Brain dynorphin and enkephalin systems in Fischer and Lewis rats: effects of morphine tolerance and withdrawal. *Brain Research Vol 683 páginas 25-35.*

Ojanen SP, Palmén M, Hyytiä P, Kiiänmaa K. (2007). Extracellular glutamate and GABA in the ventral tegmental area of alcohol-preferring AA and alcohol-avoiding ANA rats treated repeatedly with morphine. *Eur J Pharmacol.* Mar 15;559(1):38-45.

O'Kusky J, Colonnier M. (1982). A laminar analysis of the number of neurons, glia, and synapses in the adult cortex (area 17) of adult macaque monkeys. *J Comp Neurol.* Sep 20;210(3):278-90.

Olds, J. Y Milner, P. (1954). Positive reinforcement produced by electrical stimulation of septal area and other regions of rat brain. *Journal of Comparative and Physiological Psychology Vol 47(6) páginas 419-427.*

Oliva, J.M., Sharpe, L.G., Baumann, M.H., Elmer, G.I., Martín, S. Ambrosio, E., (1999). Differences in basal m-opioid receptor binding between Lewis and Fischer 344 inbred rat strains. *Dolor Vol 14 página 20.*

Ortiz, J., Decaprio, J.L., Kosten, T.A. y Nestler, E.J., (1995). Strain-selective effects of corticosterone on locomotor sensitization to cocaine and on levels of tyrosine hydroxylase and glucocorticoid receptor in the ventral tegmental area. *Neuroscience Vol 67 páginas 383-397.*

Ozawa T, Nakagawa T, Shige K, Minami M, Satoh M. (2001). Changes in the expression of glial glutamate transporters in the rat brain accompanied with morphine dependence and naloxone-precipitated withdrawal. *Brain Res.* Jun 29;905(1-2):254-8.

Ozkan ED, y Ueda T. (1998). Glutamate transport and storage in synaptic vesicles. *Jpn J Pharmacol.* May;77(1):1-10.

Pasternak, G.W. (1987). Opioid receptors. En Meltzer, H.Y. (Ed) *Psychopharmacology: The Third Generation of Progress*. Páginas 281-288. Raven Press, Nueva York

Pascau J, Vaquero J, Soto M, Cacho R, Sánchez J, Santos A, Desco M. (2006). Multimodality workstation for small animal image visualization and analysis. *Molecular Imaging and Biology*, vol 8, sup 2, pp 97-8 (ISSN: 1536-1632).

Pasternak, G.W. (1993). Pharmacological mechanisms of opioid analgesics. *Clinical Neuropharmacology*. Vol 16 páginas 1-18

Paxinos G., Watson C. (2004). *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Fifth Edition. New York, Elsevier.

Pei L, Lee FJ, Moszczynska A, Vukusic B, Liu F. (2004). Regulation of dopamine D1 receptor function by physical interaction with the NMDA receptors. *J Neurosci.* 24(5):1149-58.

Pellerin L, Magistretti PJ. (1994). Glutamate uptake into astrocytes stimulates aerobic glycolysis: a mechanism coupling neuronal activity to glucose utilization. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Oct 25;91(22):10625-9.

Pert, C.B. y Snyder, S.H. (1973). Opiate receptor: Demonstration in nervous tissue. *Science (Wash DC)* 179 1011-1014

Peters, A., Palay, S. L., and Webster, H. deF., eds. (1991). *The fine structure of the nervous system, neurons and their supporting cells*, 3rd edition. New York: Oxford University Press.

Pfaus, J., Damsma, G., Nomikos, G.G., Wenkstern, D.B., Blaha, C.D., Phillips, A.G., Fibiger, H.C., (1990). Sexual behavior enhances central dopamine transmission in the male rats. *Brain Research* Vol 530 páginas 345-348.

Phillips, P. E., Stuber, G. D., Heien, M. L., Wightman, R. M. y Carelli, R. M. (2003). Subsecond dopamine release promotes cocaine seeking. *Nature*. 422, 614-618.

Pickens, R. y Thompson, T. (1968). Cocaine-reinforced behavior in rats: effects of reinforcement magnitude and fixed-ratio size. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 161. 122-129.

Pierce TL, Wessendorf MW. (2000). Immunocytochemical mapping of endomorphin-2-immunoreactivity in rat brain. *J Chem Neuroanat*. Apr;18(4):181-207.

Popik P, Wrobel M, Bisaga A. (2006). Reinstatement of morphine-conditioned reward is blocked by memantine. *Neuropsychopharmacology*.;31(1):160-70.

Post, R.M., Weiss, S.R.B., Pert, A. Y Uhde, T.W., (1987). Chronic cocaine administration: Sensitization and kindling effects. In: S. Fisher, A. Raskin and E. Uhlenhuth (Editors), *Cocaine: Clinical and Biobehavioral Aspects*. Oxford University Press, New York, pp. 109-173.

Prakash S, Ambrosio E, Alguacil LF, Del Olmo N. (2009). Genetic differences in hippocampal synaptic plasticity. *Neuroscience*. Jun 30;161(2):342-6.

Raichle ME, Martin WR, Herscovitch P, Mintun MA, Markham J. (1983). Brain blood flow measured with intravenous H₂(15)O. II. Implementation and validation. *J Nucl Med*. Sep;24(9):790-8.

Rasmussen, K. (2002). Morphine withdrawal as a state of glutamate hiperactivity. En *Glutamate and addiction*. Herman, B. H., Frankenheim, J., Litten, R., Sheridan, P. H., Weight, F. F. y Zukin, S. R. eds. The Humana Press, Inc. Totowa, NJ.

Reinscheid RK, Nothacker H, Civelli O. (2000). The orphanin FQ/nociceptin gene: structure, tissue distribution of expression and functional implications obtained from knockout mice. *Peptides*. Jul;21(7):901-6.

Rex, A., Sondern, U. Voigt, J., P., Franck, S. y Fink H., (1996). Strain differences in fear-motivated behavior of rats. *Pharmacol Biochem Behav*. May;54(1):107-11.

Robbe, D., Kopf, M., Remaury, A., Bockaert, J. y Manzoni, O. J. (2002). Endogenous cannabinoids mediate long-term synaptic depression in the nucleus accumbens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 8384-8388.

Robbins, T. W. y Everitt, B. J. (2002). Limbic-striatal memory systems and drug addiction. *Neurobiol. Learn. Mem.* 78,625-636.

Robinson, T.E. y Becker, J.B., (1986). Enduring changes in brain and behavior produced by chronic amphetamine administration: a review and evaluation of animal models of amphetamine psychosis. *Brain Research Reviews* Vol 11 páginas 157-198.

Roland PE, Eriksson L, Stone-Elander S, Widen L. (1987). Does mental activity change the oxidative metabolism of the brain? *J Neurosci*. Aug;7(8):2373-89.

Rönnbäck L, Wikkelsø C, Blomstrand C. (1983). Macromolecular changes in brain stem of morphinized rats. *Neurochem Res*. Nov;8(11):1487-95.

Roques, B.P., Noble, F., Dauge, V., Fournie-Zaluski, M.C. y Beaumont, A. (1993). Neutral endopeptidase 24.11: structure, inhibition, and experimental and clinical pharmacology. *Pharmacology Reviews* Vol 45(1) páginas 87-146

Rothstein JD, Martin L, Levey AI, Dykes-Hoberg M, Jin L, Wu D, Nash N, Kuncl RW. (1994). Localization of neuronal and glial glutamate transporters. *Neuron*. Sep;13(3):713-25.

Roy CS, Sherrington CS. (1890). On the Regulation of the Blood-supply of the Brain. *J Physiol*. Jan;11(1-2):85-158.17.

Sakurada S, Zadina JE, Kastin AJ, Katsuyama S, Fujimura T, Murayama K, Yuki M, Ueda H, Sakurada T. (1999). Differential involvement of mu-opioid receptor subtypes in endomorphin-1- and -2-induced antinociception. *Eur J Pharmacol.* May 7;372(1):25-30.

Sakurada S, Hayashi T, Yuhki M, Fujimura T, Murayama K, Yonezawa A, Sakurada C, Takeshita M, Zadina JE, Kastin AJ, Sakurada T. (2000). Differential antagonism of endomorphin-1 and endomorphin-2 spinal antinociception by naloxonazine and 3-methoxynaltrexone. *Brain Res.* Oct 20;881(1):1-8.

Sakurada C, Sakurada S, Hayashi T, Katsuyama S, Tan-No K, Sakurada T. (2003). Degradation of endomorphin-2 at the supraspinal level in mice is initiated by dipeptidyl peptidase IV: an in vitro and in vivo study. *Biochem Pharmacol.* Aug 15;66(4):653-61.

Sakurai SY, Cha JH, Penney JB, Young AB. (1991). Regional distribution and properties of [3H]MK-801 binding sites determined by quantitative autoradiography in rat brain. *Neuroscience.*40(2):533-43.

Sánchez-Cardoso, P., S. Martín, M. Miguéns, C. Nicanor, I. Torres, C. García-Lecumberri, y E. Ambrosio (2002). Cambios neuroadaptativos en los receptores μ -opioides durante la extinción de la conducta de autoadministración de morfina, en las cepas de ratas Lewis y Fischer344. II Congreso Nacional de Psicobiología. Almería, 20-21 de Septiembre de 2002

Sánchez-Cardoso P, Higuera-Matas A, Martín S, del Olmo N, Miguéns M, García-Lecumberri C, Ambrosio E. (2007). Modulation of the endogenous opioid system after morphine self-administration and during its extinction: a study in Lewis and Fischer 344 rats. *Neuropharmacology.* Mar;52(3):931-48.

Sánchez-Cardoso P, Higuera-Matas A, Martín S, Miguéns M, Del Olmo N, García-Lecumberri C, Ambrosio E. (2009). Strain differences between Lewis and Fischer 344 rats in the modulation of dopaminergic receptors after morphine self-administration and during extinction. *Neuropharmacology.* 57(1):8-17.

Sánchez Payá, J. et al.(1990). Consumo de drogas en España : fuentes de información y evolución durante el período 1984-1990. *Revista de Sanidad e Higiene Pública*.65, 395-412.

Satoh M, Zieglgänsberger W, Herz A. (1976). Supersensitivity of cortical neurones of the rat to acetylcholine and L-glutamate following chronic morphine treatment. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 1976;293(1):101-3.

Schechter, M.D. y Calcagnetti, D.J., (1993). Trends in place preference conditioning with a cross-indexed bibliography, 1957-1991. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* Vol 17 páginas 21-41.

Schreff M, Schulz S, Wiborny D, Höllt V. (1998). Immunofluorescent identification of endomorphin-2-containing nerve fibers and terminals in the rat brain and spinal cord. *Neuroreport*. Apr 20;9(6):1031-4.

Schutz, C.G., Ambrosio, E., Shippenberg, T.S., Elmer, G.I. Y Heidbreder, C., (1994). Morphine-induced locomotor activity and dopamine overflow in the nucleus accumbens in Lewis and Fischer 344 inbred rat strains. A comparative study. In: A. Louilot, T. Durkin, Spampinato, U. y Cador, M. (Editors), *Monitoring Molecules in Neuroscience. Proceedings of the 6th International Conference on in vivo methods*.

Schultz, W. y Dickinson, A. (2000). Neuronal coding of prediction errors. *Annu. Rev. Neuosoci*. 21, 473-500.

Schultz, W. (2004). Neural coding of basic reward terms of animal learning theory, game theory, microeconomics and behavioural ecology. *Curr. Opin. Neurobiol*. 14, 139-147.

Scott L, Kruse MS, Forssberg H, Brismar H, Greengard P, Aperia A. (2002). Selective up-regulation of dopamine D1 receptors in dendritic spines by NMDA receptor activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*.;99(3):1661-4. Epub 2002 Jan 29.

Selim, M. y Bradberry, C.W., (1996). Effect of ethanol on extracellular 5-HT and glutamate in the nucleus accumbens and prefrontal cortex: comparison between the Lewis and Fischer rat strains. *Brain Research* Vol 716 páginas 157-164.

Sepúlveda MJ, Hernández L, Rada P, Tucci S, Contreras E. (1998). Effect of precipitated withdrawal on extracellular glutamate and aspartate in the nucleus accumbens of chronically morphine-treated rats: an in vivo microdialysis study. *Pharmacol Biochem Behav.* 1998 May;60(1):255-62.

Sepúlveda J, Oliva P, Contreras E. (2004). Neurochemical changes of the extracellular concentrations of glutamate and aspartate in the nucleus accumbens of rats after chronic administration of morphine. *Eur J Pharmacol.*12;483(2-3):249-58.

Shane R, Wilk S, Bodnar RJ. (1999). Modulation of endomorphin-2-induced analgesia by dipeptidyl peptidase IV. *Brain Res.* Jan 9;815(2):278-86.

Shoaib, M., Schindler, C.W. y Goldberg, S.R., (1997). Nicotine self-administration in rats: strain and nicotine pre-exposure effects on acquisition. *Psychopharmacology* Vol 129 páginas 35-43.

Siggins GR, Martin G, Roberto M, Nie Z, Madamba S, De Lecea L. (2003). Glutamatergic transmission in opiate and alcohol dependence. *Ann N Y Acad Sci.* 1003:196-211.

Silver IA, Erecińska M. (1994). Extracellular glucose concentration in mammalian brain: continuous monitoring of changes during increased neuronal activity and upon limitation in oxygen supply in normo-, hypo-, and hyperglycemic animals. *J Neurosci.* Aug;14(8):5068-76.

Sim LJ, Liu Q, Childers SR, Selley DE. (1998). Endomorphin-stimulated [35S]GTPgammaS binding in rat brain: evidence for partial agonist activity at mu-opioid receptors. *J Neurochem.* Apr;70(4):1567-76.

Simon EJ, Hiller JM, Edelman I. (1973). Stereospecific binding of the potent narcotic analgesic (3H) Etorphine to rat-brain homogenate. *Proc Natl Acad Sci USA*. ;70(7):1947-9.

Sircar, R. Y Kim, D., (1999). Female gonadal hormones differentially modulate cocaine-induced behavioral sensitization in Fischer, Lewis, and Sprague-Dawley rats. *Journal of Pharmacology & Experimental Therapeutics* Vol 289 páginas 54-65.

Sled JG, Zijdenbos AP, Evans AC. (1998). A nonparametric method for automatic correction of intensity nonuniformity in MRI data. *IEEE Transactions on Medical Imaging*, vol 17, sup 1, pp 87-97

Smith S, Abraham S. (1975). The composition and biosynthesis of milk fat. *Adv Lipid Res*. 1975;13:195-239.

Snyder GL, Fienberg AA, Haganir RL, Greengard P. (1998). A dopamine/D1 receptor/protein kinase A/dopamine- and cAMP-regulated phosphoprotein (Mr 32 kDa)/protein phosphatase-1 pathway regulates dephosphorylation of the NMDA receptor. *J Neurosci*.18(24):10297-303.

Sokoloff L, Reivich M, Kennedy C, Des Rosiers MH, Patlak CS, Pettigrew KD, Sakurada O, Shinohara M. (1977). The [14C]deoxyglucose method for the measurement of local cerebral glucose utilization: theory, procedure, and normal values in the conscious and anesthetized albino rat. *J Neurochem*. May;28(5):897-916.

Sokoloff L. (1981). Localization of functional activity in the central nervous system by measurement of glucose utilization with radioactive deoxyglucose. *J Cereb Blood Flow Metab*.;1(1):7-36.

Sokoloff L, Kennedy C & Smith CB. (1989). The [14C]deoxyglucose method for measurement of local cerebral glucose utilization. (In) *Carbohydrates and Energy Metabolism* vol. 11 (Boulton AA, Baker GB, eds) Clifton, NJ, Humana Press (pp 155).

Sommer, B., et al. (1990). Flip and flop: A cell-specific functional switch in glutamate-operated channels of the CNS. *Science*, 249, 1580-1585.

Squire, L. R. y Zola-Morgan, S. (1991). The medial temporal lobe memory system. *Science*. 1991 Sep 20;253(5026):1380-6.

Sternberg, E., Young WS 3rd, Bernardini R, Calogero AE, Chrousos GP, Gold PW, Wilder RL. (1989). A central nervous system defect in biosynthesis of corticotropin-releasing hormone is associated with susceptibility to streptococcal cell wall-induced arthritis in Lewis rats. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* Vol 86 páginas 4771-4775.

Stöhr T, Szuran T, Welzl H, Pliska V, Feldon J, Pryce CR. (2000). Lewis/Fischer rat strain differences in endocrine and behavioural responses to environmental challenge. *Pharmacol Biochem Behav.* Dec;67(4):809-19.

Strecker, R.E., Eberle, W.F. y Ashby, C.R., (1995). Extracellular dopamine and its metabolites in the nucleus accumbens of Fischer and Lewis rats: basal levels and cocaine-induced changes. *Life Sciences* Vol 56 páginas 135-141.

Suzuki, T., George, F.R. Y Meisch, R.A., (1988a). Differential establishment and maintenance of oral ethanol reinforced behavior in Lewis and Fisher 344 inbred rat strains. *Journal of Pharmacological and Experimental Therapeutics* Vol 245 páginas 164-170.

Suzuki, T., Otani, K., Koike, Y. y Misawa, M., (1988b). Genetic differences in preferences for morphine and codeine in Lewis and Fischer 344 inbred rat strains. *Japanese Journal of Pharmacology* Vol 47 páginas 425-431.

Suzuki, T., George, F.R. y Meisch, R.A., (1992a). Etonitazene delivered orally serves as a reinforcer for Lewis but not Fischer 344 rats. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior* Vol 42 páginas 579-586.

Suzuki T, Lu MS, Motegi H, Yoshii T, Misawa M. (1992b). Genetic differences in the development of physical dependence upon diazepam in Lewis and Fischer 344 inbred rat strains. *Pharmacol Biochem Behav.* Oct;43(2):387-93.

Szatmári I, Biyashev D, Tömböly C, Tóth G, Mácsai M, Szabó G, Borsodi A, Lengyel I. (2001). Influence of degradation on binding properties and biological activity of endomorphin 1. *Biochem Biophys Res Commun.* Jun 15;284(3):771-6.

Takahashi S, Driscoll BF, Law MJ, Sokoloff L. (1995). Role of sodium and potassium ions in regulation of glucose metabolism in cultured astroglia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* May 9;92(10):4616-20.

Terenius, L. (1973) Stereospecific interaction between narcotic analgesia and synaptic plasma membrane fractions at cerebral cortex. *Acta Pharmacologica and Toxicologica* 32, 317-320.

Terenius, L. y Wahlstrom, A. (1978). Inhibitors of narcotic receptor binding in brain extracts and cerebrospinal fluid. *Acta Pharmacologica and Toxicologica* Vol 35 (suplemento 1), 87. Resumen.

Thomas MJ, Beurrier C, Bonci A, Malenka RC. (2001). Long-term depression in the nucleus accumbens: a neural correlate of behavioral sensitization to cocaine. *Nat Neurosci.* 4(12):1217-23.

Thomas, M. J., Malenka, R. C. y Bonci, A. (2000). Modulation of long-term depression by dopamine in the mesolimbic system. *J. Neurosci.* 20, 5581-5586.

Thompson, T. y Schuster, C.R. (1964). Morphine self-administration food reinforced and avoidance behaviours in rhesus monkeys. *Psychopharmacology.* 5. 87-94.

Tokuyama S, Wakabayashi H, Ho IK. (1996). Direct evidence for a role of glutamate in the expression of the opioid withdrawal syndrome. *Eur J Pharmacol.* Jan 11;295(2-3):123-9.

Tokuyama S, Zhu H, Oh S, Ho IK, Yamamoto T. (2001). Further evidence for a role of NMDA receptors in the locus coeruleus in the expression of withdrawal syndrome from opioids. *Neurochem Int.* Aug;39(2):103-9.

Tömböly C, Péter A, Tóth G. (2002). In vitro quantitative study of the degradation of endomorphins. *Peptides.* Sep;23(9):1573-80.

Tower DB, Young OM. (1973). The activities of butyrylcholinesterase and carbonic anhydrase, the rate of anaerobic glycolysis, and the question of a constant density of glial cells in cerebral cortices of various mammalian species from mouse to whale. *J Neurochem.* Feb;20(2):269-78.

Trujillo KA, Akil H. (1991). Inhibition of morphine tolerance and dependence by the NMDA receptor antagonist MK-801. *Science.* 4;251(4989):85-7.

Trujillo KA, (1999). Cellular and molecular mechanisms of opioid tolerance and dependence: progress and pitfalls. *Pain Forum* 8, 29-33.

Trujillo KA, (2003). The role of NMDA receptors in opiate tolerance, sensitization and physical dependence. En *Glutamate and Addiction* Herman, B. H., Frankenheim, J., Litten, R., Sheridan, P. H., Weight, F. F. y Zukin, S. R. eds. The Humana Press, Inc. Totowa, NJ.

Tseng LF, Narita M, Suganuma C, Mizoguchi H, Ohsawa M, Nagase H, Kampine JP. (2000). Differential antinociceptive effects of endomorphin-1 and endomorphin-2 in the mouse. *J Pharmacol Exp Ther.* Feb;292(2):576-83.

Tsuang MT, Lyons MJ, Eisen SA, Goldberg J, True W, Lin N, Meyer JM, Toomey R, Faraone SV, Eaves L. (1996). Genetic influences on DSM-III-R drug abuse and dependence: a study of 3,372 twin pairs. *Am J Med Genet.* 1996 Sep 20;67(5):473-7.

Tzschentke TM, Schmidt WJ. (2003). Glutamatergic mechanisms in addiction. *Mol Psychiatry.* Apr;8(4):373-82.

Uhl GR. (2004).Molecular genetic underpinnings of human substance abuse vulnerability: likely contributions to understanding addiction as a mnemonic process. *Neuropharmacology*.;47 Suppl 1:140-7.

Ungless, M. A., Whistler, J. L., Malenka, R. C. y Bonci, A. (2001). Single cocaine exposure in vivo induces long-term potentiation in dopamine neurons. *Nature*, 411,583-587.

van der Staay FJ, Schuurman T, van Reenen CG, Korte SM. (2009). Emotional reactivity and cognitive performance in aversively motivated tasks: A comparison between four rat strains. *Behav Brain Funct.* 15;5:50.

Van Ree, J.M., Gerrits, M.A.F.M. Y Vanderschuren L.J.M.J. (1999). Opioids, Reward and Addiction: An encounter of Biology, Psychology and Medicine. *Pharmacological Reviews* Vol.51 No.2 páginas 341-396

Vaquero JJ, Lage E, Rincón L, et al. (2005) rPET detectors design and data processing. *IEEE NSS/MIC Conference Record* 2885–2889

Ward, A.S., Li, D.H., Luedtke, R.R. y Emmett-Oglesby, M.W., (1996). Variations in cocaine self-administration by inbred rat strains under a progressive-ratio schedule. *Psychopharmacology* Vol 127 páginas 204-212.

Watkins, J. C. (1984). Excitatory amino acids and central synaptic transmission. *Trends Pharmacol. Sci.*, 5, 373-376.

Weeks, J.R. (1962). Experimental morphine addiction: method for automatic intravenous injections in unrestrained rats. *Science*. 138. 148-144.

Williams JT, Christie MJ, Manzoni O. (2001). Cellular and synaptic adaptations mediating opioid dependence. *Physiol Rev.*81(1):299-343

Wilson AM, Soignier RD, Zadina JE, Kastin AJ, Nores WL, Olson RD, Olson GA. (2000). Dissociation of analgesic and rewarding effects of endomorphin-1 in rats. *Peptides*. Dec;21(12):1871-4.

Wise, R.A. y Rompre, P.P., (1989). Brain dopamine and reward. In: M. Rosenweig and L. Porter (Editors), *Annual Review of Psychology*, Palo Alto, CA, pp. 191-226.

Wise RA. (2005). Forebrain substrates of reward and motivation. *J Comp Neurol*. 2005 Dec 5;493(1):115-21.

Wolf ME, Jeziorski M. (1993). Coadministration of MK-801 with amphetamine, cocaine or morphine prevents rather than transiently masks the development of behavioral sensitization. *Brain Res*. 1993 Jun 11;613(2):291-4.

Wolf, M. E. (1998). The role of excitatory amino acids in behavioral sensitization to psychomotor stimulants. *Prog. Neurobiol.* 54, 679-720.

Wolf, M. E. (2002a). Addiction: making the connection between behavioral changes and neuronal plasticity in specific pathways. *Mol Interv.*2(3):146-57.

Wolf, M. E. (2002b). Addiction and glutamate-dependent plasticity, in *Glutamate and addiction* (Herman, B. H., Frankenheim, J., Litten, R., Sheridan, P. H., Weight, F. F. y Zukin, S. R. eds) The Humana Press, Inc. Totowa, NJ.

Wong CS, Cherng CH, Luk HN, Ho ST, Tung CS. (1996). Effects of NMDA receptor antagonists on inhibition of morphine tolerance in rats: binding at mu-opioid receptors. *Eur J Pharmacol.*15;297(1-2):27-33.

Yamamoto, Y., Nakanishi, H., Takai, N., Shimazoe, T., Watanabe, S. y Kita, H. (1999). Expression of N-methyl-D-aspartate receptor-dependent long-term potentiation in the neostriatal neurons in an in vitro slice after ethanol withdrawal of the rat. *Neuroscience*. 91, 59-68.

Yokel, R. y Pickens, R. (1974). Drug level of d- and l-amphetamine during intravenous self-administration. *Psychopharmacologic*.34.255-264.

Young, E.A., Bronstein, D., Akil, H. (1993). Dopamine regulation of swim stress induction of the pituitary intermediate lobe proopiomelanocortin system. *Neuroendocrinology* Vol 58(3) páginas 294-302.

Zadina JE, Kastin AJ, Ge LJ, Hackler L. (1994). Mu, delta, and kappa opiate receptor binding of Tyr-MIF-1 and of Tyr-W-MIF-1, its active fragments, and two potent analogs. *Life Sci.*;55(24):PL461-6.

Zadina JE, Hackler L, Ge LJ, Kastin AJ. A potent and selective endogenous agonist for the mu-opiate receptor. *Nature*. 1997 Apr 3;386(6624):499-502.

Zadina JE, Martin-Schild S, Gerall AA, Kastin AJ, Hackler L, Ge LJ, Zhang X. Endomorphins: novel endogenous mu-opiate receptor agonists in regions of high mu-opiate receptor density. *Ann N Y Acad Sci*. 1999;897:136-44.

Zadina JE. Isolation and distribution of endomorphins in the central nervous system. *Jpn J Pharmacol*. 2002 Jul;89(3):203-8.

Zangen A, Ikemoto S, Zadina JE, Wise RA. (2002).Rewarding and psychomotor stimulant effects of endomorphin-1: anteroposterior differences within the ventral tegmental area and lack of effect in nucleus accumbens. *J Neurosci*. Aug 15;22(16):7225-33.

