FUNDACION DR. ANTONIO ESTEVE
Llobet i Vall-Llosera, 2. 08032 Barcelona (España). Tel.: 934 335 320

31

ASPECTOS BÁSICOS Y CLÍNICOS SOBRE LA NEUROBIOLOGÍA DE LA ADICCIÓN C. De Felipe

31

MONOGRAFÍAS DR. ANTONIO ESTEVE

ASPECTOS BÁSICOS Y CLÍNICOS SOBRE LA NEUROBIOLOGÍA DE LA ADICCIÓN

C. De Felipe

FUNDACION DR. ANTONIO ESTEVE

31

MONOGRAFÍAS DR. ANTONIO ESTEVE

ASPECTOS BÁSICOS Y CLÍNICOS SOBRE LA NEUROBIOLOGÍA DE LA ADICCIÓN

C. De Felipe

FUNDACION DR. ANTONIO ESTEVE

© 2003, Fundación Dr. Antonio Esteve
Llobet i Vall-Llosera 2. E-08032 Barcelona.
Teléfono: 93 433 53 20; fax: 93 450 48 99.
Correo electrónico: fundacion@esteve.org
Internet: http://www.esteve.org

Depósito legal: B-51.405-2003
ISBN: 84-7592-671-1
Coordinación y producción:
Scientific Communication Management, S.L.
Travesera de Gracia, 17-21. E-08021 Barcelona
Impreso en España por Press Line
Printed in Spain

La Fundación Dr. Antonio Esteve contempla como objetivo prioritario el estímulo del progreso de la terapéutica por medio de la comunicación y la discusión científica.
La Fundación quiere promover la cooperación internacional en la investigación farmacoterapéutica y, a tal fin, organiza reuniones internacionales multidisciplinarias donde grupos reducidos de investigadores discuten los resultados de sus trabajos. Estas discusiones son recogidas en las publicaciones de los Esteve Foundation Symposia.
Otras actividades de la Fundación Dr. Antonio Esteve incluyen la organización de reuniones dedicadas a la discusión de problemas de alcance más local y publicadas en el formato de la presente monografía. La Fundación participa también en conferencias, seminarios, cursos y otras formas de apoyo a las ciencias médicas, farmacéuticas y biológicas y, con carácter bienal, concede un premio al mejor artículo publicado por un autor español dentro del área de la farmacoterapia.
Entre los diferentes tipos de publicaciones de la Fundación Dr. Antonio Esteve cabe destacar Pharmacotherapy revisited: An Esteve Foundation Series, en la cual a través de diferentes volúmenes se recopilan, en edición facsímil, los principales artículos que sentaron las bases de una determinada disciplina.

Tanto la introducción como los artículos y discusiones de la presente monografía recogen la opinión de los correspondientes autores, por lo que la Fundación Dr. Antonio Esteve no se hace necesariamente partícipe de su contenido. Los diferentes capítulos corresponden a las ponencias presentadas en la mesa redonda organizada por la Fundación Dr. Antonio Esteve en Bellaterra (Barcelona) el día 27 de febrero de 2003, moderada por Carmen De Felipe.

AGRADECIMIENTOS

La Fundación Dr. Antonio Esteve desea expresar su agradecimiento a Marcel Brosa por el diseño del programa *Chair System* y su adaptación técnica para la gestión informática de la moderación de las mesas redondas que dan lugar a la edición de estas monografías, así como a Pere Gavaldà por su contribución en las distintas fases de dicho proceso y a Israel Places por su colaboración técnica mediante el sistema de proyección empleado durante la mesa redonda. Así mismo desea reconocer la aportación de Sergio Abanades durante la edición de las discusiones.

Aspectos básicos y clínicos sobre la neurobiología de la adicción

C. De Felipe y F. Bosch

Introducción IX

C. De Felipe

Participación de la sustancia P en los mecanismos de recompensa 1

F. Rodríguez de Fonseca

Participación del sistema límbico en la neurobiología de la adicción 17

J. Pineda

Óxido nítrico y CREB: abstinencia y *locus coeruleus* 25

A. Díaz, E. Pérez San Emeterio, M. Tramullas, E. Valdizán, A. Pazos y M.A. Hurlé

Adaptaciones moleculares durante la tolerancia y dependencia a opioides 37

R. Maldonado

Mecanismos implicados en la dependencia de cannabinoides 47

M. Miquel

Particularidades en los mecanismos de adicción al etanol. Mecanismos neuroenzimáticos de acción del alcohol: papel del acetaldehído 59

M.I. Colado

Cambios neurobiológicos inducidos por MDMA: mecanismos de neurotoxicidad 69

P. Robledo

Aspectos neurobiológicos de la adicción al MDMA 75

E. Ambrosio Flores

Neuroadaptaciones producidas por el consumo y la abstinencia de cocaína 83

X. Codony

Evaluación experimental del potencial adictivo en animales 93

P.N. Roset, M. Farré, S. Poudevida, S. Abanades y J. Camí

Evaluación experimental del potencial de abuso en humanos 99

M.A. Oliveras Valenzuela, L. García Fernández y A.G. Alcántara Lapaz

Repercusiones asistenciales de la adicción: perspectiva de una unidad de hospitalización psiquiátrica 109

Relación de participantes

Sergio Abanades

Unitat de Farmacologia
Institut Municipal d'Investigació
Mèdica i Hospital del Mar
(IMAS-IMIM-HMAR)
Universitat Autònoma de Barcelona
Dr. Aiguader, 80
08003 Barcelona

Emilio Ambrosio Flores

Departamento de Psicobiología
Facultad de Psicología
Universidad Nacional de Educación
a Distancia, UNED
Ciudad Universitaria, s/n
28040 Madrid

Félix Bosch

Fundación Dr. Antonio Esteve
Llobet i Vall-Llosera, 2
08032 Barcelona

Miquel Casas

Servicio de Psiquiatría
Hospital Universitari
de la Vall d'Hebron
Pg. Vall d'Hebron, 119-129
08035 Barcelona

Anna Castañé

Laboratori de Neurofarmacologia
Facultat de Ciències de la Salut i
de la Vida
Universitat Pompeu Fabra
Dr. Aiguader, 80
08003 Barcelona

Xavier Codony

Descubrimiento Biológico
Farmacología Conductual.
Esteve I+D
Avda. Mare de Déu de Montserrat, 221
08041 Barcelona

M. Isabel Colado

Departamento de Farmacología.
Facultad de Medicina.
Universidad Complutense
Avda. de la Complutense, s/n
28040 Madrid

Carmen de Felipe

Instituto de Neurociencias
Facultad de Medicina.
Universidad Miguel Hernández
Ctra. Alicante-Valencia, km. 82
03550 San Juan de Alicante

Sergio Erill

Fundación Dr. Antonio Esteve
Llobet i Vall-Llosera, 2
08032 Barcelona

Clara C. Faura

Instituto de Neurociencias
Universidad Miguel Hernández-CSIC
Ctra. Valencia-Alicante, km. 82
03550 San Juan de Alicante

Carlos Goicoechea

Unidad de Farmacología
Departamento de Ciencias
de la Salud
Universidad Rey Juan Carlos
Avda. Atenas, s/n
28922 Alcorcón

María A. Hurlé

Departamento de Fisiología
y Farmacología
Facultad de Medicina.
Universidad de Cantabria
Cardenal Herrera Oria, s/n
39011 Santander

Rafael Maldonado

Laboratori de Neurofarmacologia
Facultat de Ciències de la Salut i
de la Vida
Universitat Pompeu Fabra
Dr. Aiguader, 80
08003 Barcelona

Marta Miquel

Área de Psicobiología
Universitat Jaume I
Campus Borriol
12080 Castelló de la Plana

Rosario Moratalla

Instituto Cajal - CSIC
Avda. Dr. Arce, 37
28002 Madrid

Patricia Murtra

Laboratori de Neurofarmacologia
Facultat de Ciències de la Salut i
de la Vida
Universitat Pompeu Fabra
Dr. Aiguader, 80
08003 Barcelona

María A. Oliveras Valenzuela

Departamento de Medicina y Psiquiatría
Facultad de Medicina.
Universidad Miguel Hernández
Servicio de Psiquiatría.
Hospital Universitario
03550 San Juan de Alicante

Joseba Pineda

Departamento de Farmacología
Facultad de Medicina y Odontología
Universidad del País Vasco/Euskal
Herriko Unibertsitatea (UPV/EHU)
Bº Sarriena, s/n
48940 Leioa

Enrique Portillo

Descubrimiento Biológico
Farmacología Conductual. Esteve I+D
Avda. Mare de Déu de Montserrat, 221
08041 Barcelona

Patricia Robledo

Laboratori de Neurofarmacologia
Facultat de Ciències de la Salut i
de la Vida
Universitat Pompeu Fabra-IMIM
Dr. Aiguader, 80
08003 Barcelona

Fernando Rodríguez de Fonseca

Unidad de Investigación
Fundación Hospital Carlos Haya
Avda. Carlos Haya, 82
29010 Málaga

Pere N. Roset

Unitat de Farmacologia
Institut Municipal d'Investigació
Mèdica i Hospital del Mar
(IMAS-IMIM-HMAR)
Universitat Autònoma de Barcelona
Dr. Aiguader, 80
08003 Barcelona

Anna Travesa

Departament de Ciències
Experimentals i de la Salut
Facultat de Ciències de la Salut i
de la Vida
Universitat Pompeu Fabra
Dr. Aiguader, 80
08003 Barcelona

Introducción

No creemos que existan dudas sobre la relevancia actual de la drogadicción, ni del interés científico que despierta por las repercusiones sociales y sanitarias que conlleva. A pesar de que todavía se vive en una zona mayoritariamente de penumbra en lo que se refiere al conocimiento de las bases biológicas que la sustentan, a medida que las aportaciones de los diferentes grupos de investigadores iluminan las diversas incógnitas del problema, por insignificantes que puedan parecer, se logran avances que en mayor o menor medida tienen repercusión en la clínica y el tratamiento de los pacientes adictos.

Algunas de las cuestiones que se plantean sobre los mecanismos de la adicción incumben desde los sistemas neurobioquímicos y los sustratos cerebrales responsables, hasta el papel de la personalidad, las enfermedades psiquiátricas o el componente genético en el desarrollo de las adicciones. Algunos de estos puntos se discutieron durante las ponencias que recoge la presente monografía.

Siguiendo el trazo marcado por mesas redondas previamente organizadas desde la Fundación Dr. Antonio Esteve, en esta ocasión se propuso abordar diversos aspectos relacionados con la neurobiología de la adicción a través de la experiencia de investigadores españoles. También, como en ocasiones anteriores, se pretendió diversificar la procedencia de los asistentes, con el fin de facilitar un debate más rico después de cada una de las doce ponencias programadas.

En una reunión de un día de duración con el formato que habitualmente utiliza la Fundación Dr. Antonio Esteve, por diversos motivos, es casi imposible conseguir representación de todos los grupos que en nuestro país trabajan en adicción. Algunos no pudieron asistir por coincidencia de compromisos, mientras que otros debieron descartarse a causa del limitado número de asistentes que nos permiten estas mesas redondas. A pesar de todo, la experiencia nos dicta, y esta actividad no fue una excepción, que se trata de un formato de reunión efectivo y productivo a la vez. Por el mismo problema aducido anteriormente, no pudieron abordarse determinados temas como, por ejemplo, los mecanismos de adicción de la nicotina o de la cafeína, entre otros.

Respecto a la orientación de las ponencias convendría añadir que, si bien la mayoría desarrollaron temas de investigación básica, no faltó la visión práctica asistencial que aportaron algunos de los asistentes a la reunión. Tal como se recoge en la presente monografía, ello condujo a interesantes discusiones de, a veces, difícil comunión. Se presentaron resultados de trabajos que analizaban los diferentes sustratos neuroanatómicos de la adicción atribuibles a diversas drogas, así como modelos de estudio en animales y en humanos. Finalmente, se incluyó una visión clínica del problema a través de la experiencia adquirida desde una unidad de hospitalización psiquiátrica. En definitiva, creemos que el contenido de la presente monografía avala el elevado nivel competitivo de los españoles que investigan los mecanismos de la adicción, hecho reforzado por la excelente revisión sobre el tema recientemente publicada por Camí y Farré en *The New England Journal of Medicine* (2003; 349: 975-986).

Por último, es nuestro deseo que el contenido de esta monografía llegue al máximo número de profesionales sanitarios interesados en la drogadicción. Los que conocen la Fundación Dr. Antonio Esteve saben que todas sus publicaciones se distribuyen entre las principales bibliotecas, universidades y centros de investigación, así como entre aquellas personas que las solicitan por escrito. Por todo ello, además de felicitar y agradecer a los participantes en el debate, querríamos animarles a que entre todos contribuyamos a la difusión de esta publicación. Estamos convencidos de que ello repercutirá en un mayor conocimiento de los mecanismos de esta enfermedad mental crónica y, por lo tanto, en mayor o menor medida y con el paso del tiempo también podría traducirse en una mejora del abordaje del paciente adicto.

Carmen De Felipe y Félix Bosch

Participación de la sustancia P en los mecanismos de recompensa

C. De Felipe

Instituto de Neurociencias, Universidad Miguel Hernández-CSIC, Alicante.

"Se debe saber que, desde el cerebro, y exclusivamente desde el cerebro, surgen nuestros placeres, dichas, risas y bromas, además de nuestras penas, dolores, tristezas y lágrimas.

Mediante el cerebro pensamos, vemos y distinguimos lo feo de lo bello, lo malo de lo bueno, lo agradable de lo desagradable... También nos hace delirantes o locos y nos infunde miedo o pavor, sea de noche o de día."

(Hipócrates, siglo V a.C.)

Introducción

El neuropéptido sustancia P (SP) y su receptor preferencial, el receptor NK1, se encuentran intensamente expresados en áreas cerebrales[1] implicadas en ciertos desórdenes afectivos, y estudios preclínicos y clínicos demuestran que los antagonistas del receptor NK1 poseen efectos ansiolíticos y antidepresivos[2-5]. Dado que si bien la afinidad de dichos antagonistas es alta para el receptor humano resulta ser muy pobre en roedores, por lo que generamos ratones carentes del receptor NK1 mediante recombinación homóloga en células embrionarias pluripotenciales, con el fin de estudiar la implicación de la SP en procesos biológicos en ratón. Así, hemos demostrado que estos ratones mutantes presentan alteraciones en la amplificación y en la codificación de la intensidad de la respuesta de estímulos nociceptivos, tienen abolida la analgesia inducida por estrés, y ausente la respuesta agresiva a la invasión territorial, que son todas ellas respuestas biológicas de valor relevante para la supervivencia del animal[6]. Además, en algunos modelos de ansiedad, como el ensayo "light-dark box" o la separación maternal los animales carentes del receptor NK1, mostraron una disminución de la respuesta[4], lo que sugiere que el receptor NK1 está implicado en el control de la ansiedad y en la respuesta adaptativa al estrés.

Existen evidencias que sugieren que la SP puede, además, ejercer un papel importante en mediar las propiedades motivacionales de las drogas de abuso. La inyección i.c.v. de SP produce estimulación psicomotora[7] e induce condicionamiento de preferencia de plaza (CPP)[8]. El receptor NK1 está intensamente expresado en el núcleo *accumbens*, basalis, amígdala y en el hipotálamo[1], regiones cerebrales del sistema dopaminérgico mesocorticolímbico implicadas en el refuerzo positivo de los recompensantes naturales y las drogas de abuso. En el estriado dorsal y ventral, el receptor NK1 se encuentra localizado exclusivamente en las grandes neuronas colinérgicas, colocalizando con receptores dopaminérgicos D2 y D5, que constituyen el 1-3% de la población neuronal del núcleo[9].

La administración repetida de drogas de abuso como opiáceos y psicoestimulantes causa un número de respuestas adaptativas en el cerebro que pueden eventualmente contribuir al desarrollo de la adicción[10,11]. La sensibilización locomotora consiste en un progresivo y persistente aumento de las propiedades psicomotoras de las drogas con las sucesivas administraciones intermitentes. Esta sensibilización conductual depende de la facilitación en la transmisión glutamatérgica y dopaminérgica en el prosencéfalo basal, y se ha sugerido que es de fundamental importancia en los aspectos motivacionales de la drogadicción, búsqueda compulsiva de la droga y recaídas[12-18].

El objetivo del presente estudio fue investigar si la eliminación del gen que codifica el receptor de SP podía afectar a los sistemas motivacionales y a los procesos adictivos. Para ello se estudió, en primer lugar, la conducta motora y el CPP inducido por morfina, así como el condicionamiento de aversión de plaza, el síndrome de abstinencia y la sensibilización locomotora. Posteriormente, los estudios se extendieron a otras

drogas de abuso y al recompensante natural comida para determinar si los efectos observados con morfina eran específicos de dicha droga o bien se trataba de un mecanismo común de la vía de recompensa. Por último, se examinó el sustrato neurobiológico de las alteraciones observadas mediante la destrucción selectiva de las neuronas $NK1^+$, utilizando la neurotoxina SP-saporina inyectada estereotáxicamente en dos áreas cerebrales: el núcleo *accumbens* y la amígdala.

Métodos

Todos los ensayos de conducta se realizaron en ratones adultos macho (129/Sv x C57BL/6). Se usaron dos tipos de animales, los ratones *knockout*, que carecen del gen que codifica para el receptor NK1 ($NK1^{-/-}$), y los ratones silvestres ($NK1^{+/+}$). Todos los resultados se analizaron estadísticamente y su usó una n = 8-14. Todos los experimentos se realizaron durante la fase de luz del ciclo oscuridad/luz, entre las 9 a.m. y las 3 p.m.

Condicionamiento de preferencia de plaza

El ensayo fue previamente descrito por Wise y Bozarth[19].El aparato de CPP consistió en dos compartimentos cuadrados de Plexiglas de 15 x 15 x 15 cm conectados por una parte central llamada área neutral. Ambos compartimentos eran táctil y visualmente distintos. El ensayo consta de tres fases: *a)* fase de precondicionamiento durante la cual el animal situado en el área neutral tuvo libre acceso a los dos compartimentos y se registró su localización durante 18 min; *b)* fase de condicionamiento en la que los animales recibieron la droga (o comida) en los días 1, 3 y 5, y la solución salina en los días 2, 4 y 6 e inmediatamente después de cada inyección se confinó al animal durante 20 min en un compartimento asignado previamente, y *c)* fase de test, que fue exactamente igual que la fase de precondicionamiento (libre acceso a los dos compartimentos durante 18 min) a las 24 h después de la última inyección. La puntuación de preferencia de plaza se expresó como la diferencia en el tiempo de permanencia dentro del compartimento asociado a la droga durante las fases de test y de precondicionamiento. El tiempo transcurrido en el área neutral fue proporcionalmente dividido y sumado al valor de tiempo de cada compartimento de condicionamiento. Los movimientos de los animales fueron captados y analizados con un *videotracking* (Smart, Panlab).

Condicionamiento aversivo de plaza inducido por naloxona

El protocolo seguido fue el mismo que el CPP pero con pequeñas modificaciones[20]. Antes de empezar el condicionamiento aversivo de plaza inducido por naloxona (CPA) se trató a los animales crónicamente y con dosis crecientes con morfina (10-50 mg/kg) para inducirles dependencia a la droga opiácea de morfina. La fase de condicionamiento consistió en el día 1 en la administración de naloxona (1 mg/kg, i.p.) una hora después de la inyección matinal de morfina y su confinamiento durante 20 min en el compartimento asignado y en el día 2 la inyección de solución salina.

Síndrome de abstinencia

Se indujo la dependencia a opiáceos en ratones mediante la administración de dosis crecientes de morfina cada 12 h durante 6 días (20-100 mg/kg, i.p.). El síndrome de abstinencia se precipitó una única vez en cada animal mediante la inyección de naloxona (1 mg/kg, i.p.) una hora después de la última inyección de morfina. Se cuantificó el número de sacudidas de tronco, saltos, olisquear, temblor de patas, diarrea y ptosis, entre otros, durante 30 min.

Actividad locomotora

La actividad locomotora bajo condiciones no estresantes se realizó en campo abierto negro de 30 x 50 x 50 cm con el suelo dividido en 25 cuadrantes. Después de la inyección de la droga o de la solución salina se colocó al animal en el centro del campo abierto y durante 10 min se registró su comportamiento con una cámara de vídeo. Al finalizar la sesión se cuantificó el número de líneas cruzadas.

Respuesta exploradora

La respuesta exploradora en un ambiente estresante se realizó en un campo abierto cuyas dimensiones eran de 30 x 50 x 50 cm con el suelo dividido en 25 cuadrantes. El aparato estaba intensamente iluminado (500 lux) y contenía cuatro objetos desconocidos por el animal a 20 cm de cada esquina. Se situaron a los animales individualmente en el centro del campo abierto y se registró su comportamiento con una cámara de vídeo durante 5 min. Este ensayo se realizó en 3 días consecutivos a intervalos de 24 h. Cada día se cuantificó el número de cuadrantes cruza-

dos, periodos de aseo, defecación, elevaciones y el número de visitas a los objetos desconocidos, como fue descrito por Maldonado et al[21].

Efecto analgésico y tolerancia a morfina

La tolerancia a morfina se realizó durante 12 días, siendo el primero y el último los días en los que se realizaron las curvas dosis/efecto. Durante el segundo día hasta el décimo primer día se inyectó sulfato de morfina, 10 mg/kg, i.p., a los animales dos veces diarias con intervalos de 12 h. Las curvas de dosis/respuesta se realizaron mediante 5 inyecciones de sulfato de morfina con incrementos logarítmicos del 0,15 sobre la dosis acumulada ($\text{dosis}_{\text{nueva}} = 10^{(0,15 + \log (d))} - \text{dosis}_{\text{anterior acumulada}}$). A los 30 min de cada inyección se determinaron los umbrales nociceptivos mediante el ensayo de inmersión de la cola.

Estudios de ingesta de etanol

Los animales fueron sometidos a un protocolo de libre elección las 24 h, durante 58 días (10% de etanol y agua las 24 h). Cada día se cambió la situación de ambos tubos para evitar que la preferencia innata del animal por un sitio determinara el resultado. Los animales pasaron por un periodo en el que fueron expuestos a concentraciones crecientes de alcohol (2, 4, 6, 8, hasta el 10%). Tras estos 58 días les fue retirado el etanol, y 7 días después se les reinstauró el consumo al 10% durante 4 días. A continuación se incrementaron las concentraciones de etanol hasta el 30%, para ver si los ratones eran capaces de controlar el consumo y reducir el volumen cuando se aumentaba la concentración de etanol. Tras esta prueba se evaluó a los animales en consumo de sacarina.

Autoadministración de drogas

Utilizando cajas de condicionamiento (modelo ENV-307, MedAssociated, EE.UU.) los animales fueron primeramente sometidos a una sesión de aprendizaje operante utilizando leche condensada, y aquellos que alcanzaron el criterio de al menos 100 recompensas recibidas fueron canulados en la vena yugular externa. Tras 48 h de recuperación postoperatoria, los animales se situaron en las cajas operantes durante 90 min diarios, donde la pulsación de la palanca activa resultó en la administración de 0,2 mg/kg de morfina o 0,65 mg/kg de cocaína (0,65 ml/min) seguido de 10 s de inactivación de la palanca para prevenir sobredosis[22].

Sensibilización locomotora a las drogas

El procedimiento de sensibilización utilizado es una modificación del descrito por Martín et al[22]. Los animales fueron habituados a las cajas de actividad locomotora durante 3 días y posteriormente inyectados crónicamente con dos dosis diarias de morfina (15 mg/kg, i.p.), cocaína (10 mg/kg, i.p.) o salino durante 15 días, ensayándose la actividad locomotora aguda tras la primera inyección y posteriormente cada 3 días. Finalizado el tratamiento los animales descansaron durante 5 días, y a las 24 h fueron inyectados de nuevo con las mismas dosis anteriores y ensayada su actividad locomotora.

Lesiones estereotáxicas

Bajo anestesia de halotano (Rhodia Ltd) se colocó a ratones macho (6 a 8 semanas de edad) C57B6 x SV/129 en el aparato estereotáxico (modelo 900 small animal stereotaxic, KOPF Instruments). Se realizó una ablación selectiva de las neuronas que expresan el receptor NK1 mediante inyecciones bilaterales de la neurotoxina SP-saporina, SP-SAP (Advanced Targeting Systems), 1 µl 10^{-6} M. Este conjugado neurotóxico se une únicamente al receptor NK1 e induce la muerte específica de las neuronas que lo expresan (núcleo *accumbens*: AP + 1,20 mm, ML ± 1,00 mm, DV – 4,20 mm; amígdala: AP – 1,46 mm, ML ± 2,80 mm, DV – 4,80 mm). Los animales control recibieron inyecciones bilaterales de la toxina saporina individualmente, SAP (Advanced Targeting Systems), 1 µl 10^{-6} M o de la SP (Sigma), 1 µl 10^{-6} M bajo las mismas condiciones. Tras 5 semanas poslesión se monitorizó la actividad locomotora y el CPP inducido por morfina, así como la localización y la extensión de la lesión mediante inmunohistoquímica usando los anticuerpos para el receptor NK1, NeuN, GFAP y ChAT.

Resultados

Análisis de los efectos de morfina en animales carentes del gen NK1

Inicialmente se estudió la conducta motora de los ratones mutantes en campo abierto y su respuesta exploratoria, resultando ser indistinguibles del grupo de animales silvestres (fig. 1A,B). Sin embargo, mientras que los animales silvestres mostraron la ya descrita estimulación motora inducida por morfina, los animales mutantes no mostraron efectos psicoestimulantes incluso a dosis altas (fig. 1C).

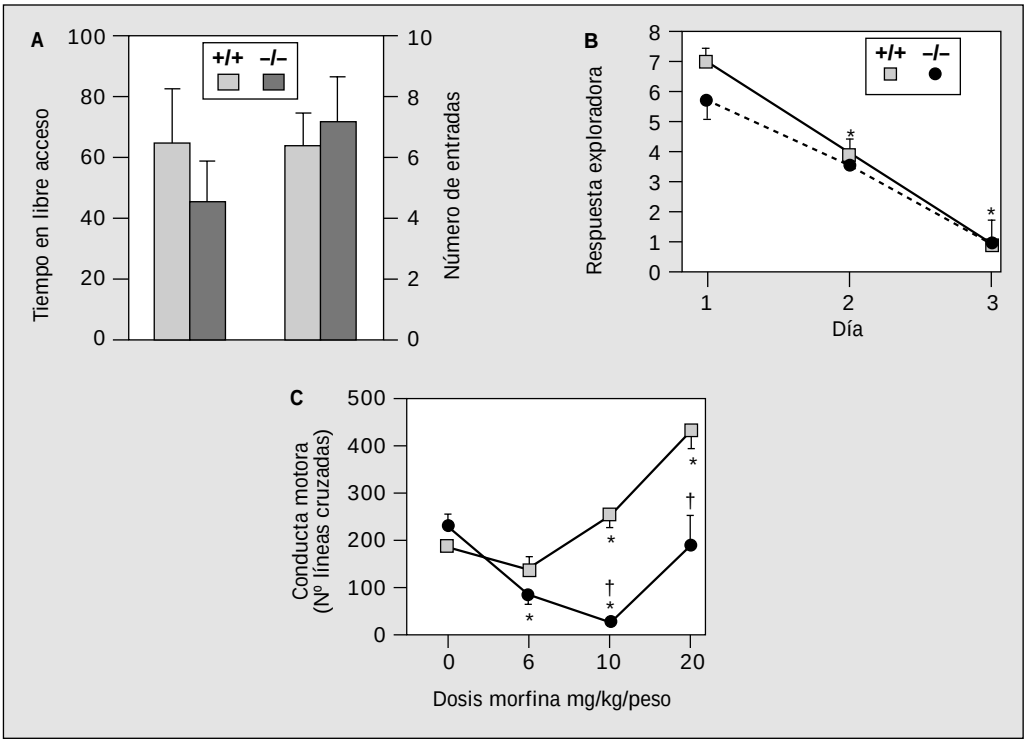


Fig. 1. Ausencia de incremento de la actividad locomotora en animales NK1-/- tras la administración de morfina
A. Conducta de los ratones NK1-/-en el laberinto de cruz elevado. El tiempo transcurrido en los brazos abiertos y el número de visitas al brazo abierto fueron similares en ambos genotipos. Los datos son la media ± ESM analizados usando two-way ANOVA y Dunnett´s test, n = 10 por grupo.
*B. Respuesta exploratoria de animales NK1-/-y silvestres en campo abierto en condiciones estresante de iluminación y conteniendo objetos desconocidos. Los valores representan el número de visitas a los objetos desconocidos (media ± ESM). El número de líneas cruzadas por el animal silvestre fueron: día 1, 116,2 ± 20,9; día 2, 89,7 ± 13,9; día 3, 80 ± 26; y para el NK1-/- fueron: día 1, 111,6 ± 10,4; día 2,113 ± 7,2; día 3,123 ± 13. El número de elevaciones, aseos y defecaciones fue similar en ambos genotipos. * p<0,05 versus el mismo grupo el día 1 (Dunnett´s test, n = 10).*
*C. Respuesta motora a la administración de morfina en animales silvestres (línea continua) y en NK1-/- (línea discontinua), en condiciones no estresantes. El número de líneas cruzadas del campo abierto se midieron tras la inyección de 3 dosis de morfina. Los valores representan la media ± ESM (n = 6), **p<0,002, *p<0,05, versus grupo salino del mismo genotipo, † p<0,001 versus tipo silvestre recibiendo el mismo tratamiento. Los datos se analizaron usando el test t de Student bilateral.*

La acción estimulante motora de morfina puede estar ligada a sus propiedades reforzantes[19], por lo que se estudió la capacidad recompensante de morfina utilizando el CPP. A la dosis de 1 mg/kg, morfina no indujo CPP en ninguno de los dos genotipos, pero a las dosis de 3 mg/kg los animales silvestres mostraron una clara preferencia por el compartimento asociado a la droga que no estuvo presente en los mutantes NK1$^{-/-}$ (fig. 2). Estos datos indican que los animales carentes del receptor NK1 no son capaces de registrar los efectos reforzantes positivos que induce morfina, por lo que nos preguntamos si serían capaces de registrar los efectos negativos de su ausencia cuando fueran dependientes de la droga. En el ensayo de aversión de plaza los animales silvestres mostraron una clara aversión por el compartimento asociado al síndrome de abstinencia inducido por naloxona, mientras que los mutantes mostraron una menor evitación por el compartimento que fue estadísticamente significativa (fig. 3).

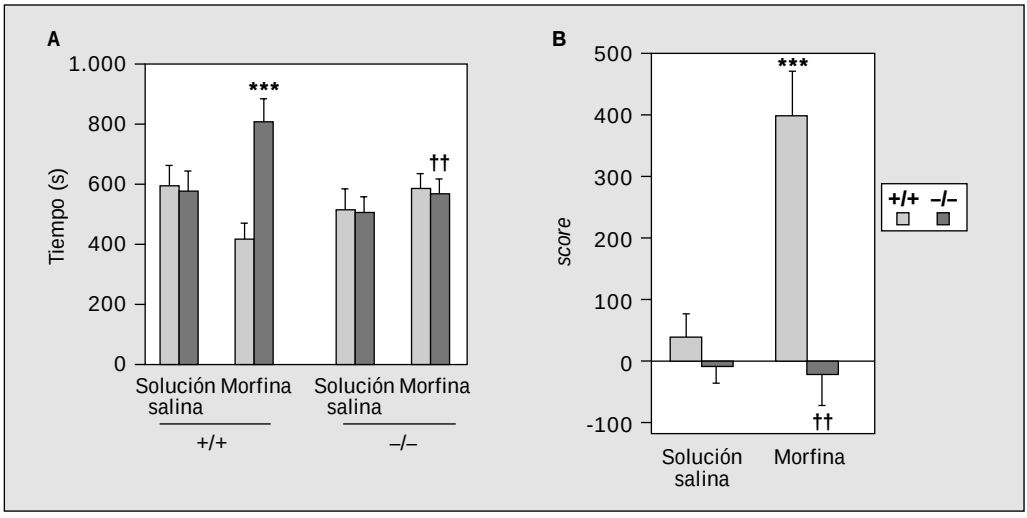


*Fig. 2. Ausencia de preferencia de condicionamiento de plaza inducido por morfina (3 mg/kg, s.c.), en animales NK1-/- comparado con silvestres. A) Tiempo transcurrido en el compartimento asociado a la droga durante el precondicionamiento (barras blancas) y en la fase de test (barras negras). Los valores representan la media ± ESM, ***p<0,001, versus grupo salino del mismo genotipo, †† p<0,02, versus grupo silvestre recibiendo el mismo tratamiento. B) Diferencia entre los tiempos transcurridos durante el postcondicionamiento y precondicionamiento en el compartimento asociado a la droga. Los datos fueron analizados con el test de Dunnett', n = 12 para el grupo de morfina, n = 10 para el grupo de salino.*

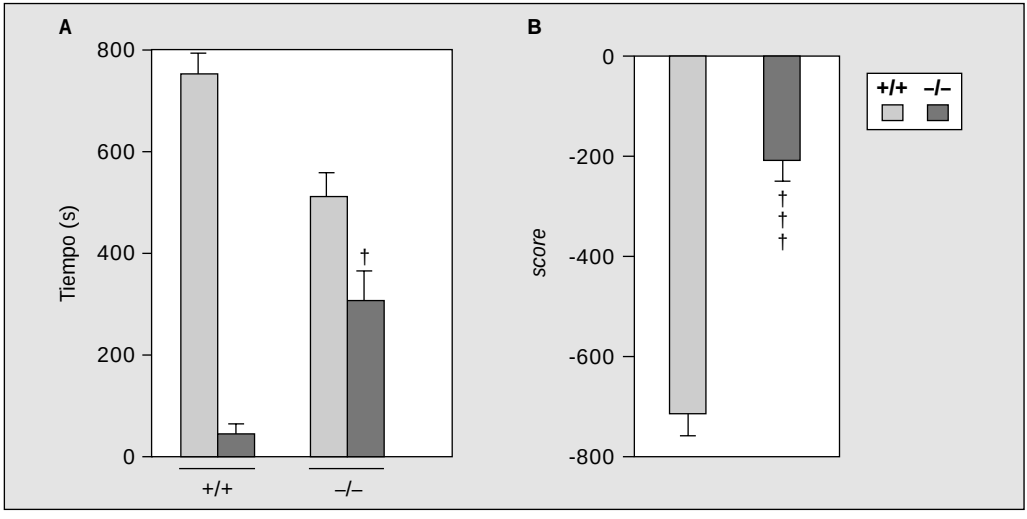


*Fig. 3. Efecto de la administración de naloxona (1 mg/kg) sobre el ensayo de aversión de plaza condicionada en animales mutantes y silvestres. A) Representa el tiempo de permanencia en el compartimento asociado al síndrome de abstinencia durante la fase de precondicionamiento (barra gris) y durante la fase de test (barra negra). Cada barra representa la media ± SEM del tiempo de permanencia para cada grupo experimental (n = 6 silvestres, n = 10 mutantes). B) Representa los datos expresados en puntuación de preferencia de plaza, score, para ratones silvestres (barra gris) y mutantes (barra negra). ***p<0,001, diferencias significativas entre los dos genotipos bajo el mismo tratamiento (test t de Student)*

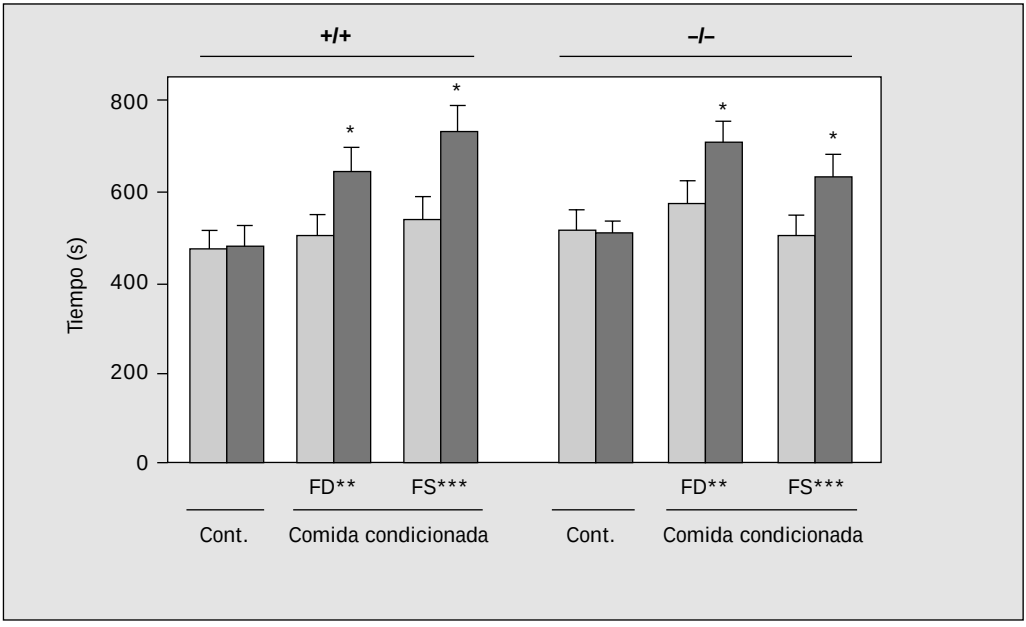


*Fig. 4. Efecto del condicionamiento inducido por comida sobre el ensayo de preferencia de plaza condicionada en animales NK1-/-. Representa el tiempo de permanencia en el compartimento asociado a la comida durante la fase de precondicionamiento (barra gris) y durante la fase de test (barra negra) en animales condicionados a comida. Grupo FD animals deprivados de comida, grupo FS animals saciados de comida. N = 8, * p<0,05 diferencias significativas entre el grupo control y los grupos condicionados (test t Student).*

Con el fin de descartar que la ausencia de CPP pudiera deberse a deficiencias de aprendizaje y memoria, se realizaron una serie de experimentos en los que se usó el recompensante natural comida en dos estados motivacionales de los animales, a saber animales saciados y animales deprivados de comida. En ambos estados y en ambos genotipos se estableció preferencia de plaza a comida indicando que los efectos observados con morfina parecen ser específicos para esta droga y no son consecuencia de alteraciones en otros sistema cerebrales (fig. 4).

Se estudiaron los signos somáticos de la abstinencia morfínica, en animales dependientes, desencadenados mediante la administración del antagonista opiáceo naloxona. Los animales recibieron dos inyecciones diarias de dosis crecientes de morfina (20-100 mg/kg) durante 5 días. A los 60 min de la última inyección se les administró naloxona (1 mg/kg), observándose que todo el rango de síntomas clásicos de abstinencia estaba presente en ambos genotipos, excepto la conducta del salto, que sólo se manifestó en los animales $NK1^{+/+}$. El salto está considerado el componente motor dominante del síndrome de abstinencia, y por ello existieron diferencias estadísticamente significativas en la puntuación global del síndrome (fig. 5), lo que sugiere que los animales mutantes presentan una atenuación de la abstinencia morfínica. Estos resultados son consistentes con los previamente descritos utilizando antagonistas NK1 (i.c.v.) en ratas[23].

Los experimentos de autoadministración demostraron que los $NK1^{-/-}$ se administran menos morfina que los $NK1^{+/+}$, a pesar de que se administran mucha más leche condensada, es decir, los animales mutantes no adquirieron respuesta operante para obtener inyecciones intravenosas de morfina pero sí para obtener comida[24] (fig. 6). Estos datos sugieren claramente que la recompensa opiácea requiere que la funcionalidad de la transmisión SP-érgica se encuentre intacta.

A pesar de la pérdida de los efectos reforzantes de morfina, sus propiedades analgésicas no se encuentran alteradas en los animales mutantes. Las curvas dosis/efecto utilizando los ensayos de placa caliente e inmersión de la cola son idénticas en ambos genotipos. Así mismo, no existen dife-

rencias en cuanto al establecimiento de tolerancia a dicho efecto analgésico (figs. 7 y 8).

Se realizaron, además, experimentos bioquímicos encaminados a dilucidar las posibles alteraciones en receptores cerebrales y genes de expresión temprana. Mediante ensayo de unión de ^{3}H-DAMGO a membranas cerebrales se estudió el número y la afinidad de los receptores opioides μ, no encontrándose diferencias significativas entre ambos genotipos (NK1$^{+/+}$: $B_{máx}$: 0,16 ± 0,037 pmol/μg de proteína, Kd: 6,12 ± 1,73 nM; NK1$^{-/-}$: 0,12 ± 0,01 pmol/μg de proteína, Kd: 4,4 ± 0,5 nM). Así mismo, tampoco se encontraron diferencias entre genotipos en la funcionalidad de este receptor opioide, evaluado mediante medida de la actividad adenilatociclasa y la producción de adenosinmonofosfato cíclico, en condiciones basales o después de tratamiento agudo, crónico o en abstinencia inducida por naloxona (fig. 8).

Debido al papel de los receptores dopaminérgicos en la recompensa opiácea[25], también estudiamos la expresión de los receptores D1 y D2 mediante hibridación *in situ.* De nuevo, no existieron diferencias significativas entre genotipos indicando que su expresión en NK1$^{-/-}$ está inalterada.

Finalmente, los cambios plásticos a largo plazo que se desarrollan durante el tratamiento con opiáceos o psicoestimulantes parecen estar ligados con la expresión de genes de expresión temprana, en particular Fos-B y su isoforma truncada ΔFos-B, en el núcleo *accumbens*[26]. El estudio semicuantitativo por inmunofluorescencia y posterior análisis en microscopía confocal de ΔFos-B reveló el incremento ya descrito de esta isoforma tras el tratamiento crónico con morfina en los animales silvestres, pero no se observó en los animales mutantes. Este resultado indica que la activación de Fos-B podría estar ligada a la expresión de la recompensa en la dependencia opiácea[26,27].

Análisis de los efectos de otras drogas de abuso en animales carentes del gen NK1

Como se observa en la figura 9, las drogas anfetamina (1 mg/kg, i.p.), nicotina (0,5 mg/kg, i.p.) y cocaína (2,5, 5 y 10 mg/kg) indujeron una clara preferencia de plaza en animales NK1$^{+/+}$. Sin embargo, ni anfetamina ni tampoco nicotina fueron capaces de incrementar el tiempo de permanencia en el compartimento asociado a la droga en animales NK1$^{-/-}$ (fig. 10). Por el contrario, el CPP para la droga cocaína se mantuvo intacto y la autoadministración de esta droga es similar en los animales mutantes y silvestres (fig. 11).

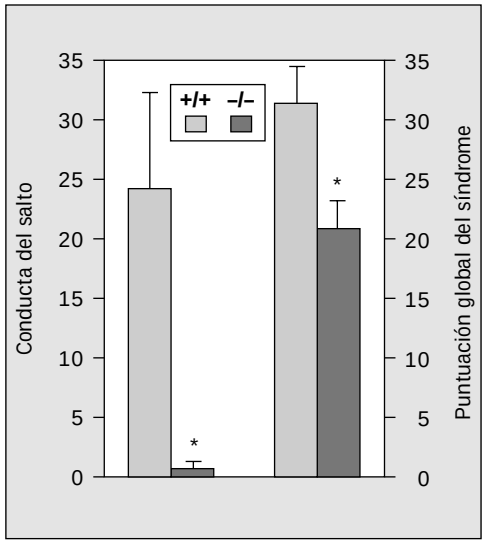


*Fig. 5. Medida de la intensidad del síndrome de abstinencia a opiáceos tras la administración de naloxona a ratones dependientes de morfina. El síndrome de abstinencia se precipitó una única vez en cada animal mediante la administración de naloxona (1 mg/kg, i.p), una hora después de la última inyección de morfina. Se evaluaron durante los siguientes 30 min los principales signos somáticos de abstinencia. A) Representa la puntuación en la conducta de salto en ratones silvestres (barra gris) y ratones mutantes (barra negra). B) Representa los datos expresados en puntuación global del síndrome de abstinencia. N = 10, *p<0,05, diferencias significativas entre ambos genotipos.*

Con respecto a la droga etanol, los animales NK1$^{-/-}$, utilizando un protocolo de autoadministración de 52 días, consumen menos etanol en la bebida y muestran una menor preferencia que los animales silvestres (fig. 10).

Estudio del sustrato neurobiológico de la recompensa opiácea en animales NK1$^{-/-}$

Habiendo observado que los ratones NK1$^{-/-}$ carecen de los efectos recompensantes del opiáceo morfina, nos preguntábamos lo siguiente: ¿qué pasaría si únicamente una población determinada de neuronas, o más concretamente un núcleo involucrado en los mecanismos de adicción, no tuviese el receptor NK1? Por esto, en este apartado, se quiso determinar la localización de las áreas cerebrales en las que la SP está implicada en la recompensa opiácea.

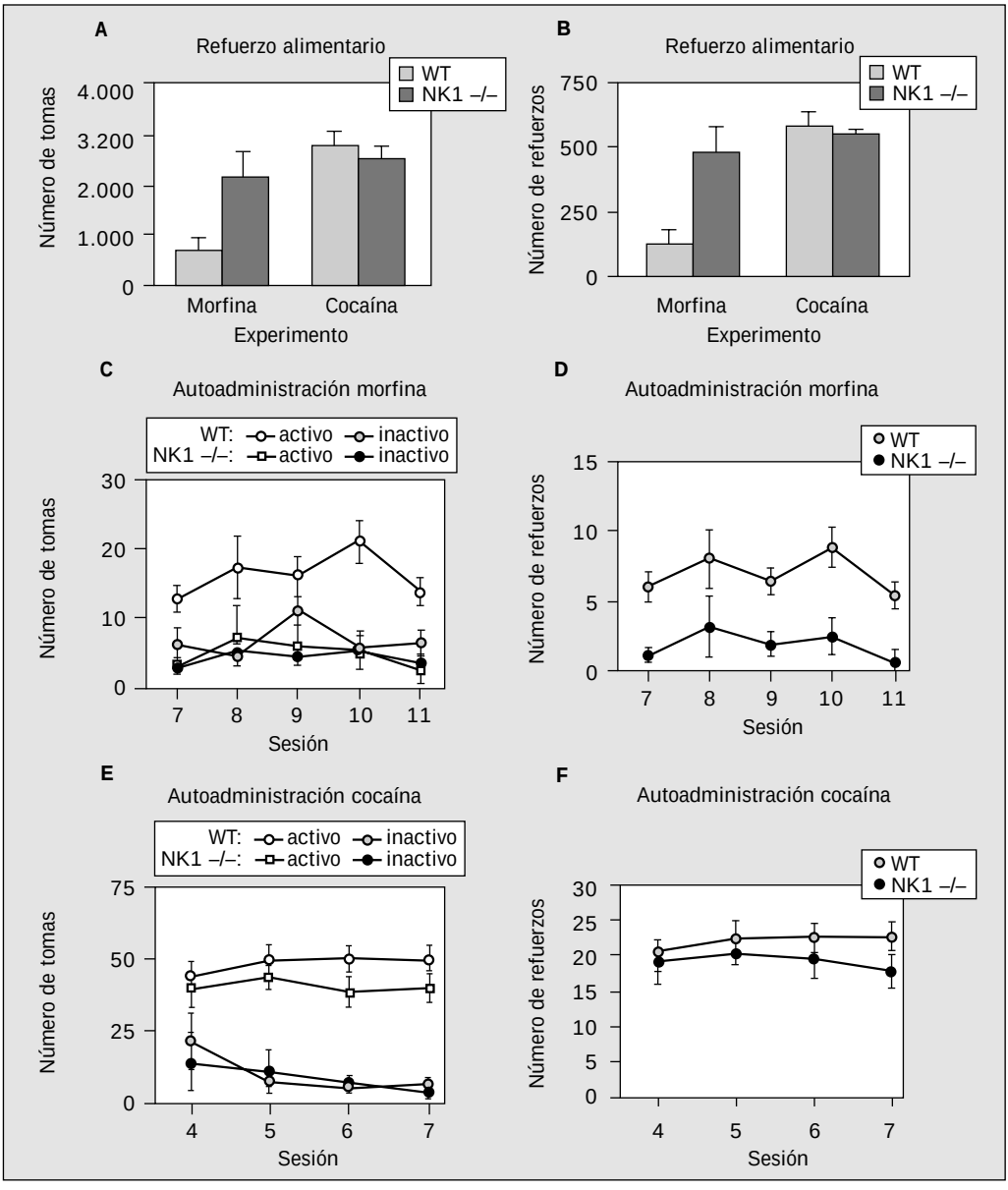


Fig. 6. Autoadministración de morfina y cocaína en ratones NK1-/-. A y B) Aprendizaje operante: En los experimentos de morfina los ratones mutantes emitieron mas presiones de palanca (p<0,05;A) y obtuvieron más recompensa (p<0,01, B) que los controles silvestres. Estas diferencias no se observaron en el experimento de cocaína. C y D) Autoadministración de morfina (aprox. 0,2 mg/kg/infusión): Los datos representan las sesiones de autoadministración 7 a 11 donde su respuesta fue estable. Los ratones NK1-/- (n = 4) no se administraron morfina a la dosis que indujo autoadministración en los animales silvestres (n = 5) (efecto de genotipo: p<0,05). Los animales silvestres presentaron un nivel más alto de presiones en la palanca activa que los mutantes. E y F) Autoadministración de cocaína (aprox. 0,65 mg/kg/infusión): los datos representan la autoadministración en las sesiones 4-7 donde la respuesta fue estable. Los ratones NK1-/- (n = 5) se autoadministraron el mismo número de infusiones de recompensa que los silvestres (n = 5) y ambos genotipos mostraron una alta respuesta en la palanca activa comparada con la inactiva (p<0,005).

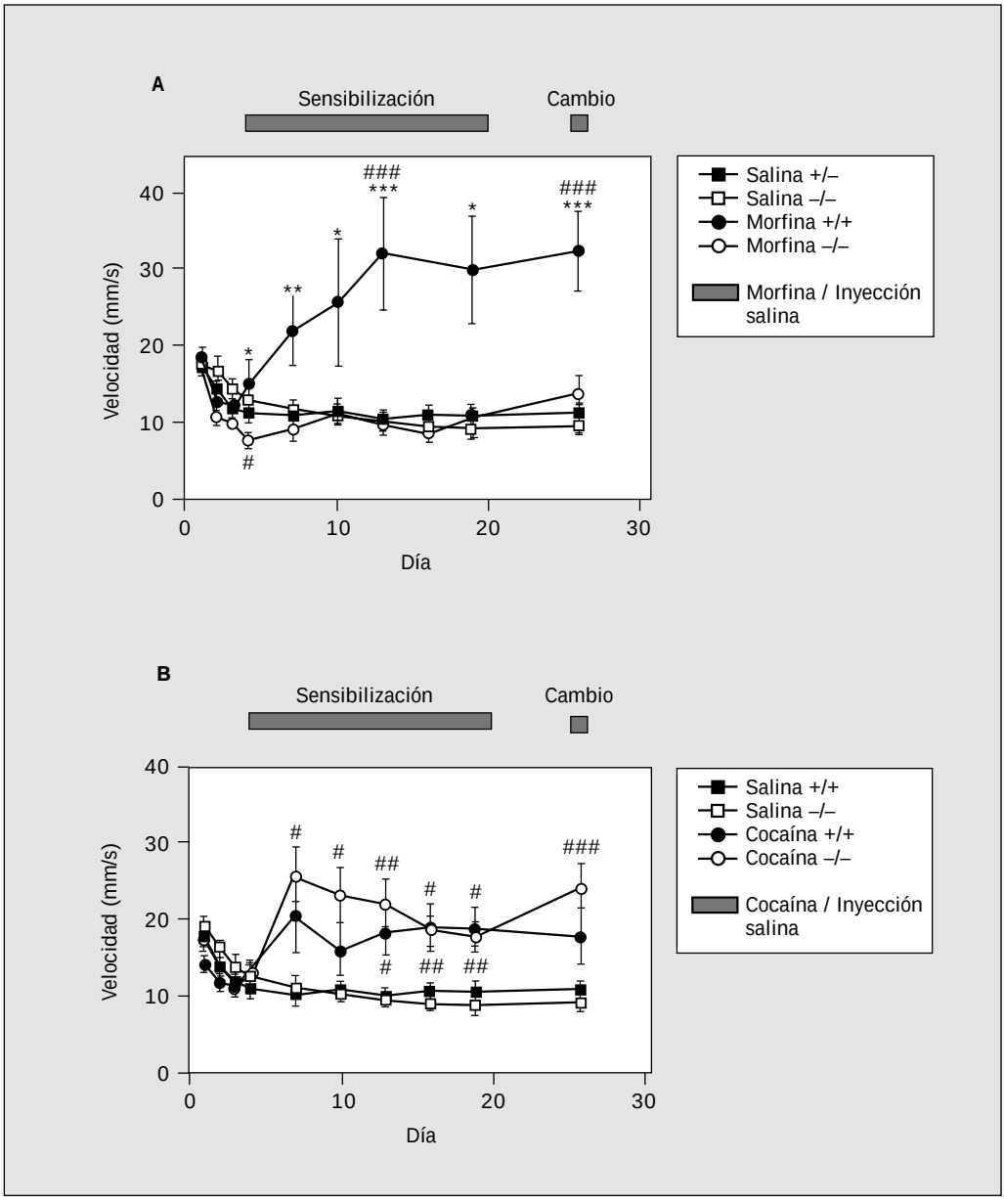


*Fig. 7. Sensibilización motora de morfina y cocaína en ratones knockout. A) Respuesta locomotora a morfina. Media ± SEM de la velocidad de movimiento por los animales NK1-/- y los animales silvestres durante el período de habituación a las cajas de actividad (días 1-3), administración de morfina crónica (15 mg/kg, i.p.) o salino (días 4-19, dos inyecciones por día), y tras una dosis de morfina (15 mg/kg, i.p.) o salino el día 26. B) Respuesta locomotora a cocaína. Media ± SEM de la velocidad de movimiento por los animales NK1-/- y los animales silvestres durante el período de habituación a las cajas de actividad (días 1-3), administración de cocaína crónica (10 mg/kg, i.p.) o salino (días 4-19, dos inyecciones por día), y tras una dosis de challenge de cocaína (10 mg/kg, i.p.) o salino el día 26. *p<0,05 vs. NK1-/-; **p<0,01 vs. NK1-/-; ***p<0,001 vs. saline; #p<0,05 vs. saline; ##p<0,01 vs. NK1-/-; ###p<0,001 vs. salino (Tukey post hoc comparisons).*

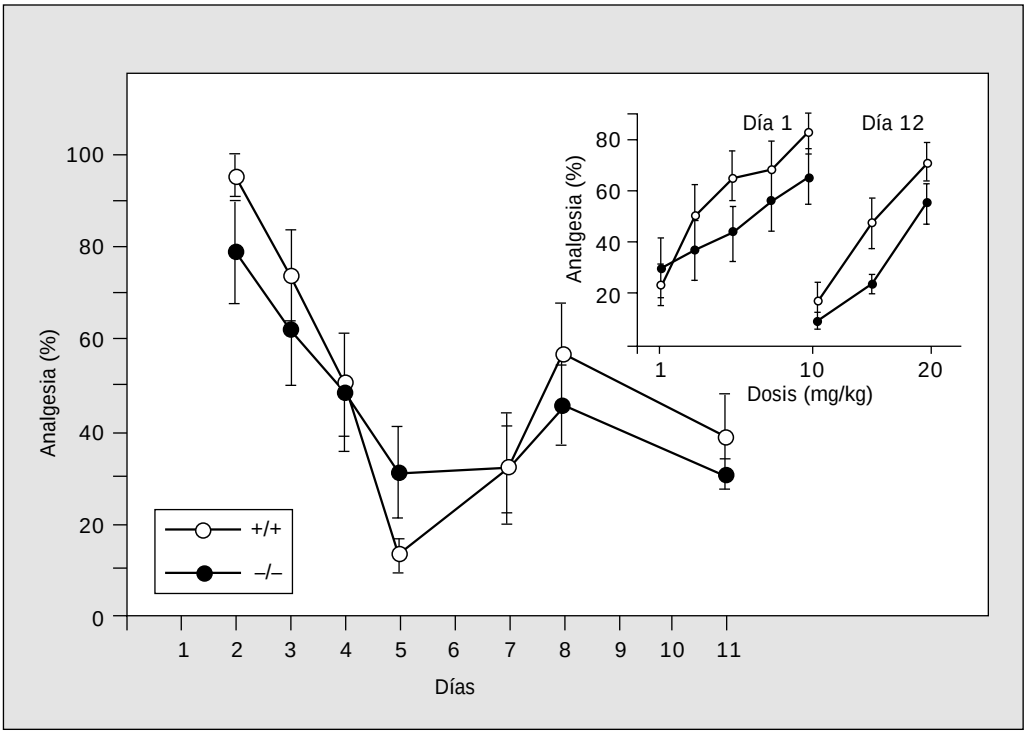


Fig. 8. Desarrollo de tolerancia a morfina. Los animales recibieron dos inyecciones diarias a intervalos de 12 h de 10 mg/kg de morfina, i.p. Treinta min después de la primera inyección se determinaron sus umbrales nociceptivos térmicos mediante el test de inmersión de cola. De cada dosis administrada se calculo el máximo efecto posible expresado en porcentaje. El fenómeno de tolerancia analgésica se desarrolló de manera similar en ambos genotipos. Inserto: Curvas dosis efecto de analgesia morfínica en animales no tratados (día 1) y tras desarrollar tolerancia a morfina (día 12). Las curvas no muestran diferencias significativas entre ambos grupos de animales (círculo abierto, animales silvestres; círculo cerrado, animales mutantes).

Para ello se utilizaron animales 129/Sv x C57BL/6 de primera generación, y mediante cirugía estereotáxica, se les inyectó bilateralmente por vía i.c.v. el conjugado neurotóxico SP-SAP, provocando una ablación selectiva *in vivo* de las neuronas que expresan el receptor NK1. Para ello se utilizaron dos grupos experimentales de animales diferenciados según el núcleo lesionado: grupo-NAc y grupo-amígdala, animales lesionados en el núcleo *accumbens* o en la amígdala, n = 14 y 16, respectivamente.

Tras 5 semanas de la lesión se midieron la actividad locomotora tras la administración i.p. de 10 mg/kg de morfina o de solución salina y el CPP inducido por morfina (3 mg/kg) o salino. Al finalizar los estudios de conducta se procedió a la localización y extensión de la lesión mediante técnicas de inmunocitoquímica.

En el ensayo del CPP, tras el condicionamiento a morfina, se observaron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo-amígdala con respecto al grupo-control, animales no lesionados, y al grupo-NAc. Los animales lesionados bilateralmente en la amígdala mostraron una disminución en el tiempo de permanencia en el compartimento asociado a la droga opiácea a diferencia del grupo-control y del grupo-NAc, que permanecieron, en el día del test, la mayor parte del tiempo en el compartimento asociado a la droga ($p < 0,05$). Los resultados también se expresaron como "puntuación de preferencia de plaza", *score*, donde se aprecia una disminución del *score* en el grupo-NAc con respecto al grupo-control pero sin ser esta diferencia significativa (fig. 12).

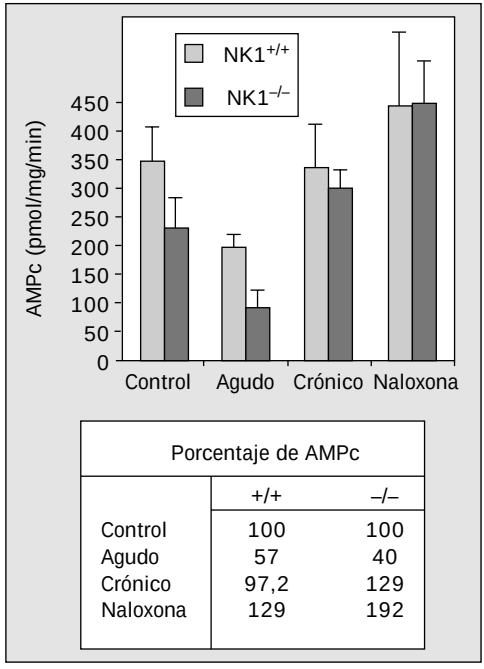
La actividad locomotora del grupo-amígdala también se vio alterada tras la administración de

morfina (10 mg/kg, i.p.), ya que no se produjo el aumento de locomoción esperado y sí estuvo presente en el grupo-control y en el grupo-NAc, donde en ambos grupos la locomoción aumentó.

Discusión

Los resultados de estos estudios proveen evidencias del papel de la SP en los mecanismos de recompensa a las drogas de abuso y en la adicción. Los datos fuertemente sugieren que debe de existir una sinapsis clave en el prosencéfalo basal (probablemente en la amígdala) entre colaterales que liberan SP y las grandes neuronas colinérgicas que expresan el receptor NK1. Dichas neuronas están implicadas en el aprendizaje asociativo y responden a estímulos que desencadenan una conducta operativa aprendida y recompensante[28-30].

La pérdida de los efectos recompensantes en los animales NK1$^{-/-}$ parece ser un mecanismo común para las drogas de abuso morfina, anfetamina, nicotina y alcohol, pero, sin embargo, en el caso de cocaína no se han encontrado diferencias con los animales silvestres. Existen pocos estudios en la literatura que describan una disociación entre los efectos conductuales de morfina/anfetamina y cocaína. Por ejemplo, las lesiones con ácido iboténico en el núcleo pedunculopontino de rata abolió el CPP para morfina y anfetamina, pero permaneció intacto el CPP de



Porcentaje de AMPc		
	+/+	–/–
Control	100	100
Agudo	57	40
Crónico	97,2	129
Naloxona	129	192

Fig. 9. Actividad adenilato ciclasa tras diferentes tratamientos de morfina en animales NK1-/- y silvestres. Las barras representan niveles de AMPc para cada grupo experimental. No se encontraron diferencias significativas.

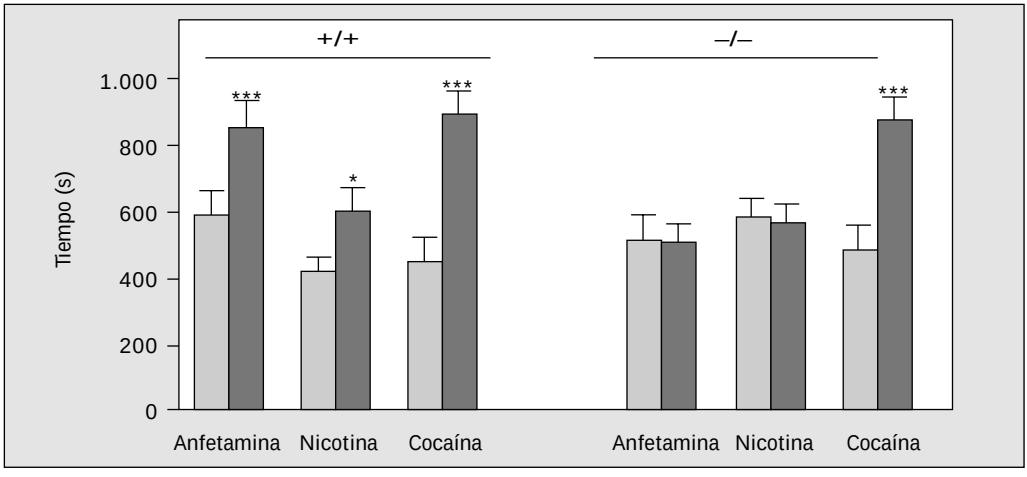


*Fig. 10. Ausencia de preferencia de condicionamiento de plaza inducido por anfetamina (1 mg/kg, s.c.), y nicotina (0,5 mg/kg) y presencia en el caso de cocaína (5 mg/kg) en animales NK1-/- comparado con silvestres. Tiempo transcurrido en el compartimento asociado a la droga durante el precondicionamiento (barras grises) y en la fase de test (barras negras). Los valores representan la media ± ESM, ***p<0,001, , versus grupo salino del mismo genotipo. Los datos fueron analizados con el test de Dunnett', n = 12 para el grupo de morfina, n = 10 para el grupo de salino.*

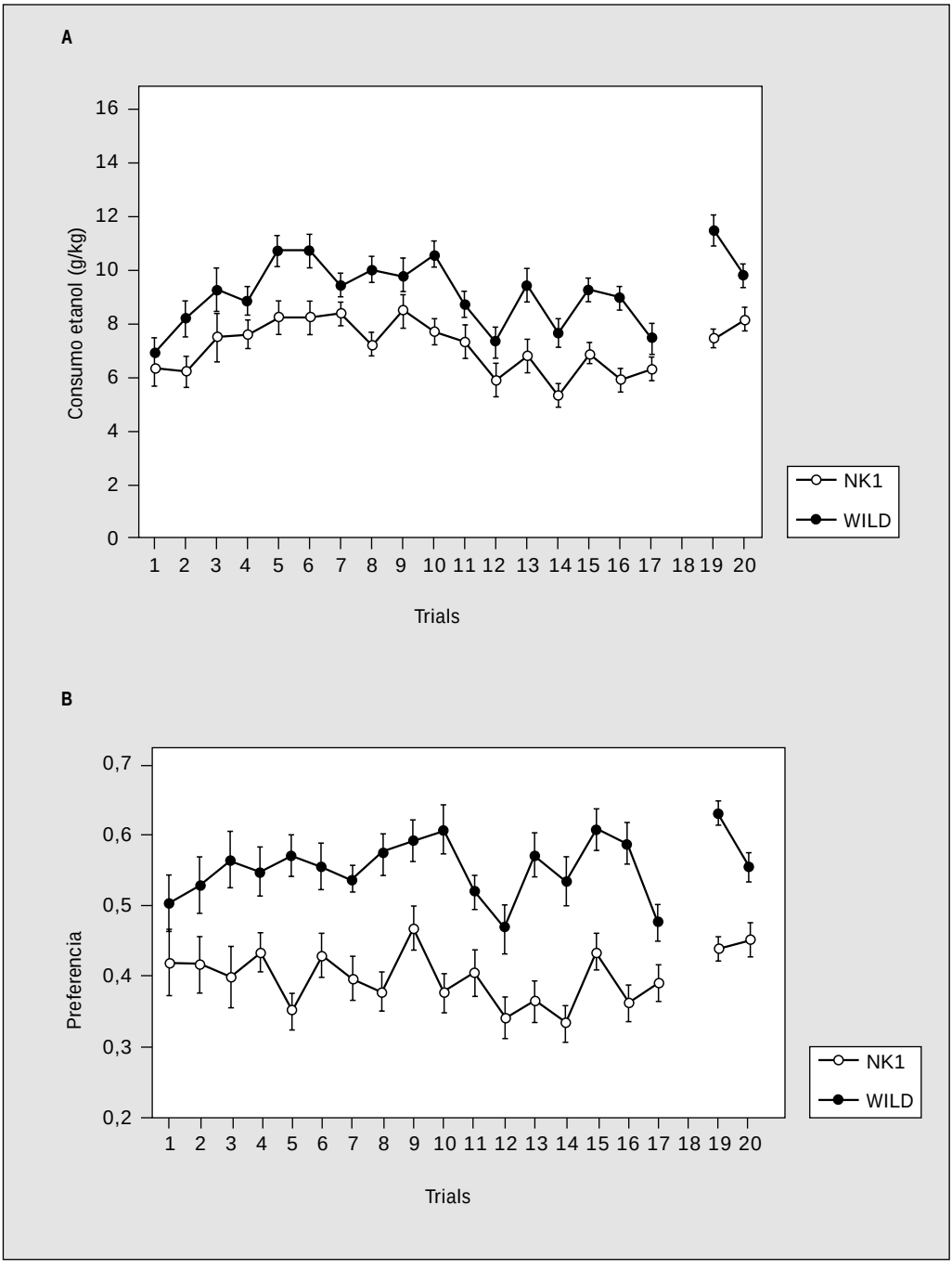


Fig. 11. Consumo de etanol en animales NK1-/-. A) Los animales mutantes consumen menos etanol desde el día 4 y presentan un patrón de reinstauración anómalo. B) Los animales mutantes muestran menos preferencia por el etanol durante todo el período de ingesta y también durante la restauración.

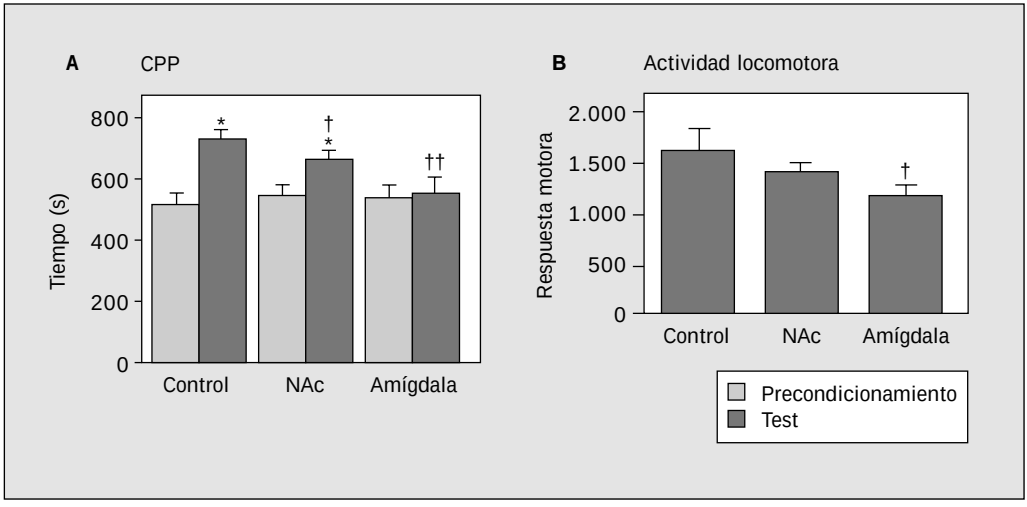


Fig. 12. Efecto de la administración de morfina (3 mg/kg) sobre el ensayo de preferencia de plaza en animales silvestres tras la inyección bilateral del conjugado neurotóxico SP-SAP. A) Representa el tiempo de permanencia en el compartimento asociado a la droga durante la fase de precondicionamiento (barra gris) y durante la fase de test (barra negra) en animales condicionados con 3 mg/kg de morfina. Se observa que la destrucción selectiva de las neuronas que expresan el receptor NK1 en la amigdala, pero no en el núcleo accumbens, modifica el desarrollo de condicionamiento de plaza. B) Efecto de la administración de morfina (10 mg/kg) en la actividad locomotora de animales silvestres tras la inyección bilateral de SP-SAP.

cocaína[31,32]. Las lesiones con ácido quinolínico del área prelímbica de la corteza prefrontal eliminó el CPP para cocaína sin alterar la respuesta de morfina y anfetamina[33]. Aunque estas dos áreas presentan baja inmunorreactividad para el receptor NK1, estas evidencias confirman que deben existir rutas separadas que median los aspectos motivacionales de estos dos grupos de drogas.

Esta novedosa implicación de la SP en los aspectos motivacionales de las drogas podría representar una nueva ruta farmacológica para el control del abuso de drogas. De una parte, queda disociado el efecto reforzante del efecto analgésico de morfina y, por tanto, se podría especular que la coadministración de antagonistas NK1 y morfina, para el tratamiento del dolor crónico, induciría el efecto analgésico esperado, pero que, sin embargo, se evitaría/retrasaría la aparición de efectos motivacionales (adicción). Por otra parte, para el tratamiento de la adicción los antagonistas NK1 ayudarían a reducir el síndrome de abstinencia y prevendrían las reincidencias por disminuir los niveles de ansiedad y la relevancia de las señales ambientales condicionadas, asociadas a la ingesta de drogas.

Además, podríamos especular que si enfermedades tan dispares como la depresión, la ansiedad y la adicción pueden, al menos en parte, estar bajo el control del sistema de SP, podría existir una predisposición del individuo a padecer estas enfermedades. Sabemos que las situaciones de estrés en la infancia predisponen a la drogadicción y depresión en la vida adulta. De forma que las presiones ambientales en un cerebro inmaduro podrían alterar los circuitos de SP para que el niño pueda soportarlas y, a la vez, paradójicamente, hacerlos vulnerables a sufrir alteraciones de conducta en la vida adulta, cuando los agentes estresantes reaparezcan. Similarmente, las alteraciones en el sistema de SP durante la progresión de la adicción podrían ser responsables de las recidivas tras las curas de desintoxicación exitosas.

BIBLIOGRAFÍA

1. Nakaya Y, Kaneko T, Shigemoto R, Nakanishi S, Mizuno N. Immunohistochemical localization of substance P receptor in the central nervous system of the adult rat. J Comp Neurol 1994; 347: 249-274.
2. Ballard TM, Sanger S, Higgins GA. Inhibition of shock-induced food tapping behaviour in the gerbil by a tachykinin NK1 receptor antagonist. Eur J Pharmacol 1989; 9: 3400-3409.

3. Rupniak NMJ, Kramer MS. Discovery of the antidepressant and anti-emetic efficacy of substance P receptor (NK_1) antagonists. Trends Pharmacol Sci 1999; 20: 485-490.
4. Rupniak NMJ, Carlson EC, Harrison T, Oates B, Seward E, Owen S et al. Pharmacological blockade or genetic deletion of substance P (NK(1)) receptors attennuates neonatal vocalisation in guinea-pigs and mice. Neuropharmacology 2000; 39: 1413-1421.
5. Papp JL, Vassout A, Gentsch C. The NK1-receptor antagonist NKP608 has an antidepressant-like effect in the chronic mild stress model of depresion in rats. Behav Brain Res 2000; 115: 19-23.
6. De Felipe C, Herrero JF, O'Brien JA, Palmer JA, Doyle CA, Smith AJ et al. Altered nociception, analgesia and aggression in mice lacking the receptor for substance P. Nature 1998; 392: 394-397.
7. Elliott PJ, Iversen SD. Behavioural effects of tachykinins and related peptides. Brain Res 1986; 381: 68-76.
8. Boix F, Sandor P, Nogueira PJC, Huston JP, Schwarting RKW. Relationship between dopamine release in nucleus accumbens and place preference induced by substance P injected into the nucleus basalis magnocellularis region. Neuroscience 1995; 64: 1045-1055.
9. Incola SM, Surmeier DJ, Malenka RC. Dopaminergic modulation of neuronal excitability in the striatum and nucleus accumbens. Ann Rev Neurosci 2000; 23: 185-215.
10. Berke JD, Hymán SE. Addiction, dopamine and the molecular mechanism of memory. Neuron 2000; 25: 515-532.
11. Nestler EJ. Molecular basis of long-term plasticity underlying addiction. Nat Rev Neurosci 2001; 2: 119-128.
12. De Vries TJ, Schoffelmeer AN, Binnekade R, Mulder AH, Vanderschuren LJ. Drug-induced reinstatement of heroin- and cocaine-seeking behaviour following long-term extinction is associated with expresión of behavioural sensitization. Eur J Neurosci 1998; 10: 3565-3571.
13. Kalivas PW. Interactions between dopamine and excitatory amino acids in behavioural sensitization to psychostimulants. Drug Alcohol Depen 1995; 37: 95-100.
14. Lu L, Xu NJ, Ge X, Yue W, Su WJ, Pei G et al. Reactivation of morphine conditioned place preference by drug priming: role of enviromental cues and sensitization. Psychopharmacology (Berl) 2002; 159: 125-132.
15. Trujillo KA. Are NMDA receptors involved in opiates-induced neural and behavioural plasticity? A review of preclinical studies. Psychopharmacology (Berl) 2000; 151: 121-141.
16. Vanderschuren LJ, Schffelmeer AN, Mulder AH, De Vries TJ. Dopaminergic mechanisms mediating the long-term expresión of locomotor sensitization following pre-exposure to morphine or amphetamine. Psychopharmacology (Berl) 1999; 143: 244-253.
17. Vanderschuren LJ, Kalivas PW. Alterations in dopaminergic and glutamatergic transmisión in the induction and expresión of behavioural sensitization: a critical review of preclinical studies. Psychopharmacology (Berl) 2000; 151: 99-120.
18. Wolf ME. The role of excitatory aminoacids in behaviuoral sensitization to psicomotor stimulants. Prog Neurobiol 1998; 54: 679-720.
19. Wise RA, Bozarth MA. A psychomotor stimulant theory of addiction. Psychol Rev 1987; 94: 469-492.
20. Matthes HW, Maldonado R, Simonin F, Valverde O, Slowe S, Kitchen I et al. LLoss of morphine-induced analgesia, reward effect and withdrawal symptoms in mice lacking the mu-opioid-receptor gene. Nature 1996; 383: 819-823.
21. Maldonado R, Saiardi A, Valverde O, Samad TA, Roques BP, Borrelli E. Absence of opiate rewarding effects in mice lacking dopamine D2 receptors. Nature 1997; 388: 586-589.
22. Martín M, Ledent C, Parmentier M, Maldonado R, Valverde O. Cocaine, but not morphine, induces conditioned place preference and sensitization to locomotor responses in CB1 knockout mice. Eur J Neurosci 2000; 12: 4038-4046.
23. Maldonado R, Girdlestone D, Roques B. PRP 67580, a selective antagonist of neurokinin-1 receptors, modifies some of the naloxone-precipitated morphine withdrawal signs in rats. Neurosci Lett 1993; 156: 135-140.
24. Ripley TL, GDA CA, De Felipe C, Hunt SP, Stephens DN. Lack of self-administration and behavioural sensitization to morphine, but not cocaine, in mice lacking NK1 receptors. Neuropharmacology 2002; 43: 1258-1268.
25. Maldonado R, Saiardi A, Valverde O, Samad TA, Roques BP, Borrelli E. Absence of opiate rewarding effects in mice lacking dopamine D2 receptors. Nature 1997; 388: 586-589.
26. Nye HE, Nestler EJ. Induction of chronic Fos-related antigens in rat brain by chronic morphine administration Mol Pharmacol 1996; 49: 636-645.
27. Kelz MB. Expresion of the transcription factor delta FosB in the brain controls sensitivity to cocaine. Nature 1999; 401: 272-276.
28. Elliott PJ, Iversen SD. Behavioural effects of tachykinins and related peptides. Brain Res 1986; 381: 68-76.
29. Boix F, Sandor P, Nogueira PJC, Huston JP, Schwarting RKW. Relationship between dopamine release in nucleus accumbens and place preference induced by substance P injected into the nucleus basalis magnocellularis region. Neuroscience 1995; 64: 1045-1055.
30. Graybiel AM, Aosaki T, Flaherty AW, Kimura M. The basal ganglia and adaptative motor control. Science 1994; 265: 1826-1831.
31. Bechara A, van der Kooy D. The tegmental pedunculopontine nucleus: A brainstem output of the limbic system critical for the conditioned place preferences produced by morphine and amphetamine. J Neurosci 1989; 9: 3400-3409.

32. Parker JL, van der Kooy D. Tegmental pedunculopontine nucleus lesions do not block cocaine reward. Pharmacol Biochem Behav 1995; 52: 77-83.
33. Tzschentke TM, Schmidt WJ. Discrete quinolinic acid lesions of rat prelimbic medial prefrontal cortex affect cocaine- and MK801 but not morphine and amphetamine-induced reward and psicomotor activation as measure with the place preference conditioning paradigm. Behav Brain Res 1998; 97: 115-127.

DISCUSIÓN

E. AMBROSIO: En el estudio con receptores μ, ¿el marcaje lo habéis realizado con el cerebro entero de los animales o con regiones?

C. DE FELIPE: Hemos utilizado membranas de estriado, ya que en el ratón queríamos hacerlo en *accumbens*, pero el tejido no era suficiente.

E. AMBROSIO: Sugiero realizarlo mediante autorradiografía para tener un mejor estudio de la distribución. Cuando se lleva a cabo con membranas, aunque no notéis cambios en la afinidad o en el número de receptores, la autorradiografía ofrece una visión más precisa y quizás completa de los posibles cambios.

C. DE FELIPE: ¿Te refieres a otras regiones del cerebro?

E. AMBROSIO: No, incluso en ésa. Otra región interesante es también el tálamo, en el cual hay muchos receptores opiáceos.

C. DE FELIPE: Como no queríamos encontrar alteraciones, tampoco miramos mucho más, porque realmente lo que queríamos era adscribirlo a la sustancia P, y entonces nos gustó que no hubiera alteraciones en este receptor opioide.

E. AMBROSIO: Otra sugerencia es estudiarlo en el sistema nervioso periférico, ya que la sustancia P está muy ligada al control del dolor. Me parecería interesante que ampliarais ese estudio si no lo habéis hecho ya.

C. DE FELIPE: Sí, el estudio de dolor lo tenemos hecho, lo publicamos en 1998, y observamos que no hay alteraciones en el dolor agudo. Sin embargo, en ciertos tipos de dolor o de hiperalgesia sí que se encuentra alterado. Por ejemplo, no aparece *wind-up* espinal tras la estimulación nociva, y hemos observado también que hay alteraciones en las vías descendentes inhibitorias del dolor. Claro, lo primero que estudiamos en este ratón fue el dolor.

R. MALDONADO: Me parece muy curioso la falta de sobreexpresión de ΔFos-B en los animales. Sabéis que el grupo de Nestler describe una correlación, teóricamente, entre la expresión de ΔFos-B y las propiedades reforzantes tanto de psicosimulantes como de opiáceos. ¿Cómo explicas esta ausencia de refuerzo con morfina pero esta permanencia del refuerzo inducido por cocaína si ΔFos-B no se expresa?

C. DE FELIPE: Los experimentos del Fos-B los hicimos sólo con morfina, la cual no lo incrementaba, pero no los realizamos con cocaína. Digamos que el número de células que se iluminan es el mismo, pero la cantidad medida con inmunofluorescencia y microscopía confocal no varía en los animales mutantes. En cambio, existe una gran elevación en los animales silvestres. Se correlacionaba muy bien con morfina, aunque no hemos llevado a cabo el experimento con cocaína.

R. MALDONADO: El tema de la ausencia de efecto ansiolítico en los animales choca un poco, viendo, por ejemplo, el resultado de A. Zimmer con el *knockout* de sustancia P o los resultados que tú comentabas de los estudios clínicos.

C. DE FELIPE: El efecto ansiolítico en estos ratones es muy difícil de estudiar. En determinadas pruebas de ansiedad observamos diferencias, en tanto que en otras no se aprecia ninguna. Da la impresión de que tiene que haber alteraciones que sólo se manifiestan cuando realmente el animal ha estado sufriendo un estrés agudo. Sin embargo, la exposición simplemente a un campo claro o a luz no es suficiente para detectar diferencias.

R. MALDONADO: ¿Y por qué cuando se hace el *knockout* de la sustancia P sí que aparece la respuesta?

C. DE FELIPE: La neuroquinina A o la eliminación de las dos, es decir, neuroquinina A y sustancia P. No lo sé. Ya te digo que los ensayos que hemos realizado en ansiedad son controvertidos, porque unos nos dan diferencias y otros no. Por ejemplo, en el ensayo de la caja blanca y negra tenemos diferencias, en cambio en el *elevated plus maze* no vemos ninguna diferencia.

C. FAURA: Respecto a los receptores opioides, y dada la relación estrés y sistema opioide endógeno, ¿os habéis planteado estudiar otros receptores, Δ o κ o incluso el grado de dimerización? En los últimos años se está sugiriendo que diferencias en el grado de dimerización pueden potenciar o disminuir distintas acciones opioides, como puede ser la tolerancia, etc. Quizá

estas diferencias de los receptores NK1 podrían estar modulando otros sistemas.

C. De Felipe: No cabe duda que de podría haber alteraciones, lo que pasa es que si sólo hubiéramos encontrado diferencias con morfina podríamos pensar que el efecto es puramente opioide. Sin embargo, lo obtenemos también con nicotina, con etanol y con anfetamina. Entonces, el efecto no lo podemos adscribir ni al μ ni al Δ. Parece depender de una modulación del sistema global por sustancia P. Puede que haya también diferencias en otros receptores, pero la anfetamina no va a estar actuando sobre el receptor Δ, obviamente. Por eso no nos hemos planteado ese tipo de estudio.

M.A. Hurlé: Te quería preguntar sobre la falta o la atenuación del síndrome de abstinencia en estos animales, que, sin embargo, desarrollan tolerancia a la acción analgésica. ¿Probasteis si esto se repite con otras drogas de abuso, como el etanol, por ejemplo? Llama la atención el hecho de que no tengan aversión de plaza. Puede ser porque disminuye el síndrome de abstinencia, pero también podría ser que el nivel de estrés o de ansiedad durante el síndrome de abstinencia, y no solamente las alteraciones motoras, pudiera estar atenuado.

C. De Felipe: No. No hemos probado nada, la verdad es que sí que podíamos haberlo hecho.

Participación del sistema límbico en la neurobiología de la adicción

F. Rodríguez de Fonseca

Unidad de Investigación, Fundación Hospital Carlos Haya de Málaga.

Introducción

La adicción a drogas es una enfermedad crónica, recidivante, que se caracteriza por la pérdida del control sobre el uso de una sustancia que pasa a ocupar un lugar preferencial en la vida del individuo. Es una enfermedad en la que se alteran los mecanismos de control de la conducta, en especial, los que atañen al control motivacional y emocional. Este artículo pretende revisar el papel que ejercen en la adicción las estructuras encefálicas que participan en la organización de las conductas motivadas, y que se agrupan bajo el nombre genérico de sistema límbico. Este sistema participa tanto en el procesamiento de los fenómenos agudos de recompensa que activan las drogas de abuso como en las neuroadaptaciones asociadas a la administración crónica de dichas drogas y en los fenómenos de aprendizaje que conducen a la formación del hábito anómalo que caracteriza a los adictos.

Sistema límbico

El sistema límbico es un conjunto de elementos del sistema nervioso mal definido en sus límites anatómicos, pero estrechamente relacionado desde el punto de vista estructural y funcional. El nombre deriva del *lóbulo límbico*, definido por Paul Broca como el conjunto de estructuras corticales que rodean al tronco cerebral (limbus = borde). Estas estructuras eran consideradas filogenéticamente como la corteza más antigua. Los trabajos pioneros de James Papez y de Paul Maclean sirvieron para identificar los elementos principales de este sistema, así como para describir sus circuitos principales y atribuirles un papel fundamental en el procesamiento de la información emocional y motivacional[1-3].

En el telencéfalo, el sistema límbico incluye una serie de anillos corticales constituidos por el córtex prefrontal medial, el córtex cingulado, el hipocampo y sus áreas corticales adyacentes. Este anillo rodea a una serie de estructuras subcorticales de la que destacan el complejo amigdalar ampliado (núcleos septales, *shell* del núcleo *accumbens,* núcleos de la amígdala) y el núcleo del lecho de la estría terminal. En el diencéfalo los componentes principales son el epitálamo (habénula), la zona lateral hipotalámica y la denominada *zona incerta*. En el mesencéfalo, el sistema límbico incluye varios núcleos localizados a lo largo del plano medial, destacando el área tegmental ventral, la sustancia gris central, el núcleo interpeduncular y los núcleos del rafe dorsal[4,5].

El sistema límbico ejerce un papel fundamental en los procesos homeostáticos al regular los procesos emocionales y orquestar los comportamientos motivados (incluyendo la alimentación, la bebida, el comportamiento social o el reproductor). Para ello, trabaja en estrecha asociación funcional con el sistema endocrino y el sistema nervioso autónomo. De hecho, la dinámica funcional del sistema límbico está sujeta a la regulación periférica que ejercen las hormonas esteroideas, en especial los glucocorticoides, considerados como la piedra angular de las respuestas adaptativas generales del organismo[3]. Las hormonas esteroideas actúan a través de receptores específicos, que están presentes llamativamente en células de elementos claves del sistema límbico, como el hipocampo o las neuronas monoaminérgicas mesencefálicas que proyectan a las estructuras límbicas del telencéfalo.

Por último, y para destacar el carácter integrador de este sistema funcional, algunas de las estructuras límbicas son piezas clave en el procesamiento cognitivo, especialmente en lo que atañe a los procesos de memoria declarativa (episódica) e implícita (hábitos y condicionamientos)[5-7].

Estructuras límbicas y efectos agudos de las drogas: el sustrato del refuerzo positivo

El papel del sistema límbico en la adicción no puede entenderse sin el descubrimiento transcendental por Olds y Milner de los circuitos de recompensa en 1954[8]. Mediante el paradigma de la autoestimulación eléctrica cerebral, se pudo establecer rápidamente un mapa de las regiones del cerebro que favorecían dicha autoestimulación[9]. Dichos estudios demostraron rápidamente que las drogas de abuso eran capaces de estimular los circuitos de recompensa cerebral, alterando los umbrales de excitación necesarios para sostener la conducta de autoestimulación.

Dicho circuito de recompensa cerebral incluye la mayor parte de las estructuras del sistema límbico, con una preferencia clara por aquellos situados en los extremos del haz prosencefálico medial, un fascículo de fibras de asociación que conecta estructuras mesencefálicas como el área del tegmento ventral (VTA), con estructuras telencefálicas como el núcleo *accumbens*, la amígdala o la corteza prefrontal medial. Estudios subsiguientes demostraron que los animales de experimentación se autoadministraban las drogas de abuso, precisamente en esas estructuras límbicas del sistema de recompensa, pero no en otras áreas cerebrales[9-10].

Este sistema de recompensa se corresponde con el origen y los campos de proyección del sistema dopaminérgico mesotelencefálico, cuyos cuerpos neuronales se ubican en la VTA. De hecho, se pudo comprobar muy pronto que los mecanismos de recompensa cerebral necesitaban la integridad funcional de este sistema dopaminérgico y de sus conexiones inmediatas. En los últimos 15 años se ha podido comprobar cómo todas las drogas de abuso incrementan la actividad eléctrica de las neuronas dopaminérgicas de la VTA[11,12] e incrementan la liberación de dopamina en sus campos de proyección, en especial en el denominado *shell* del núcleo *accumbens*[13]. Un papel similar se ha establecido para otros sistemas ascendentes monoaminérgicos, como el serotonérgico, que parte de los núcleos del rafe dorsal, y el noradrenérgico, que parte del *locus coeruleus*[14]. Ambos sistemas moduladores participan en los procesos que inician y mantienen la autoadministración de drogas, al modular el procesamiento de la señal de refuerzo, en especial a través de su función como reguladores de los procesos perceptivos y atencionales, respectivamente.

En general, el incremento en la actividad de las neuronas dopaminérgicas del VTA se ha considerado como una señal de identificación, por parte del sistema límbico, de un proceso reforzador de la conducta en curso, sirviendo como marcador de relevancia en la categorización de los sucesos temporales que acontecen en un momento determinado en la vida del individuo[15]. Esta señal conjuga aspectos tanto de relevancia motivacional como contextual, sirviendo para la orientación hacia la conducta consumatoria. De hecho, estímulos recompensantes naturales (también llamados reforzadores), como la ingesta, la bebida, la conducta sexual o la interacción social, activan esta señal dopaminérgica de un modo similar al que evocan las drogas de abuso[16].

Está claro que el sistema límbico contiene circuitos que no sólo codifican para la magnitud de la recompensa, sino también para su almacenamiento en archivos de memoria al permitir el establecimiento de asociaciones entre los estímulos externos e internos que acompañan a la aparición de un reforzador y la propia señal de recompensa que éste induce[15]. Esta memoria es esencial para optimizar la consecución de una futura recompensa (anticipación)[16] y para evitar castigos innecesarios. Se ha podido comprobar que también sirve para detectar errores en dicha anticipación, sirviendo como sistema de predicción de premios futuros. Por tanto, en su conjunto, el sistema de recompensa es esencial para el aprendizaje asociativo[7]. Todas estas funciones no pueden ser ejecutadas por las neuronas dopaminérgicas[17]. De hecho, son las estructuras a las que estas neuronas proyectan las que participan en el establecimiento de dichas asociaciones/anticipaciones. Podemos destacar los circuitos que configuran el sistema amigdalar ampliado, cuyas conexiones aferentes incluyen la VTA, el hipotálamo lateral, las cortezas olfatoria, entorrinal y frontal y varios núcleos talámicos. El sistema amigdalar, al recibir información de todos los sistemas sensoriales, se configura como esencial en el aprendizaje estímulo-respuesta, fundamental para establecer asociaciones que favorezcan la consecución de un reforzador en un contexto determinado[17]. Las conexiones eferentes de este circuito (fig. 1) incluyen el pálido ventral, el hipotálamo lateral y los núcleos límbicos del tronco encefálico, incluyendo la VTA. Esta vía de salida permite dar una respuesta adaptativa integral (comportamental, endocrina, autónoma) a la exposición a un reforzador natural o a una droga[18]. El papel fundamental de esta salida integrada es ofrecer un marco homeostático estable que dé prioridad a las conductas que sirven para obtener dichas recompensas. Por ello, la manipula-

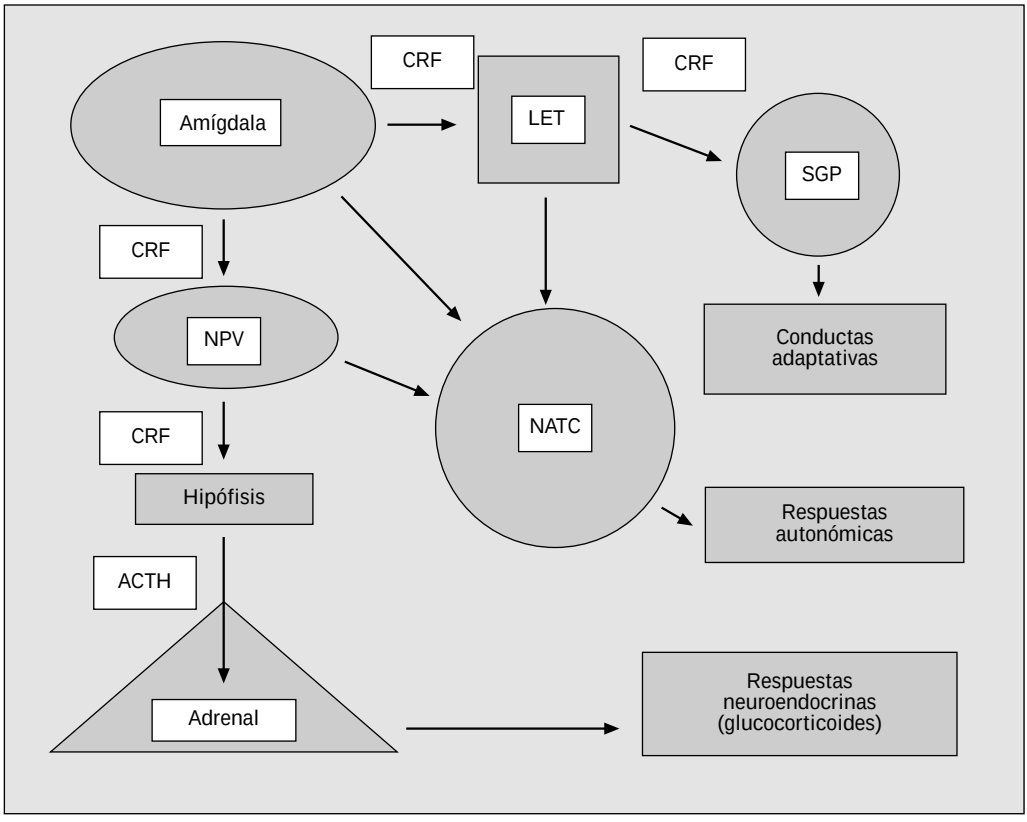


Fig. 1. El sistema límbico orquesta, desde el núcleo central de la amígdala, un conjunto de respuestas coordinadas del sistema endocrino, del sistema nervioso autónomo y de conductas adaptativas que en su conjunto sirven para mantener la homeostasis. Este sistema se adapta progresivamente a los ciclos de exposición-dependencia-abstinencia que caracterizan la adicción a una droga, variando el repertorio de respuestas. Uno de los neurotransmisores que llamativamente sufren estas adaptaciones durante el ciclo adictivo es el neuropéptido factor de liberación de corticotropina (CRF). LET: núcleo del lecho de la estría terminal; NATC: núcleos autónomos del tronco encefálico; NPV: núcleo paraventricular del hipotálamo; SGP: sustancia gris periacueductal.

ción de la amígdala ampliada mediante lesiones o fármacos puede bloquear los efectos motivacionales de las drogas de abuso, suprimiendo el establecimiento de aprendizajes asociativos como los condicionamientos[17].

Pese al exhaustivo conocimiento sobre el papel de las estructuras subcorticales en los efectos agudos de las drogas de abuso, el papel de los anillos corticales del sistema límbico se desconoce en gran medida. Tanto la corteza cingulada como la prefrontal proyectan masivamente al complejo amigdalar ampliado, especialmente al núcleo *accumbens*, que sirve de interfaz en el procesamiento de la señal de refuerzo activada por la autoadministración de una droga[7,19]. Los estudios realizados hasta la fecha que utilizan resonancia magnética funcional demuestran que la exposición aguda a psicoestimulantes, como la cocaína[20], activa el córtex cingulado anterior, el hipocampo, el giro parahipocampal y el córtex prefrontal lateral, mientras que se inhibe la actividad del córtex prefrontal medial. La activación del córtex cingulado y del córtex prefrontal lateral es coincidente no sólo con el curso temporal de la euforia inducida por el psicoestimulante sino con el incremento que se observa en la actividad de la VTA y de las neuronas del prosencéfalo basal. La exposición aguda a una droga parece activar

el sistema límbico cortical a través de múltiples caminos paralelos en los que se integran las señales intero y exteroceptivas asociadas a la autoadministración de la droga con las memorias previas relacionadas con la experiencia en curso. Estas memorias pueden ser no declarativas, como los hábitos y los condicionamientos, o explícitas, relacionadas con las experiencias previas del individuo. Cabe destacar el papel relevante que adquiere en esta primera fase del ciclo adictivo el córtex cingulado anterior[21], que ejerce no sólo un papel fundamental en la atribución de significado emocional a las experiencias sensoriales (aversivas o positivas) en curso, sino también permite la anticipación de una recompensa o un castigo ante la presentación de estímulos asociados a la droga. Como veremos a continuación, este papel anticipatorio participa en la génesis de las recaídas, verdadera piedra angular en la terapéutica de la adicción.

Las estructuras límbicas corticales también participan en la generación del deseo compulsivo, el ansia por obtener la droga. Estudios en pacientes adictos a opiáceos o psicoestimulantes[20,22] han puesto de manifiesto la existencia de un complejo sistema de circuitos corticales que se reclutan durante la génesis del deseo compulsivo de droga. Estas estructuras incluyen el giro parahipocampal, el córtex prefrontal, el córtex orbitofrontal y el córtex cingulado. Estas estructuras proyectan la VTA a partir de circuitos de retroalimentación como el que, partiendo del córtex prefrontal y pasando por la habénula lateral, proyecta a estas neuronas del mesencéfalo[23]. Todas estas estructuras participan no sólo en la evaluación de la información contextual en la que se desata el deseo de consumir droga, sino en el establecimiento de conductas anticipatorias, el ajuste emocional y la atribución de relevancia motivacional y emocional a la búsqueda de ésta. Se consigue gracias a estos circuitos asociar el consumo a un contexto, sensibilizar el deseo como valor motivacional (atenuando el valor intrínseco del refuerzo producido por el consumo en sí mismo), y asegurar la búsqueda continua de ésta[24].

Estructuras límbicas y abstinencia a las drogas: el sustrato del refuerzo negativo

A medida que este nuevo patrón de conducta se desarrolla, se va haciendo cada vez más evidente la presencia de un estado motivacional negativo (caracterizado por inquietud, irritabilidad, disforia y ansiedad) derivado de la búsqueda continua del elemento motivacional reforzador primario, la droga de abuso, que potencia aún más el ciclo adictivo[25]. Este estado motivacional negativo puede verse reforzado por la capacidad de algunas drogas de inducir dependencia, lo que se manifiesta por la aparición de un síndrome de abstinencia cuando cesa abruptamente el consumo de ésta. Tanto el síndrome de abstinencia como el desarrollo de un estado motivacional negativo se deben a la inducción de una serie compleja de neuroadaptaciones en el sistema límbico. Las neuroadaptaciones que conducen a la expresión del síndrome de abstinencia somática varían según la droga en estudio, reflejando la diferente expresión de sus dianas moleculares a lo largo de las estructuras anatómicas corticosubcorticales que hemos descrito. Sin embargo, el estado motivacional negativo es común en todos los modelos de adicción a las diferentes drogas de abuso[26,27]. Por ejemplo, durante la abstinencia a opiáceos, psicoestimulantes, etanol, nicotina o cannabinoides, se ha podido constatar una profunda disminución en la actividad de las neuronas de la VTA, así como una gran alteración en los umbrales de recompensa medidos directamente en el circuito de refuerzo con el paradigma de autoestimulación eléctrica intracraneal, o en la liberación de dopamina[28-33]. Procesos neuroadaptativos similares se han observado en los circuitos serotonérgicos ascendentes[34] o peptidérgicos en los circuitos de salida amigdalofugales (CRF)[27]. Precisamente la salida hacia los sistemas efectores endocrinos (eje hipotálamo-hipófisis) o autónomos (núcleos del tronco encefálico) es responsable de gran parte de los síntomas somáticos de abstinencia a drogas de vida media-corta (nicotina, opiáceos, etanol) que también contribuyen por su efecto negativo a la persistencia en el consumo.

La activación de la secreción hormonal durante el ciclo adictivo, especialmente en el caso de los glucocorticoides, parece esencial en el establecimiento en las neuroadaptaciones que regulan la transición hacia el consumo compulsivo. Esto es debido a su capacidad de activar factores de transcripción que modifican el mapa de expresión de genes funcionales en las neuronas diana[35]. Tanto las neuronas de la VTA (señal de refuerzo positivo), como las neuronas del hipocampo (memoria de las experiencias emocionales) expresan receptores para estas hormonas esteroideas, lo que favorece la aparición de fenómenos plásticos en los circuitos límbicos[6]. Las investigaciones realizadas en modelos animales han demostrado que los glucocorticoides son importantes en la activación de las neuronas dopaminérgicas de la VTA inducida por la droga, en los fenómenos de sensibilización comportamental

inducida por éstas, en la recaída tras un periodo libre de consumo y en la configuración de un fenotipo de vulnerabilidad a las drogas de abuso[36-40]. En el caso de la vulnerabilidad, datos experimentales indican que las hormonas glucocorticoides son capaces de inducir dicho fenotipo cuando aparecen en edades tempranas de la vida[41].

Conclusión

El sistema límbico participa activamente en el procesamiento de señales reforzadoras positivas y negativas asociadas al consumo de drogas o al cese de éste tras su toma crónica. Se puede diferenciar, dentro de este sistema funcional, circuitos que ejercen un papel preponderante en los diferentes elementos del procesamiento del refuerzo. Así, el circuito VTA-*accumbens* es esencial para procesar el refuerzo asociado a la administración de la droga, así como en la anticipación de éste. El circuito septo-hipocampo-amigdalar da apoyo a la orientación de la conducta de búsqueda de droga según el valor afectivo (emocional) que induce y las experiencias previas. Constituye, por ello, la base anatómica de los condicionamientos. El circuito estriado ventral-pálido-dorsal modula las respuestas motoras asociadas a las necesidades homeostáticas internas y sirve de estación de transición entre la fase inicial de conducta motivada hacia la droga y la fase final de establecimiento de hábitos automatizados propia de los consumidores crónicos. El sistema amigdalofugal controla las respuestas comportamentales, endocrinas y autónomas asociadas con el refuerzo positivo o el estado motivacional negativo inducido por la exposición crónica. Las cortezas orbitofrontal, prefrontal medial, cingulada y parahipocampal participan en los procesos perceptivos, atencionales y cognitivos (mnésicos) asociados con los diferentes estadios del ciclo adictivo.

En general, todas estas estructuras trabajan armoniosamente y sufren, debido a la presencia de la droga, un cambio gradual en su organización funcional que se resume en un desplazamiento en los puntos de ajuste de los procesos motivacionales (orientación de la conducta hacia el consumo compulsivo) y emocionales (desplazamiento desde sensaciones hedónicas positivas hacia una esfera de predominio afectivo negativo). La correcta comprensión de estas transiciones homeostáticas inducidas por la droga nos permitirá en un futuro no muy lejano conseguir no sólo comprender el proceso adictivo, sino establecer las bases correctas para su tratamiento y prevención.

BIBLIOGRAFÍA

1. Broca P. Anatomie comparée de circonvolutions cérébrales. Le grand lobe limbique et la scissure limbique dans la série des mammiféres. Rev Anthropol 1878; 1: 385-498.
2. Papez JW. A proposed mechanism of emotion. Arch Neurol Psychiatry 1937; 38: 725-743.
3. MacLean PD. The limbic system (“visceral brain”) and emotional behavior. Arch Neurol Psychiatry 1955; 73: 130-134.
4. Nieuwenhuys R, Voogd J, van Huijzen Chr. The Human Central Nervous System. A Synopsis and Atlas, 3.ª ed. Berlín: Springer-Verlag, 1988.
5. Isaacson RL. The Limbic System, 2.ª ed. Nueva York: Plenum Press, 1982. 1.
6. Harfstrand A, Fuxe K, Cintra A et al. Glucocorticoid receptor immunoreactivity in monoaminergic neurons in rat brain. Proc Nat Acad Sci USA 1986; 83: 9779-9783.
7. Robbins TW, Everitt BJ. Limbic-striatal memory systems and drug addiction. Neurobiol Learn Mem 2002; 78: 625-636.
8. Olds J, Milner P. Positive reinforcement produced by electrical stimulation of septal area and other regions of rat brain. J Comparative Physiol Psychol 1954; 47: 419-427.
9. Gardner EL. Brain reward mechanisms. En: Lowinson JH, Ruiz P, Millman RB, Langrod JG, eds. Substance Abuse: a Comprehensive Textbook. 3.ª ed. Baltimore: Williams and Wilkins, 1997; 51-85.
10. Bozarth MA, Wise RA. Intracranial self-administration of morphine into the ventral tegmental area of rats. Life Sci 1981; 28: 551-555.
11. Koob GF, Robledo P, Markou A, Caine SB. The mesocorticolimbic circuit in drug dependence and reward - A role for extended amygdala? En: Kalivas PW, Barnes CD, eds. Limbic Motor Circuits and Neuropsychiatry. Boca Raton: CRC Press, 1993; 289-309.
12. Gysling K, Wang RY. Morphine-induced activation of A10 dopamine neurons in rat brain. Brain Res 1983; 277: 119-127.
13. Pontieri FE, Tanda G, Di Chiara G. Intravenous cocaine, morphine and amphetamine preferentially increase extracellular dopamine in the “shell” as compared with the “core” of the rat nucleus accumbens. Proc Natl Acad Sci USA 1995; 92: 12304-12308.
14. Koob GF, Nestler EJ. The neurobiology of drug addiction. J Neuropsychiatry Clin Neurosci 1997; 9: 482-497.
15. Robinson TE, Berridge KC. The neural basis of drug craving: an incentive-sensitization theory of addiction. Brain Res Rev 1993; 18: 247-291.
16. Schultz W, Dayan P, Montague PR. A neural substrate for prediction and reward. Science 1997; 275: 1593-1599.
17. Everitt BJ, Morris KA, O’Brien A, Robbins TW. The basolateral amygdala-ventral striatal system and conditioned place preference: further evidence of limbic-striatal interactions underlying reward-related processes. Neuroscience 1991; 42: 1-18.

18. Rodríguez de Fonseca F, Navarro M. Role of the limbic system in dependence on drugs. Ann Med 1998; 30: 397-405.
19. Volkow ND, Fowler JS, Wang GJ, Goldstein RZ. Role of dopamine, the frontal cortex and memory circuits in drug addiction: insights from imaging studies. Neurobiol Learn Mem 2002; 78: 610-624.
20. Breiter HC, Gollub RL, Weisskoff RM et al. Acute effects of cocaine on human brain activity and emotion. Neuron 1997; 19: 591-611.
21. Peoples LL. Will, anterior cingulate cortex and addiction. Science, 2002; 296: 1623-1624.
22. Daglish MRC, Weistein A, Malicia AL, Wilson S, Britten S, Brewer C et al. Changes in regional cerebral blood flow elicited by craving memories in abstinent opiate-dependent subjects. Am J Psychiatry 2001; 158:1680-1686.
23. Lisoprawski A, Herve D, Blanc G, Glowinski J, Tassin JP. Selective activation of the mesocortico-frontal dopaminergic neurons by lesion of the habenula in the rat. Brain Res 1980; 183: 229-234.
24. Wolffgramm J, Heyne A. From controlled drug intake to loss of control: the irreversible development of drug addiction in the rat. Behav Brain Res 1995; 70: 77-94.
25. Koob GF, LeMoal M. Drug abuse: hedonic homeostatic dysregulation. Science 1997; 278: 52-58.
26. Grasing K, Wang A, Schlussman S. Behavioral measures of anxiety during opiate withdrawal. Behav Brain Res 1996; 80: 195-201.
27. Rodríguez de Fonseca F, Carrera MRA, Navarro M, Koob GF, Weiss F. Activation of corticotropin-releasing factor in the limbic system during cannabinoid withdrawal. Science 1997; 276: 2050-2054.
28. Schaefer GJ, Michael RP. Changes in response rates and reinforcement thresholds for intracranial self-stimulation during morphine withdrawal. Pharmacol Biochem Behav 1986; 25: 1263-1269.
29. Leith NJ, Barret RJ. Amphetamine and the reward system: evidence for tolerance and post-drug depression. Psychopharmacologia 1976; 46: 19-25.
30. Markou A, Koob GF. Postcocaine anhedonia: An animal model of cocaine withdrawal. Neuropsychopharmacology1991; 4: 17-26.
31. Schulteiss G, Markou A, Cole M, Koob GF. Decreased brain reward produced by ethanol withdrawal. Proc Natl Acad Sci USA 1995; 92: 5880-5884.
32. Epping-Jordan MP, Watkins SS, Koob GF, Markou A. Dramatic decreases in brain reward function during nicotine withdrawal. Nature 1998; 7: 76-79.
33. Weiss F, Markou A, Lorang MT et al. Basal extracellular dopamine levels in the nucleus accumben are decreased during cocaine withdrawal after unlimited-access self-administration. Brain Res 1992; 593: 314-318.
34. Weiss F, Parsons LH, Schulteis G et al. Ethanol self-administration restores withdrawal-associated deficiencies in accumbal dopamine and serotonin release in dependent rats. J Neurosci 1996; 16: 3474-3481.
35. Piazza PV, LeMoal M. Pathophysiological basis of vulnerability to drug abuse: role of an interaction between stress, glucocorticoids and dopaminergic neurons. Ann Rev Pharmacol Toxicol 1996; 36: 359-378.
36. Thierry AM, Tassin JP, Blanc G, Glowinski J. Selective activation of the mesocortical dopamine system by stress. Nature 1976; 263: 242-243.
37. Piazza PV, Deminiere JM, LeMoal M, Simon H. Factors that predict individual vulnerability to amphetamine self-administration. Science 1989; 245: 1511-1513.
38. Goeders NE, Guerin GF. Role of corticosterone in intravenous cocaine self-administration. Neuroendocrinology 1996; 64: 337-348.
39. Roberts AJ, Lessov CN, Phillips TJ. Critical role for glucocorticoid receptors in stress-and ethanol-induced locomotor sensitization. J Pharmacol Exp Ther 1995; 275: 790-797.
40. Shaham Y, Stewart J. Stress reinstates heroin-seeking in drug-free animals: an effect mimicking heroin, not withdrawal. Psychopharmacology (Berl) 1995; 119: 334-341.
41. Maccari S, Piazza PV, Deminiere JM et al. Life events-induced decrease of corticosteroid type-I receptors is associated with reduced corticosterone feedback and enhanced vulnerability to amphetamine self-administration. Brain Res 1991; 547: 7-12.

DISCUSIÓN

M.A. HURLÉ: Siempre consideramos el proceso adictivo como aprendizaje de un hábito seguido de la pérdida de su control, consecuencia de procesos neuroadaptativos, es decir, se trataría de respuestas adaptativas de plasticidad patológica. Pero creo que nos olvidamos de un aspecto muy importante que cada vez va tomando más interés, y es el aspecto neurodegenerativo. Hoy sabemos que en distintos modelos celulares la cocaína, alcohol, opiáceos, etc., provocan muerte celular, induciendo apoptosis, o disminuyen la neurogénesis. Puede que estemos olvidando un componente no solamente de adaptación activa, sino de pérdida neuronal o disminución de poblaciones neuronales en determinadas áreas que pudieran estar relacionadas con este tipo de comportamientos.

F. RODRÍGUEZ DE FONSECA: Claro, y eso conlleva también al final un deterioro progresivo de la capacidad de contraadaptación y de retorno a la

normalidad. Pero eso pasa también en otras enfermedades que cursan con profundos trastornos en este sistema que regula la orientación de nuestra conducta hacia un propósito, o motivación, y el análisis del punto de partida interno y externo, lo que llamamos emoción. Los psiquiatras saben perfectamente que cuanto más tiempo esté un enfermo en su esfera depresiva más irrecuperable es. Y de hecho lo que procuran es de alguna manera, como tratamiento de choque, borrar los archivos de memoria temporal, como hacer un *reset* con un electrochoque, porque eso ayuda posiblemente más que un fármaco inicialmente, porque lo que hay que hacer es intentar borrar las adaptaciones que todavía no se han consolidado, porque las ya consolidadas son muy complicadas de desmontar.

El proceso de aprendizaje, por ejemplo de control de una emoción, que a un niño le lleva muchos años, posteriormente con un simple fármaco o droga se puede desestructurar en cuestión de pocos meses, de una manera tan potente que al final necesitarías efectuar un aprendizaje desde cero para poder volver a la normalidad. Por tanto, considero que el principal problema de la adicción es conseguir que los que se exponen a las drogas no se hagan adictos y ahí es muy importante la información, es decir, que el camino hacia la adicción es un camino que muchas veces puede no tener retorno, o que su retorno es muy difícil, y eso no se percibe por la sociedad. Se percibe cuando uno ya ha caído en el pozo, pero mientras uno está cayendo y todavía ve la luz de arriba piensa que puede trepar y sin embargo las paredes del pozo ni las toca porque son resbaladizas. Yo creo que ése es un problema que, al menos en el tratamiento de los adictos, no se ha abordado. Parece que al tratar la adicción no se coge a los enfermos antes del momento en que podemos categorizarlos psiquiátricamente como adictos, cuando son consumidores ocasionales. Con ésos dicen que no hay problema, y que políticamente son correctos.

M. Casas: Creo que has hecho una presentación muy completa de los elementos de la adicción. Has hablado de valor hedónico, refuerzo, pérdida de control, ciclos de recaídas y profundas alteraciones del estado de ánimo como resultado de los consumos. M. Hurlé ha hablado de aspectos neurodegenerativos y ha habido un momento en el que te refieres a la adicción como enfermedad, y realmente yo creo que hemos avanzado mucho, porque hoy día podemos hablar de la adicción como una enfermedad, no como un problema social o de policías, que es como se hablaba antes. Lo que pasa es que como puro clínico hay un aspecto que me interesa cada vez más y que quizá aún no ha llegado a los básicos, y es que la adicción es una enfermedad, seguro, y poco a poco los básicos vais haciendo un mapa que nos va a explicar exactamente cuál es ese proceso adictivo. Pero lo que no nos va a explicar eso, y vosotros lo tenéis que empezar a contemplar, es por qué a algunas personas sí les pasa y a otras no. Y por qué la mayoría de la población puede consumir drogas sin problemas, sin procesos de neuroadaptación o aunque los hagan van a tener un proceso de desintoxicación más o menos complicado y doloroso quizás, pero no van a seguir por la carrera adictiva. Entonces, la carrera adictiva es diferente de todos los procesos neurobiológicos subyacentes. Por tanto, hay que contemplar la adicción como resultado de otras enfermedades, las hipótesis de la automedicación que cada vez tienen más fuerza. Individuos que necesitan las drogas para regular una serie de problemas internos. Creo que los básicos tenéis que contemplar que, aparte de que la droga sea un problema, la gente consume porque hoy seguramente le hace falta, tiene una enfermedad, porque si no no vais a completar el ciclo.

F. Rodríguez de Fonseca: Por la falta de tiempo no hemos podido entrar a discutir sobre las relaciones entre el fenotipo adicto y el genotipo. Evidentemente no todos los que se exponen son adictos y sabes perfectamente que la primera exposición a cocaína en más del 50% de los individuos provoca una reacción desagradable que hace que nunca más la vuelvan a probar y de los que la prueban sólo un 10% llegan a ser adictos. Ese componente genético, interpretado como que hay una serie de genes que prácticamente en la mayor parte de las especies pueden ayudar a que la toma de riesgos conduzca a una ventaja adaptativa, como colonizar nuevos nichos, y que eso haga, pues, por ejemplo, que se valore positivamente una situación de estrés adaptativo. El que es capaz de sobrellevar un estrés adaptativo puede, por ejemplo, salir a buscar comida en presencia de predadores en una situación relativamente desventajosa. Sabemos que los buscadores de riesgos también tienen mayor frecuencia de consumos anormales. El problema del genotipo es muy importante, es algo que tenemos que estudiar y yo creo que es fundamental para saber qué interacción genética con el entorno es la que conduce a la aparición de un individuo vulnerable, pero tampoco nos olvidemos de que el genoti-

po al fin y al cabo se tiene que expresar, y los factores de presión externa son muy importantes. Y con respecto a lo que tú dices, yo te formularía simplemente una pregunta: ¿por qué la nicotina, por ejemplo, puede producir criterios de adicción? Pongamos que la población femenina española, no sé si andará por el 25 o el 30% de fumadoras, excede en mucho ese 9% que genéticamente podríamos decir que son adictos por una automedicación y no por una enfermedad. Yo creo que *per se* tocar un sistema que sirve para adaptarnos y al ser estas respuestas muy complejas, para obtener una ventaja determinada en un entorno concreto, tocarlo químicamente puede hacer que nos ubiquemos en una posición de debilidad y, por tanto, de enfermedad.

R. MALDONADO: La teoría neurodegenerativa para determinadas drogas de abuso puede ser adecuada, pero no olvidemos los estudios publicados por Mary Jean Creek en los cuales demostraba que sujetos que han estado 25 años de mantenimiento con metadona no presentan ninguna alteración del comportamiento ni ninguna alteración mayor. Primero fueron adictos a heroína, después 25 años expuestos a metadona. Éstos son estudios publicados en 1992, o sea que ahora ya tiene datos de más años de mantenimiento con metadona. Si un mantenimiento durante 25 años con un opiáceo como la metadona no produce ningún tipo de trastorno comportamental ni ninguna alteración mayor, yo creo que la teoría de la neurotoxicidad no es válida para el caso de los opioides.

Óxido nítrico y CREB: abstinencia y *locus coeruleus*

J. Pineda

Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina y Odontología, Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea, Leioa, Bizkaia.

Importancia del *locus coeruleus* en la dependencia a opiáceos

La conducta adictiva aparece en el individuo consumidor como resultado de los cambios adaptativos tras el empleo continuado de la droga. La dependencia constituye el cortejo de síntomas y signos físicos, psíquicos y sociales que se asocian a estos cambios. Dos de las consecuencias más importantes del uso crónico de drogas son la tolerancia (pérdida progresiva del efecto agudo) y el síndrome de abstinencia (cuadro característico que aparece cuando cesa el consumo de la droga).

Participación del locus coeruleus *en el desencadenamiento del síndrome de abstinencia a opiáceos*

El *locus coeruleus* es el principal núcleo noradrenérgico del cerebro de mamíferos[1]. Los somas de este núcleo se encuentran confinados en una pequeña área del tronco del encéfalo y sus axones se proyectan a un gran número de regiones del sistema nervioso central[2]. Gracias a la extensión de las proyecciones, el *locus coeruleus* está capacitado para influir en la actividad de diversas regiones cerebrales y participa en la consecución de varias conductas, procesos fisiológicos y enfermedades. El *locus coeruleus* recibe numerosas proyecciones de distintas áreas, como el núcleo paragigantocelular lateral, el prepósito del hipogloso, el núcleo de Barrington, la sustancia gris periacueductal o la amígdala. Las aferencias del núcleo paragigantocelular lateral ejercen una importante modulación del *locus coeruleus* a partir de la liberación de glutamato[3,4].

En animales de laboratorio tratados crónicamente con opiáceos se ha demostrado que la actividad de las neuronas del *locus coeruleus* se incrementa drásticamente durante la aparición del síndrome de abstinencia[5,6]. Este aumento de la actividad ejerce un papel importante en el desencadenamiento del síndrome de abstinencia a opiáceos, como lo demuestran varias líneas de trabajo. En primer lugar, la hiperactividad de las neuronas del *locus coeruleus* correlaciona temporalmente con la gravedad de los signos de abstinencia[5]. En segundo lugar, la administración sistémica y local del agonista de los adrenoceptores α_2, clonidina, suprime la hiperactividad celular del *locus coeruleus*[7], la liberación de noradrenalina en las áreas terminales[8] y varios signos[9] de la abstinencia a opiáceos. En tercer lugar, la destrucción del *locus coeruleus* atenúa la aparición de los signos físicos de abstinencia[10], mientras que este núcleo es el área más sensible para inducir el síndrome de abstinencia cuando se aplica localmente en el cerebro un antagonista opiáceo[11].

A pesar de la evidencia surgida en los últimos 30 años que liga al *locus coeruleus* con el síndrome de abstinencia a opiáceos, varios autores han cuestionado en los últimos años la validez de estos hallazgos y han postulado un papel más relevante para estructuras independientes del sistema noradrenérgico del *locus coeruleus*[12]. Así, en un estudio reciente las lesiones electroquímicas del *locus coeruleus* no alteraron los signos de abstinencia a opiáceos o la habilidad de la clonidina para revertir estos signos[13]. Además, la lesión de las proyecciones noradrenérgicas del *locus coeruleus* no modifican la conducta de aversión de plaza inducida por la abstinencia a opiáceos[14]. Cualquiera que sea el papel real que ejerce el *locus coeruleus* en la dependencia a opiáceos, este núcleo se encuentra activado durante el síndrome de abstinencia, lo cual constituye un buen modelo neurobiológico para estudiar los cambios adaptativos que suceden en el curso de la administración de drogas.

Mecanismos implicados

La hipótesis clásica de la dependencia a drogas fue formulada por Himmelsbasch para los

opiáceos[15]. Según esta teoría, aunque la administración aguda de una droga es capaz de provocar cambios en la homeostasis del organismo, la administración crónica induce determinados mecanismos adaptativos en las sinapsis nerviosas que compensan la acción aguda y restauran la homeostasis original. La retirada abrupta de la droga cesa todas sus acciones agudas, pero deja activos los mecanismos adaptativos, lo cual causa una nueva ruptura de la homeostasis que se expresa con la abstinencia. En el *locus coeruleus* se han realizado numerosos estudios para desentrañar las adaptaciones que subyacen a la activación de las neuronas del *locus coeruleus*. Podemos clasificar estos mecanismos en intrínsecos y extrínsecos, según su origen[16]. Los primeros implican cambios intracelulares en las vías de transducción de las neuronas noradrenérgicas del *locus coeruleus*. Los segundos comprenden vías nerviosas aferentes que regulan el *locus coeruleus* de forma excitatoria. El componente intrínseco obedece a la hiperactividad del sistema del adenosinmonofosfato cíclico (AMPc) dentro de las células nerviosas, mientras que el componente extrínseco depende en parte de la estimulación de la vía de aminoácidos excitatorios que procede del núcleo paragigantocelular lateral.

En el *locus coeruleus* los opiáceos actúan en los receptores opioides μ e inhiben la actividad eléctrica de las neuronas mediante la activación de una corriente de potasio rectificadora interna (IRK) acoplada con la familia Gi/o de proteínas G[17]. La respuesta de los opiáceos en este núcleo también se obtiene como resultado de la inhibición de una corriente interna catiónica no específica, efecto mediado indirectamente vía inhibición de la adenililciclasa y reducción de la actividad de la proteína cinasa dependiente de AMPc (proteína cinasa A)[18]. El canal/bomba responsable de esta corriente no ha sido identificado, por lo que su existencia resulta controvertida[19] y no se ha establecido todavía si la proteína cinasa A fosforila esta proteína directamente. Durante el tratamiento crónico con opiáceos se desarrollan una serie de adaptaciones en las células del *locus coeruleus* que conducen a la hiperactividad de la vía del AMPc[16]. Así, se han descrito incrementos en los niveles de expresión de la adenililciclasa y de la proteína cinasa A. Durante el tratamiento con opiáceos la sobreexpresión de proteínas de la señal del AMPc se compensa con el efecto inhibitorio de los opiáceos. Cuando cesa la administración de opiáceos, el AMPc no encuentra el mecanismo represor y provoca una excitabilidad intrínseca de las neuronas vía la activación de la corriente catiónica no específica. En consonancia con esta hipótesis, se ha descrito que la respuesta electrofisiológica de las neuronas del *locus coeruleus* al AMPc se potencia tras el tratamiento crónico con opiáceos[20]. Además, la administración local en el *locus coeruleus* de inhibidores de la proteína cinasa A atenúa el síndrome de abstinencia a opiáceos, mientras que la aplicación de activadores de esta señal empeora el cuadro de este síndrome[21].

Los mecanismos extrínsecos implican la activación de las neuronas del *locus coeruleus* a partir de vías glutamatérgicas que provienen del núcleo paragigantocelular lateral en el bulbo raquídeo ventrorrostral. Se ha demostrado un incremento de los niveles extracelulares de glutamato en el *locus coeruleus*[22] y una potenciación de la respuesta postsináptica al glutamato durante la abstinencia a opiáceos (Dr. Kogan, comunicación personal). En consonancia con estos hallazgos, las lesiones del núcleo paragigantocelular lateral[23] o la administración de antagonistas inespecíficos del receptor del glutamato (intracerebroventricularmente)[24] atenúan la hiperactividad inducida por la abstinencia a opiáceos y el síndrome conductual. Varios estudios han investigado el subtipo de receptor de glutamato implicado en la vía extrínseca. Los datos aportados son concluyentes sobre la implicación del receptor de AMPA. Así, la administración sistémica o local en el *locus coeruleus* de antagonistas del receptor del AMPA (iGluR 1-4) reduce la activación de las neuronas de este núcleo y el cuadro sintomático durante el síndrome de abstinencia a opiáceos[25-28]. Respecto al receptor de NMDA se ha descrito que la administración de antagonistas del receptor de NMDA no afecta a la hiperactividad neuronal del *locus coeruleus*[29], aunque otros estudios parecen indicar que el receptor de NMDA en el *locus coeruleus* también podría ejercer un papel relevante en esta respuesta[25,30]. Por último, cabe mencionar que la estimulación de los receptores metabotrópicos del grupo II reduce la hiperactividad de las neuronas del *locus coeruleus* durante la abstinencia a opiáceos[31], probablemente a través de un mecanismo presináptico. Se ha postulado que la regulación hacia arriba de la señal del AMPc en los núcleos que proyectan al *locus coeruleus* ejerce un papel importante en la aparición de este mecanismo extrínseco.

Implicación del factor de transcripción CREB durante la abstinencia a opiáceos

Los mecanismos que desencadenan la regulación de la vía del AMPc en el *locus coeruleus*

durante la abstinencia a opiáceos han sido profusamente estudiados en la última década. En base a varias líneas de investigación relacionadas con alteraciones en la expresión genética, se ha propuesto un papel relevante para el factor de transcripción nuclear CREB (proteína que se fija al elemento de respuesta del AMPc). El CREB y otras proteínas de la misma familia (ATF1 y CREM) son factores de transcripción ubicuos y reconocen cadenas específicas de DNA (llamadas CRE) dentro de regiones regulatorias de varios genes. El CREB se activa tras fosforilación por distintas proteínas cinasas (como la dependiente de AMPc), tras lo cual se une a proteínas adaptadoras (CBP y p300) para estimular o inhibir la transcripción genética. Por una parte, el tratamiento crónico con morfina eleva los niveles de expresión y fosforilación del CREB en el *locus coeruleus* de rata[32]. El mecanismo por el que sucede esta regulación parece que tiene que ver con la reducción aguda de los niveles de AMPc tras la administración del opiáceo. Esta idea se deduce de estudios realizados en cultivos celulares Cath.a (modelo de neuronas del *locus coeruleus*) donde se ha comprobado que la activación de la vía del AMPc disminuye la transcripción del gen del CREB[33]. Por otra parte, estudios en ratones *knockout* han demostrado que la deficiencia del factor CREB atenúa el desarrollo conductual de dependencia y abstinencia a opiáceos[34].

En un estudio combinando técnicas bioquímicas, electrofisiológicas y conductuales se ha profundizado en la implicación del factor CREB y de la vía del AMPc en el *locus coeruleus* durante la dependencia a opiáceos[35]. La administración de oligonucleótidos *antisense* anti-CREB, a la vez que disminuye la concentración de CREB específicamente en el *locus coeruleus*, causa una importante atenuación de algunos signos centrales del síndrome de abstinencia a opiáceos, lo que sugiere que la presencia de este factor en el *locus coeruleus* es necesaria para el desencadenamiento de dependencia. La atenuación del cuadro de abstinencia tras la aplicación de los oligonucleótidos se acompaña de un bloqueo de la hiperactividad típica de las neuronas del *locus coeruleus* durante este proceso[35]. Además, el evento bioquímico que depende directamente de esta regulación es la adenililciclasa tipo VIII, mientras que otros cambios bioquímicos que suceden durante la dependencia (como la sobreexpresión de la adenililciclasa tipo I y de la proteína cinasa A) no están ligados a esta vía de señalización del CREB. En consonancia con estos hallazgos, la respuesta electrofisiológica al activador de la adenililciclasa forskolina se encuentra bloqueada en ratas abstinentes tratadas con oligonucleótidos. Por el contrario, la potenciación del efecto electrofisiológico del AMPc en el *locus coeruleus* de ratas abstinentes no se modifica tras la administración de oligonucleótidos anti-CREB[35].

Más recientemente se ha comprobado en ratones alterados genéticamente la importancia de las isoformas α y Δ del CREB en el desarrollo de hiperactividad de las células del *locus coeruleus* durante el síndrome de abstinencia a opiáceos[36] (Mantamadiotis, Torrecilla, Pineda et al. Manuscrito en preparación). En el mismo sentido, la generación de ratones mutantes con una deficiencia completa de todas las isoformas del CREB específicamente en el sistema nervioso central provoca una atenuación del síndrome de abstinencia conductual y de la hiperactividad electrofisiológica.

Implicación del óxido nítrico presente en el *locus coeruleus* durante la abstinencia a opiáceos

Recientemente se ha postulado la implicación del óxido nítrico (NO) en el desencadenamiento del síndrome de abstinencia a opiáceos, y su papel en los mecanismos adaptativos que suceden en el *locus coeruleus* tras la administración de morfina. Esta participación del NO podría enmarcarse en la vía extrínseca, según la denominación empleada más arriba.

Modulación de la actividad de las neuronas del locus coeruleus por la vía del óxido nítrico/guanosinmonofosfato cíclico

El NO es un gas que actúa como mensajero nervioso y se produce desde la L-arginina mediante una enzima sintasa. Esta enzima tiene tres isoformas conocidas: la neuronal (NOS I), la inducible (NOS II) y la endotelial (NOS III)[37]. El papel del NO en la modulación neuronal del *locus coeruleus* proviene de la caracterización de las dianas de la vía NO/ guanosinmonofosfato cíclico (GMPc) en este núcleo. Así, se ha demostrado la presencia de distintas subunidades de la guanililciclasa[38] y de la isoforma II de la proteína cinasa dependiente de GMPc en el *locus coeruleus*[39], y se han detectado niveles de GMPc en las células del *locus coeruleus*[40,41]. Además, la contribución del NO regulando el *locus coeruleus* en la fisiología y fisiopatología cerebral ha sido reconocida en distintas funciones nerviosas[42-44]. En experimentos electrofisiológicos realizados en ro-

dajas de cerebro de rata[45], la perfusión con distintos donantes de NO incrementa la frecuencia de descarga de las neuronas del *locus coeruleus*. Este efecto es específico porque no se reproduce con análogos estructurales no donantes, y, además, se revierte con agentes secuestradores de este gas[45]. Otros autores han encontrado resultados discordantes[40], lo cual podría explicarse por las distintas concentraciones de NO alcanzadas en cada ensayo. En experimentos desarrollados en animal anestesiado, los donantes de NO también provocan una excitación neuronal del *locus coeruleus*, tanto cuando se administran intracerebroventricular como localmente en el propio núcleo[46]. Mediante análogos nucleotídicos inhibidores y activadores se ha comprobado que la acción del NO se ejerce a través de la activación de la enzima guanililciclasa y la subsiguiente activación de la proteína cinasa dependiente de GMPc (proteína cinasa G)[45]. Similarmente, los experimentos *in vivo* sugieren que la acción del NO en el *locus coeruleus* es de origen postsináptico[46]. Mediante registros intracelulares y de *patch-clamp* en célula entera, se ha comprobado que el NO activa una corriente catiónica de entrada, no selectiva y dependiente de sodio[45]. Este canal parece ser una diana postsináptica común tanto para la vía del NO/GMPc como para la cascada del AMPc.

La vía del NO/GMPc en el *locus coeruleus* desempeña un papel de regulador endógeno de las neuronas de este núcleo. Así, los bloqueadores de la sintasa del NO tienen un efecto inhibitorio en la actividad eléctrica neuronal del *locus coeruleus*[46-48]. Esta función no se observa después de seccionar las aferencias nerviosas del *locus coeruleus*[45], probablemente por su dependencia de las vías glutamatérgicas[49,50]. La modulación endógena del *locus coeruleus* por NO es consistente con la presencia de niveles detectables de NO en el espacio extracelular de este núcleo[49,50], y con la expresión de la sintasa de NO en el área pericoerulear[40,51] y en el propio *locus coeruleus*[52,53]. La aplicación del sustrato de la sintasa del NO L-arginina *in vivo* provoca una elevación de la frecuencia de descarga de las neuronas del *locus coeruleus*, pero en este caso se trata de un mecanismo independiente del NO de liberación de aminoácidos excitatorios[46].

Adaptaciones de la señal de óxido nítrico en el locus coeruleus *durante el síndrome de abstinencia a opiáceos*

Estudios de comportamiento y con técnicas electrofisiológicas *in vivo* han indicado que el NO interviene como un mediador necesario, tanto en la aparición de la conducta abstinente como en la hiperactividad de las neuronas del *locus coeruleus* durante el síndrome de abstinencia a opiáceos. Respecto a los estudios comportamentales, se ha evidenciado que la administración de inhibidores no selectivos[54-56] de la NO sintasa o de inhibidores selectivos de la isoforma neuronal[47,57] bloquea parcialmente el cortejo de signos de abstinencia a los opiáceos. Esta acción se debe a un mecanismo central[58], y de hecho la actividad NO sintasa se encuentra incrementada en el cerebro tras la administración de morfina[59]. Técnicas electrofisiológicas han demostrado que la administración sistémica tanto de inhibidores no selectivos de la NO sintasa como de inhibidores de la forma neuronal causa una clara reducción de la hiperactividad neuronal del *locus coeruleus* durante la abstinencia a opiáceos[47]. Este fenómeno es de origen local porque la aplicación del inhibidor de la sintasa en la región del *locus coeruleus* también previene la activación de las células del *locus coeruleus*[47]. De hecho, la administración de morfina incrementa la expresión de la sintasa de NO neuronal en el *locus coeruleus*[52]. Por último, cabe destacar que la participación del NO concuerda con una acción preventiva y específica para el síndrome de abstinencia, porque la administración de una dosis única de los inhibidores de la sintasa de NO, aunque sí previene la respuesta del *locus coeruleus*, no es capaz de revertir dicha respuesta una vez que se ha instaurado tras la naloxona. Además, aunque una dosis única de los inhibidores de la sintasa de NO previene la abstinencia, no es capaz de modificar el desarrollo de tolerancia al efecto inhibitorio de la morfina en el *locus coeruleus* después de los tratamientos crónicos[47]. Similarmente, un papel para el NO neuronal en la abstinencia a opiáceos ha sido propuesto con técnicas voltamétricas[60] y de microdiálisis[48] en el *locus coeruleus*. Esta regulación podría estar relacionada con la hiperactividad de las vías glutamatérgicas en este núcleo durante la abstinencia a opiáceos, dada la relación existente entre el receptor de NMDA, la entrada de calcio y la activación de las sintasas constitutivas de NO que se ha demostrado en el *locus coeruleus*[61]. La cascada de reacción implicada sería la del GMPc, como se demuestra en un artículo donde la administración de un inhibidor de la guanililciclasa suprime el síndrome conductual y la respuesta del *locus coeruleus* durante la abstinencia a opiáceos[62].

Implicación de la vía de aminoácidos excitatorios y del óxido nítrico en la desensibilización y tolerancia de los receptores opioides μ

Fenómeno de desensibilización de la respuesta a opiáceos. El locus coeruleus *como modelo para estudiar los mecanismos subyacentes*

El fenómeno de la desensibilización y tolerancia a los opiáceos se ha estudiado intensamente durante las dos últimas décadas, pero permanece lejos de estar aclarado. Se han descrito múltiples mecanismos por los que los receptores opioides μ podrían llegar a ser tolerantes, entre los que destacan los siguientes[63-66]:

1. Cambios en el receptor opioide: *a)* fosforilación inducida por agonista del receptor opioide. Se ha demostrado la intervención de varias cinasas entre las que destacan las cinasas de receptores acoplados a proteínas G (GRK), la CaM cinasa II, la proteína cinasa A, la proteína cinasa C y la MAP cinasa; *b)* internalización del receptor opioide; *c)* desacoplamiento crónico de los receptores opioides de las proteínas G, y *d)* disminución de la densidad de receptores opioides.

2. Mecanismos de compensación de otros sistemas de transducción: *a)* activación de la vía de la adenililciclasa y la proteína cinasa A; *b)* activación de la MAP cinasa; *c)* activación de la fosfolipasa C; *d)* activación de la vía del NO; *e)* producción de péptidos antiopioides, y *f)* acoplamiento a proteínas de transducción alternativas.

Nuevas aproximaciones moleculares, fisiológicas y conductuales han permitido conocer la importancia que tiene la interacción entre distintos mecanismos (como el de las betaarrestinas, la proteína cinasa C y las fosfodiesterasas) en el desencadenamiento de tolerancia a los opiáceos[67-69]. Además, cada vez es más patente que no todos los opiáceos poseen mecanismos de tolerancia idénticos entre sí[64,70].

Debido a la implicación del *locus coeruleus* en la dependencia a opiáceos, a su alta densidad de receptores opioides μ y a la extensa caracterización de sus respuestas, este núcleo se ha utilizado ampliamente como un modelo para valorar los mecanismos neurobiológicos de tolerancia a opiáceos. Muchos de los mecanismos que intervienen en la dependencia a opiáceos en el *locus coeruleus* podrían explicar la aparición de tolerancia. Por ejemplo, la regulación hacia arriba de la vía del AMPc (véase apartado "Mecanismos implicados") podría contrarrestar los efectos inhibitorios de los opiáceos. Sin embargo, algunos mecanismos adicionales son necesarios porque la sobreexpresión de la vía del AMPc no es capaz de explicar la incapacidad de los opiáceos para activar los canales de potasio IRK[16]. Además, algunos autores sostienen que la desensibilización de receptores opioides μ en el *locus coeruleus* es de naturaleza homóloga[71], lo que descartaría una acción generalizada del AMPc.

Varias hipótesis alternativas han sido postuladas, pero ninguna de ellas ha sido completamente demostrada. Los receptores opioides podrían desacoplarse de las proteínas G, quizás como resultado de la fosforilación de los receptores o de las proteínas G. Esta posibilidad se sustenta en el papel que desempeñan las cinasas de GRK, la proteína cinasa A y la proteína cinasa dependiente de calcio en la desensibilización inducida por agonistas[72]. De hecho, ciertas GRK parecen sufrir una regulación hacia arriba *(up-regulation)* en el *locus coeruleus* tras el tratamiento crónico con morfina[73,74]. Además, en estudios autorradiográficos se ha observado que la eficacia de acoplamiento del receptor μ a la proteína G (medida como la fijación de GTPγS) se encuentra reducida en el *locus coeruleus* tras el tratamiento crónico con opiáceos[75,76]. Por otra parte, el sistema de los fosfoinositoles no parece ejercer un papel relevante[77]. En relación a la densidad de los propios receptores opioides μ, se ha descrito una reducción de éstos en el *locus coeruleus* tras el tratamiento crónico con algunos agonistas opioides[78]. Paradójicamente se ha observado que la densidad de subunidades α de las proteínas Gi/o se incrementa en el *locus coeruleus* por la administración prolongada de opiáceos, aunque la actividad fisiológica de estas proteínas se encuentra disminuida[75] o no cambia[79]. Esta discordancia podría explicarse con la aparición de una nueva clase de proteínas de señalización, las reguladoras de las proteínas G, que regulan la actividad GTPasa de las subunidades α y que se distribuyen ampliamente en el *locus coeruleus*[80]. Modificaciones de los canales de potasio IRK han sido propuestos como mecanismos de desensibilización en otras áreas cerebrales, pero hasta el momento no se han descrito dichos cambios en el *locus coeruleus*. Por último, un posible mecanismo a valorar es la reducción en la síntesis de péptidos opioides endógenos en las vías bulbocoeruleares tras el tratamiento crónico con morfina[81].

Los estudios de electrofisiología han abordado el problema de la desensibilización de los receptores μ en el *locus coeruleus* con resultados dis-

cordantes. Algunos autores han sugerido un mecanismo no específico (heterólogo), donde no se produce un desacoplamiento del receptor con la proteína G, sino una inhibición competitiva de la activación de canales de potasio GIRK por el sistema de la proteína G[77]. Incluso, la desensibilización ha sido asociada con una despolarización general como resultado de una reducción de la bomba electrogénica Na^+/K^+[82]. Sin embargo, una serie de trabajos publicados en los últimos 20 años por el grupo del Dr. Williams indican que la desensibilización de receptores opioides μ en el *locus coeruleus* es un fenómeno homólogo, provocado por el desacoplamiento entre el receptor y la activación del canal de potasio[83]. Parece ser que la desensibilización se produce a través de la proteína G con la intervención de mecanismos de fosforilación, y en parte de forma independiente de la fosforilación, pero no se asocia directamente a la proteína cinasa A[71,83,84]. Paradójicamente, los hallazgos obtenidos hasta ahora descartan la implicación de las GRK en la desensibilización de los receptores opioides en el *locus coeruleus*.

Importancia del sistema de aminoácidos excitatorios y del óxido nítrico en la desensibilización/tolerancia a opiáceos

Hace algo más de una década se realizaron los primeros estudios comprobando la participación de los receptores de NMDA en la tolerancia a opiáceos[85]. Dicho mecanismo se postuló en analogía con la intervención del NMDA en los procesos de plasticidad sináptica del aprendizaje. Con posterioridad han sido más de 40 trabajos los que se han publicado empleando distintos tipos de antagonismo del receptor de NMDA para profundizar en este fenómeno. Resultados similares se han obtenido con fármacos que afectan a la cascada de segundos mensajeros dependiente de NO[86]. Aunque una gran parte de los estudios se ha dirigido a la tolerancia a los efectos analgésicos de los opiáceos, la participación de la vía NMDA/NO también se ha demostrado para otros efectos (p. ej., depresión locomotriz, supresión de la respuesta operante). No obstante, queda por demostrar la selectividad del hallazgo sobre la cascada NMDA/NO en la tolerancia a distintas respuestas centrales y a diferentes agonistas opioides.

La evidencia sobre una interacción entre los receptores opioides μ y los de NMDA ha sido en parte indirecta mediante estudios conductuales. Algunos modelos no conductuales también han demostrado de forma directa la presencia de los dos tipos de receptores (opioides y NMDA) en las mismas células del sistema nervioso central, así como distintas vías intracelulares y fisiológicas a través de las cuales estos sistemas interactúan[87-92]. Según estas interacciones, se ha postulado un modelo celular por el que el receptor opioide, mediante la proteína cinasa C y la subsiguiente entrada de calcio a través del receptor de NMDA fosforilado, activaría la sintasa de NO. El NO activaría la cascada de GMPc y la proteína cinasa G, que a su vez fosforilaría el receptor opioide μ y otras proteínas acopladas[66,93,94]. Así mismo, el NO podría generarse por mecanismos directos a partir de la activación de distintos receptores acoplados a proteínas G, como el receptor opioide μ, y la consecuente liberación de calcio intracelular[95]. Otros procesos de activación de la sintasa de NO que no dependen del calcio o de la proteína cinasa C también han sido descritos tras la estimulación de receptores acoplados a proteínas G[95-97]. Estudios en los que se han empleado inhibidores de la sintasa de NO o del GMPc han corroborado la hipótesis, observándose una inhibición del proceso de tolerancia tras la administración de estos inhibidores[56,86,97-99]. No obstante, no todas las respuestas que presentan tolerancia están moduladas por el NO[100], e incluso hay referencias en las que la inhibición de la NO sintasa acentúa el desarrollo de tolerancia[97]. El modelo sugiere que los eventos dependientes del NO pueden ser muy relevantes en el desencadenamiento de los mecanismos de tolerancia a opiáceos[94].

Highfield y Grant[101] han observado que el tratamiento con inhibidores no selectivos de la sintasa de NO bloquea el desarrollo de tolerancia al efecto electrofisiológico de los opioides en el *locus coeruleus*. Estudios más recientes han verificado que se trata de la isoforma neuronal, dado que la administración crónica de un inhibidor selectivo de esta sintasa juntamente con la morfina reduce completamente el desarrollo de tolerancia al efecto inhibitorio de los opioides en el *locus coeruleus*[102].

Ya que la implicación del NO en la tolerancia a opiáceos también ha sido demostrada en preparaciones de rodajas[103], en los últimos años se ha empleado este modelo simple para verificar el papel del NO en la desensibilización de los receptores opioides μ en el *locus coeruleus*. En este sentido, la respuesta inhibitoria de las neuronas del *locus coeruleus* a un agonista opioide *in vitro*, se reduce a menos del 30% tras la perfusión con una concentración alta del mismo agonista (desensibilización homóloga aguda). La administración de inhibidores no selectivos de la sintasa de NO como N^G-nitro-L-arginina o N^G-nitro-L-argini-

na metil éster bloquea parcialmente el desarrollo de la desensibilización aguda a los opiáceos, mientras que la aplicación de L-arginina compite con la acción bloqueadora de estos inhibidores[104]. El mecanismo por el que se produce esta acción no se conoce, pero podría estar relacionado con la fosforilación de proteínas G o con otros mecanismos independientes de la vía de GMPc. Además, el empleo de concentraciones crecientes de inhibidores selectivos de la sintasa de NO neuronal (como el 7-nitroindazol, la S-metil-L-tiocitrulina y la N-propil-L-arginina) permiten asegurar que la formación de NO se produce por una enzima de tipo neuronal[105]. Los donantes de NO, pero no sus análogos no donantes, revierten el efecto bloqueante de los inhibidores de la sintasa y potencian la desensibilización opioide, lo que sugiere que se trata de un efecto mediado por el NO y no por algún otro producto de la reacción[106]. Paradójicamente, los fármacos que actúan en la vía del GMPc y la proteína cinasa G no modulan la respuesta del NO ni la desensibilización de los agonistas opioides en el *locus coeruleus*[107], lo que apunta a la contribución de otras vías de señalización dependientes del NO pero separadas del GMPc. El papel que desempeña el NO en la dependencia a opiáceos podría tener relevancia terapéutica en un futuro, y todos los resultados preliminares descritos deberán ser investigados con mayor profundidad.

BIBLIOGRAFÍA

1. Foote SL, Bloom FE, Aston-Jones G. Nucleus locus coeruleus: new evidence of anatomical and physiological specificity. Physiol Rev 1983; 63: 844-914.
2. Jones BE, Moore RY. Ascending projections of the locus coeruleus. II. Autoradiographic study. Brain Res 1977; 127: 23-53.
3. Aston-Jones G, Ennis M, Pieribone VA, Nickel WT, Shipley MT. The brain nucleus locus coeruleus: restricted afferent control of a broad efferent network. Science 1986; 234: 734-737.
4. Luppi PH, Aston-Jones G, Akaoka H, Chouvet G, Jouvet M. Afferent projections to the rat locus coeruleus demonstrated by retrograde and anterograde tracing with cholera-toxin B subunit and phaseolus vulgaris leucoagglutinin. Neuroscience 1995; 65: 119-160.
5. Rasmussen K, Beitner DB, Krystal JH, Aghajanian GK, Nestler EJ. Opiate withdrawal and the rat locus coeruleus: behavioral, electrophysiological and biochemical correlates. J Neurosci 1990; 10: 2308-2317.
6. Akaoka H, Aston-Jones GA. Opiate withdrawal-induced hyperactivity of locus coeruleus neurons is substantially mediated by augmented excitatory amino acid input. J Neurosci 1991; 11: 3830-3839.
7. Aghajanian GK. Tolerance of locus coeruleus neurons to morphine and suppression of withdrawal response by clonidine. Nature 1978; 276: 186-187.
8. Done C, Silverstone P, Sharp T. Effect of naloxone-precipitated morphine withdrawal on noradrenaline release in rat hippocampus in vivo. Eur J Pharmacol 1992; 215: 333-336.
9. Taylor JR, Elsworth JD, Garcia EJ, Grant SJ, Roth RH, Redmond DE Jr. Clonidine infusion into the locus coeruleus attenuates behavioral and neurochemical changes associated with naloxone-precipitated withdrawal. Psychopharmacology (Berl) 1988; 96: 121-134.
10. Maldonado R, Koob GF. Destruction of the locus coeruleus decreases physical signs of opiate withdrawal. Brain Res 1993; 605: 128-138.
11. Maldonado R, Stinus L, Gold LH, Koob GF. Role of different brain structures in the expression of the physical morphine withdrawal syndrome. J Pharmacol Exp Ther 1992; 261: 669-677.
12. MacDonald JC, Williams JT, Osborne PB, Bellchambers CE. Where is the locus in opioid withdrawal? Trends Pharcon Sci 1997; 18: 134-140.
13. Caille S, Espejo EF, Reneric J, Cador M, Koob GF, Stinus L. Total neurochemical lesion of noradrenergic neurons of the locus coeruleus does not alter either naloxone-precipitated or spontaneous opiate withdrawal nor does it influence ability of clonidine to reverse opiate withdrawal. J Pharmacol Exp Ther 1999; 290: 881-892.
14. Delfs JM, Zhu Y, Druhan JP, Aston-Jones G. Noradrenaline in the ventral forebrain is critical for opiate withdrawal-indiced aversion. Nature 2000; 403: 430-434.
15. Himmelsbach CK. Can the euphoric analgetic and physical dependence effects of drugs be separated? With reference to physical dependence. Fed Proc 1943; 2: 201-203.
16. Nestler EJ, Aghajanian GK. Molecular and cellular basis od addiction. Science 1997; 278: 58-63.
17. Williams JT, Egan TM, North RA. Enkephalin opens potassium channels on mammalian central neurones. Nature 1982; 299: 74-77.
18. Alreja M, Aghajanian GK. Opiates suppress a resting sodium-dependent inward current in addition to activating an outward potassium current in locus coeruleus neurons. J Neurosci 1993; 13: 3525-3532.
19. Torrecilla M, Marker CL, Cintora SC, Stoffel M, Williams JT, Wickman K. G-Protein-Gated Potassium Channels Containing Kir3.2 and Kir3.3 Subunits Mediate the Acute Inhibitory Effects of Opioids on Locus Ceruleus Neurons. J Neurosci 2002; 22: 4328-4334.
20. Kogan JH, Nestler EJ, Aghajanian GK. Elevated basal firing rates of locus coeruleus neurons in brain slices from opiate-dependent rats: association with enhanced responses to 8-Br-cAMP. Eur J Pharmacol 1992; 211: 47-53.

21. Maldonado R, Valverde O, Garbay C, Roques BP. Protein kinases in the locus coeruleus and periaqueductal gray matter are involved in the espression of opiate withdrawal. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 1995; 352: 565-575.
22. Aghajanian GK, Kogan H, Moghaddam B. Opiate withdrwal increases glutamate and aspartate efflux in the locus coeruleus: an in vivo microdyalisis study. Brain Res 1994; 636: 126-130.
23. Rasmussen K, Aghajanian GK. Withdrawal-induced activation of locus coeruleus neurons in opiate-dependent rats: attenuation by lesions of the nucleus paragigantocellularis. Brain Res 1989; 505: 346-350.
24. Rasmussen K, Krystal JH, Aghajanian GK. Excitatory amino acids and morphine withdrawal: differential effects of central and peripheral kynurenic acid administration. Psychopharmacology (Berl) 1991; 105: 508-512.
25. Akaoka H, Aston-Jones GA. Opiate withdrawal-induced hyperactivity of locus coeruleus neurons is substantially mediated by augmented excitatory amino acid input. J Neurosci 1991; 11: 3830-3839.
26. Rasmussen K, Kendrick WT, Kogan JH, Aghajanian GK. A selective AMPA antagonist, LY293558, antagonizes morphine-withdrawal-induced activation of locus coeruleus neurons and behavioral signs of morphine withdrawal. Neuropsychopharmacology 1996; 15: 497-505.
27. Rasmussen K, Vandergriff JL. The selective AMPA antagonist LY300168 suppresses morphine-withdrawal-induced activation of locus coeruleus neurons and behavioral signs of morphine withdrawal. Soc Neurosci Abstr 1997; 23: 1201.
28. Taylor JR, Punch LJ, Elsworth JD. A comparison of the effects of clonidine and CNQX infusion into the locus coeruleus and the amygdala on naloxone-precipitated opiate withdrawal in the rat. Psychopharmacology (Berl) 1998; 138: 133-142.
29. Rasmussen K, Fuller RW, Stockton ME, Perry KW, Swinford RM, Ornstein PL. NMDA receptor antagonists supress behaviors but not norepinephrine turnover or locus coeruleus unit activity induced by opiate withdrawal. Eur J Pharmacol 1991; 117: 9-16.
30. Tokuyama S, Zhu H, Oh S, Ho IK, Yamamoto T. Further evidence for a role of NMDA receptors in the locus coeruleus in the expression of withdrawal syndrome from opioids. Neurochem Intern 2001; 39: 103-109.
31. Vandergriff J, Rasmussen K. The selective mGlu2/3 receptor agonist LY354740 attenuates morphine-withdrawal-induced activation of locus coeruleus neurons and behavioral signs of morphine withdrawal. Neuropharmacology 1999; 38: 217-222.
32. Guitart X, Thompson MA, Mirante CK, Greenberg ME, Nestler EJ. Regulation of CREB phosphorylation by acute and chronic morphine in the rat locus coeruleus. J Neurochem 1992; 58: 1168-1171.
33. Widnell KL, Chen J-S, Iredale PA, Walker WH, Duman RS, Habener JF, et al. Transcriptional regulation of CREB (cAMP response element-binding protein) espression in CATH.a cells. J Neurochem 1996; 66: 1770-1773.
34. Maldonado R, Blendy JA, Tzavara E, Gass P, Roques BP, Hanoune J. Reduction of morphine abstinence in mice with a mutation in the gene encoding CREB. Science 1996; 273: 657-659.
35. Lane-Ladd SB, Pineda J, Boundy VA, Pfeuffer T, Krupinski J, Aghajanian GK, et al. CREB (cAMP response element-binding protein) in the locus coeruleus: Biochemical, physiological, and behavioral evidence for a role in opiate dependence. J Neurosci. 1997; 17: 7890-7901.
36. Mantamadiotis T, Schütz G, Maldonado R. Molecular genetic approaches. En: Maldonado R, ed. Molecular Biology of Drug Addiction. Totowa (EE.UU.): Humana Press, 2003; 27-36.
37. Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. Biochem J 2001; 357: 593-615.
38. Furuyama T, Inagaki S, Takagi H. Localizations of alpha-1 and beta-1 subunits of soluble guanylate cyclase in the rat brain. Mol Brain Res 1993; 20: 335-344.
39. El-Husseini AE, Bladen C, Vincent SR. Molecular characterization of a type II cyclic GMP-dependent protein kinase expressed in the rat brain. J Neurochem 1995; 64: 2814-2817.
40. Xu ZQ, de Vente J, Steinbusch H, Grillner S, Hokfelt T. The NO-cGMP pathway in the rat locus coeruleus: electrophysiological, immunohistochemical and in situ hybridization studies. Eur J Neurosci 1998; 10: 3508-3516.
41. Vulliemoz Y, Whittington RA, Virag L. The nitric oxide-cGMP system of the locus coeruleus and the hypnotic action of alpha-2 adrenergic agonists. Brain Res 1999; 849: 169-174.
42. Tassorelli C, Joseph SA, Buzzi MG, Nappi G. The effects on the central nervous system of nitroglycerin–putative mechanisms and mediators. Prog Neurobiol 1999; 57: 607-624.
43. Yao ST, Finkelstein DI, Lawrence AJ. Nitrergic stimulation of the locus coeruleus modulates blood pressure and heart rate in the anaesthetized rat. Neuroscience 1999; 91: 621-629.
44. Ruiz-Durántez E, Ruiz-Ortega JA, Pineda J, Ugedo L. Effect of agmatine on locus coeruleus neuron activity: possible involvement of nitric oxide. Br J Pharmacol 2002; 135: 1152-1158.
45. Pineda J, Kogan JH, Aghajanian GK. Nitric oxide and carbon monoxide activate locus coeruleus neurons through a cGMP-dependent protein kinase: involvement of a nonselective cationic channel. J Neurosci 1996; 16: 1389-1399.
46. Torrecilla M, Pineda J, Rodriguez RA, Ugedo L. In vivo modulation of rat locus coeruleus neurons by L-arginine/nitric oxide pathway. Soc Neurosci Abstr 1999; 25: 1208.
47. Pineda J, Torrecilla M, Martin Ruiz R, Ugedo L. Attenuation of withdrawal-induced hyperactivity of locus coeruleus neurones by inhibitors of nitric oxide synthase in morphine-dependent rats. Neuropharmacology 1998; 37: 759-767.

48. Javelle N, Berod A, Renaud B, Lambas-Señas L. NO synthase inhibitors attenuate locus coeruleus catecholamine metabolism and behavior induced by morphine withdrawal. Neuroreport 2002; 13: 725-728.
49. Desvignes C, Robert F, Vachette C, Chouvet G, Cespuglio R, Renaud B, et al. Monitoring nitric oxide (NO) in rat locus coeruleus: differential effects of NO synthase inhibitors. Neuroreport 1997; 8: 1321-1325.
50. Hall S, Milne B, Jhamandas K. Excitatory action of N-methyl-D-aspartate on the rat locus coeruleus is mediated by nitric oxide: an in vivo voltammetric study. Brain Res 1998; 796: 176-186.
51. Vincent SR, Kimura H. Histochemical mapping of nitric oxide synthase in the rat brain. Neuroscience 1992; 46: 755-784.
52. Cuéllar B, Fernandez AP, Lizasoain I, Moro MA, Lorenzo P, Bentura ML et al. Up-regulation of neuronal NO synthase immunoreactivity in opiate dependence and withdrawal. Psychopharmacology (Berl) 2000; 148: 66-73.
53. De Vente J, Steinbusch HWM. Nitric oxide-cGMP signalling in the rat brain. En: Steinbusch HWM, De Vente J, Vincent SR eds. Handbook of Chemical Neuroanatomy: Functional Neuroanatomy of the Nitric Oxide System. Amsterdam: Elsevier Science BV, 2002: 355-415.
54. Adams ML, Kalicki JM, Meyer ER, Cicero TJ. Inhibition of the morphine withdrawal syndrome by a nitric oxide synthase inhibitor. N^G-nitro-L-arginine. Life Sci 1993; 52: 245-249.
55. Kimes AS, Vaupel DB, London ED. Attenuation of some signs of opioid withdrawal by inhibitors of nitric oxide synthase. Psychopharmacology (Berl) 1993; 112: 521-524.
56. Majeed NH, Przewlocka B, Machelska H, Przewlocki R. Inhibition of nitric oxide synthase attenuates the development of morphine tolerance and dependence in mice. Neuropharmacology 1994; 33: 189-192.
57. Vaupel DB, Kimes AS, London ED. Further in vivo studies on attenuating mophine withdrawal: isoform-selective nitric oxide synthase inhibitors differ in efficacy. Eur J Pharmacol 1997; 324: 11-20.
58. Bhargava HN, Thorat SN. Evidence for a role of nitric oxide of the central nervous system in morphine abstinence syndrome. Pharmacology 1996; 52: 86-91.
59. Leza J-C, Lizasoain I, Cuéllar B, Moro MA, Lorenzo P. Correlation between brain nitric oxide synthase activity and opiate withdrawal. Naunyn-Schmiedebergs Arch Pharmacol 1996; 353: 349-354.
60. Hall S, Milne B, Jhamandas K. Nitric oxide synthase inhibitors attenuate acute and chronic morphine withdrawal response in the rat locus coeruleus: an in vivo voltammetric study. Brain Res 1996; 739: 182-191.
61. Hall S, Milne B, Jhamandas K. Excitatory action of N-methyl-D-aspartate on the rat locus coeruleus is mediated by nitric oxide: an in vivo voltammetric study. Brain Res 1998; 796: 176-186.
62. Sullivan ME, Hall SR, Milne B, Jhamandas K. Supression of acute and chronic opioid withdrawal by a selective soluble guanylyl cyclase inhibitor. Brain Res 2000; 859: 45-56.
63. Koch T, Schulz S, Höllt V. Different intracellular signalling systems involved in opioid tolerance/dependence. En: Maldonado R, ed. Molecular Biology of Drug Addiction. Totowa (EE.UU.): Humana Press, 2003; 45-60.
64. Harrison LM, Kastin AJ, Zadina JE. Opiate tolerance and dependence: receptors, G-proteins, and antiopiates. Peptides 1998; 19: 1603-1630.
65. Law P-Y, Wong YH, Loh HH. Molecular mechanisms and regulation of opioid receptor signaling. Annu Rev Pharmacol Toxicol 2000; 40: 389-430.
66. Liu J-G, Anand KJS. Protein kinases modulate the cellular adaptations associated with opioid tolerance and dependence. Brain Res Rev 2001; 38: 1-19.
67. Bohn LM, Lefkowitz RJ, Gainetdinov RR, Peppel K, Caron MG, Lin F-T. Enhanced morphine analgesia in mice lacking beta-arrestin 2. Science 1999; 286: 2495-2498.
68. Bohn LM, Lefkowitz RJ, Caron MG. Differential mechanisms of morphine antinociceptive tolerance revealed in betaarrestin-2 knock-out mice. J Neurosci 2002; 22: 10494-10500.
69. Perry SJ, Baillie GS, Kohout TA, McPhee I, Magiera MM, Ang KL et al. Targeting of cyclic AMP degradation to beta2-adrenergic receptors by beta-arrestins. Science 2002; 298: 834-836.
70. Stafford K, Gomes B, Shen J, Yoburn BC. Mu-opioid receptor donregulation contributes to opioid tolerance in vivo. Pharmacol Biochem Behav 2001; 69: 233-237.
71. Harris, GC, Williams JT. Transient homologous µ-opioid receptor desensitization in rat locus coeruleus neurons. J Neurosci 1991; 11: 2574-2581.
72. Kovoor A, Henry DJ, Chavkin C. Agonist-induced desensitization of the mu opioid receptor-coupled potassium channel (GIRK1). J Biol Chem 1995; 270: 589-595.
73. Terwilliger RZ, Ortiz J, Guitart X, Nestler EJ. Chronic morphine administration increases beta-adrenergic receptor kinase (beta ARK) levels in the rat locu coeruleus. J Neurochem 1994; 63: 1983-1986.
74. Fan X, Zhang J, Zhang X, Yue W, Ma L. Acute and chronic morphine treatments and morphine withdrawal differentially regulate GRK2 and GRK5 gene expression in rat brain. Neuropharmacology 2002; 43: 809-816.
75. Sim LJ, Selley DE, Dworkin SI, Childers SR. Effects of chronic morphine administration on micro opioid receptor-stimulated [^{35}S]GTPgammaS autoradiography in rat brain. J Neurosci 1996; 16: 2684-2692.
76. Sim-Selley LJ, Selley DE, Vogt LJ, Childers SR, Martin TJ. Chronic heroin self-administration desensitizes µ opioid receptor-activated G-proteins in specific regions of rat brain. J Neurosci 2000; 20: 4555-4562.

77. Blanchet C, Lüscher C. Desensitization of μ-opioid receptor-evoked potassium currents: initiation at the receptor, expression at the effector. Proc Natl Acad Sci USA 2002; 99: 4674-4679.
78. Van Bockstaele EJ, Commons KG. Internalization of mu-opioid receptors produced by etorphine in the rat locus coeruleus. Neuroscience 2001; 108: 467-477.
79. Kirschke C, Schadrack J, Zieglgänsberger W, Spanagel H. Effects of morphine withdrawal on μ-opioid receptor-stimulated guanylyl 5´-[γ-[^{35}S]thio]-triphosphate autoradiography in rat brain. Eur J Pharmacol 2002; 446: 43-51.
80. Gold SJ, Ni YG, Dohlman HG, Nestler EJ. Regulators of G-protein signaling (RGS) proteins: region-specific expression of nine subtypes in rat brain. J Neurosci 1997; 17: 8024-8037.
81. Van Bockstaele EJ, Peoples J, Menko AS, McHugh K, Drolet G. Decreases in endogenous opioid peptides in the rat medullo-coerulear pathway after chronic morphine treatment. J Neurosci 2000; 20: 8659-8666.
82. Kong J-Q, Meng J, Biser PS, Fleming WW, Taylor DA. Cellular depolarization of neurons in the locus ceruleus region of the guinea pig associated with the development of tolerance to opioids. J Pharmacol Exp Ther 2001; 298: 909-916.
83. Williams JT, Christie MJ, Manzoni O. Cellular and synaptic adaptations mediating opioid dependence. Pharmacol Rev 2001; 81: 299-343.
84. Fiorillo CD, Williams JT. Opioid desensitization: interaction with G-protein-coupled receptors in the locus coeruleus. J Neurosci 1996; 16: 1479-1485.
85. Trujillo KA, Akil H. Inhibition of morphine tolerance and dependence by the NMDA receptor antagonist MK-801. Science 1991; 251: 85-87.
86. Herman BH, Vocci F, Bridge P. The effects of NMDA receptor antagonists and nitric oxide synthase inhibitors on opioid tolerance and withdrawal. Neuropsychopharmacology 1995; 13: 269-293.
87. Pu S, Horvath TL, Diano S, Naftolin F, Kalra PS, Kalra SP. Evidence showing that beta-endorphin regulates cyclic guanosine 3´,5´-monophosphate (cGMP) efflux: anatomical and functional support for an interaction between and nitric oxide. Endocrinology 1997; 138: 1537-1543.
88. Ganapathy KB, Mahesh VB, Ping L, Chorich L, Wiedmeier VT, Brann DW. Opioid-glutamate-nitric oxide connection in the regulation of luteinizing hormone secretion in the rat. Endocrinology 1998; 139: 955-960.
89. Mantione K, Zhu W, Rialas C, Casares F, Cadet P, Franklon AL et al. Morphine 6 glucuronide stimulates nitric oxide release in mussel neural tissues: evidence for a morphine 6 glucuronide opiate receptor subtype. Cell Mol Life Sci 2002; 59: 570-574.
90. Przewlocki R, Machelska H, Przewlocka B. Inhibition of nitric oxide synthase enhances morphine antinociception in the rat spinal cord. Life Sci 1993; 53: PL1-5.
91. Hall CW, Behbehani MM. Synaptic effects of nitric oxide on enkephalinergic, GABAergic, and glutamatergic networks of the rat periaqueductal gray. Brain Res 1998; 805: 69-87.
92. Bhargava HN, Kumar S, Barjavel MJ. Kinetic properties of nitric oxide synthase in cerebral cortex and cerebellum of morphine tolerant mice. Pharmacology 1998; 56: 252-256.
93. Mao J, Price DD, Mayer DJ. Mechanisms of hyperalgesia and opiate tolerance: a current view of their possible interactions. Pain 1995; 62: 259-274.
94. Trujillo KA. The role of NMDA receptors in opiate tolerance, sensitization, and physical dependence. En: Herman BH, ed. Glutamate and Addiction. Totowa (EE.UU.): Humana Press, 2003; 295-322.
95. Christopoulos A, El-Fakahany EE. The generation of nitric oxide by G protein-coupled receptors. Life Sci 1999; 64: 1-15.
96. Mao J. NMDA and opioid receptors: their interactions in antinociception, tolerance and neuroplasticity. Brain Res Rev 1999; 30: 289-304.
97. Uzbay IT, Oglesby MW. Nitric oxide and substance dependence. Neurosci Biobehav Rev 2001; 25: 43-52.
98. Kolesnikov YA, Pick CG, Pasternak GW. N^G-nitro-L-arginine prevents morphine tolerance. Eur J Pharmacol 1992; 221: 399-400.
99. Xu JY, Hill KP, Bidlack JM. The nitric oxide/cyclic GMP system at the supraspinal site is involved in the development of acute morphine antinociceptive tolerance. J Pharmacol Exp Ther 1998; 284: 196-201.
100. Rauhala P, Idänpään-Heikkilä JJ, Tuominen RK, Männistö PT. N-Nitro-L-arginine attenuates development of tolerance to antinociceptive but not to hormonal effects of morphine. Eur J Pharmacol 1994; 259: 57-64.
101. Highfield DA, Grant S. N^G-nitro-L-arginine, a NOS inhibitor, reduces tolerance to morphine in the rat locus coeruleus. Synpase 1998; 29: 233-239.
102. Pineda J, Santamarta MT, Ulibarri I. 7-nitroindazol, a neuronal nitric oxide synthase inhibitor, attenuates the development of morphine tolerance in rats. Meth Find Exp Clin Pharmacol 2002; 24: 121.
103. Lue W-M, Su M-T, Lin W-B, Tao P-L. The role of nitric oxide in the development of morphine tolerance in rat hippocampal slices. Eur J Pharmacol 1999; 383: 129-135.
104. Torrecilla M, Pineda J, Ugedo L. NO synthase inhibitors reduce opioid desensitization in rat locus coeruleus neurons in vitro. Neuroreport 2001; 12: 1601-1604.
105. Pineda J, Santamarta MT. Neuronal nitric oxide synthase inhibitors reduce agonist-induced desensitization of mu-opioid receptors in rat locus coeruleus in vitro. Soc Neurosci Abstr 2001; 27: 91.
106. Pineda J, Santamarta MT. Involvement of nitric oxide in the desensitization of mu opioid receptors in rat locus coeruleus. Soc Neurosci Abstr 2002; 28.
107. Pineda J, Santamarta MT. Desensitization of mu opioid receptors in rat locus coeruleus is mediated by nitric oxide but not by cyclic GMP. Actas I Congreso Europeo de Trastornos Adictivos, 2003.

DISCUSIÓN

F. RODRÍGUEZ DE FONSECA: Existen trabajos que ponen de manifiesto que los endocannabinoides participan también en señales que pueden ser retrógradas, y no postsinápticas. También pueden modular el peso de una sinapsis determinada, básicamente en sinapsis que utilizan glutámico o GABA. Dada la estrecha relación que existe entre sistema cannabinoide y sistema opioide, ¿tenéis algún dato adicional sobre otros factores, como la anandamida?

J. PINEDA: Tenemos datos preliminares de estudios, en animal anestesiado y en cortes de cerebro, de efectos de cannabinoides en *locus coeruleus. In vivo*, parece que, al contrario de lo que esperaríamos, los cannabinoides aplicados de forma intravenosa lo que hacen es estimular las neuronas del *locus coeruleus. In vitro*, sin embargo, el efecto parece ser el contrario, es decir, inhibitorio. Hay un grupo, el de Gessa, que presentó un póster en el anterior congreso de neurociencias, celebrado en Orlando, en el que mostraba resultados muy similares. *In vivo* existe una estimulación de las neuronas del *locus* y ese efecto ellos sí que lo han discriminado, y pienso que es un efecto presináptico. Una inhibición del tono gabaérgico presente normalmente en animales *in vivo* en el *locus coeruleus.* Se produce una inhibición del mecanismo inhibitorio, que resulta, por tanto, en estimulación.

F. RODRÍGUEZ DE FONSECA: Pero no sería mediado a través del glutámico.

J. PINEDA: No, según esa hipótesis sería más bien mediado por inhibición de la liberación de GABA. Tenemos otros resultados preliminares sobre el efecto de la anandamida, modulando las respuestas de NMDA, donde parece que las potencia. Esto lo hemos realizado recientemente en *locus coeruleus*.

I. COLADO: ¿Tienes datos relativos al efecto que los inhibidores de la NOS producen sobre la temperatura corporal de los animales y su repercusión en los efectos posteriores que has demostrado, sobre todo cuando se administran *in vivo*? En concreto, el 7-nitroindazol produce una respuesta hipotérmica muy visible en los animales, querría saber si lo habéis considerado y qué crees tú que puede representar esta respuesta hipotérmica en los efectos posteriores. Otra pregunta sería si tienes algunos datos con inhibidores selectivos de la NOS inducible.

J. PINEDA: En los experimentos realizados en animal anestesiado se mantiene siempre constante la temperatura, que es controlada mediante una sonda rectal. Así mismo, en los experimentos con rodajas, la preparación está en la cámara. Lo que no sé es si el tratamiento crónico con 7NI tiene algún tipo de efecto hipotérmico. Respecto a la segunda pregunta, no tenemos ningún dato de la NOS inducible, pero sí tenemos algunos de la NOS endotelial. Hemos probado un inhibidor selectivo en la NOS endotelial y no parece hacer ningún efecto. Todo esto realizado en preparaciones de rodaja.

I. COLADO: Nosotros hemos utilizado el 7NI como neuroprotector en el laboratorio y hemos observado hipotermia tras administración de dosis única, de 25 a 50 mg/kg. Al menos 2 ºC por debajo de la temperatura habitual de los animales.

E. AMBROSIO: Querría preguntarte si habéis llevado a cabo en animales anestesiados lo mismo que nos has presentado del estudio en rodajas, y qué diferencias o semejanzas existen en los resultados.

J. PINEDA: Los experimentos de abstinencia y de hiperactividad de neuronas los hemos realizado *in vivo*, no *in vitro*, al esperar que el mecanismo supuestamente extrínseco tuviera una repercusión más importante *in vivo* que *in vitro*. No hemos llevado a cabo una comparación de ese tipo de modelo *in vitro* e *in vivo*. Por otra parte, los experimentos de desensibilización aguda los hemos realizado en rodajas, pero no hemos realizado este tipo de experimentos *in vivo*. No hemos realizado, por tanto, la comparación entre ambos modelos. Utilizamos un modelo u otro dependiendo de cuál es el objetivo del estudio. Por último, en el caso de la desensibilización tras el tratamiento con 7NI, que es un tratamiento lógicamente *in vivo*, hacemos una preparación de rodaja y observamos farmacológicamente la sensibilidad del receptor. En cierta forma el efecto del 7NI en este caso es un efecto *in vivo*, porque se hace durante el tratamiento crónico. En el caso de las rodajas y la desensibilización aguda es un efecto *in vitro*, porque se hace en el perfundido. O sea, que de alguna forma sí hay correspondencia de datos de un modelo a otro, pero no tenemos comparaciones exactas de todos los modelos.

Adaptaciones moleculares durante la tolerancia y dependencia a opioides

A. Díaz, E. Pérez San Emeterio, M. Tramullas, E. Valdizán, A. Pazos y M.A. Hurlé

Departamento de Fisiología y Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad de Cantabria, Santander.

Introducción

Los fármacos más eficaces para el tratamiento del dolor en la clínica son los analgésicos opiáceos, cuyo prototipo es la morfina. Esta familia de fármacos ejerce sus acciones mediante la activación de receptores opioides tipo μ, δ y κ, cuya señal es transmitida a través de proteínas G inhibidoras (Gi/Go) que modulan la función de diversos efectores celulares. De ellos los mejor caracterizados son la vía de la adenililciclasa, los canales de Ca^{++} y de K^{+} dependientes de voltaje y la vía de la MAP cinasa (mitogen-activated protein kinase)[1].

La administración crónica y mantenida de opiáceos conduce al desarrollo de tolerancia y dependencia, fenómenos íntimamente ligados al proceso adictivo. La tolerancia se caracteriza por una pérdida de potencia del opiáceo, que conduce a una escalada en la dosis necesaria para obtener efecto analgésico. La dependencia física se caracteriza por la aparición de un síndrome de abstinencia característico cuando se interrumpe bruscamente la administración del opiáceo, o cuando se administra un antagonista de receptores opiáceos. Los mecanismos adaptativos neuronales que se ponen en marcha durante el tratamiento crónico con opiáceos, responsables de los procesos de tolerancia y dependencia, todavía están mal definidos. Se han descrito cambios celulares que afectan al número de receptores opioides, la expresión de proteínas G, el acoplamiento receptor-proteína G, la regulación de segundos mensajeros y cinasas, la trascripción de genes, la expresión factores de crecimiento y la funcionalidad de otros sistemas de neurotransmisión[2-4].

Desensibilización y reducción del número de receptores opioides

Del mismo modo que sucede con otros receptores asociados a proteínas G, la activación por agonistas del receptor opioide provoca una rápida desensibilización homóloga que va seguida de la internalización del receptor vía endocitosis y, a más largo plazo, de una disminución en el número de receptores asociados a la membrana *(down-regulation)*. Cuando el receptor es activado por agonistas se produce su fosforilación por proteína cinasas, en particular por las cinasas de receptores acoplados a proteínas G (GRK). Dicha fosforilación provoca la fijación de proteínas arrestinas que promueven la endocitosis del receptor en vesículas de clatrina[5-7]. Una vez internalizado, el receptor es conducido a lisosomas para su degradación, con la consiguiente reducción en el número de receptores, o bien sufre un proceso de defosforilación y es reciclado de nuevo a la membrana. La disminución del número de receptores opioides asociados a la membrana ha sido uno de los mecanismos clásicamente invocados para justificar la pérdida de potencia de los fármacos opiáceos propia del fenómeno de tolerancia. En el caso de agonistas de elevada eficacia como el sufentanilo (fig. 1), ha sido claramente demostrada una reducción en la densidad de receptores opioides en el sistema nervioso central (SNC) mediante técnicas de fijación de radioligandos y autorradiografía[8]. Por el contrario, la morfina, en general, no produce *down-regulation* de los receptores opioides in vivo a pesar de que provoca una intensa tolerancia[9,10].

Las bases moleculares del fenómeno de *down-regulation* de receptores opioides no están claramente definidas. Estudios recientes indican que GRK y β-arrestina 2 participan en el proceso de desensibilización y secuestro de receptores opioides clonados en líneas celulares en cultivo[11-13]. La importancia fisiopatológica de dichas proteínas *in vivo* ha sido mucho menos estudiada. Ratas tratadas crónicamente con el opiáceo sufentanilo muestran un aumento en los niveles de expresión de GRK2, GRK3 y GRK6, así como de β-arrestina 2 en la corteza cerebral y el hipocam-

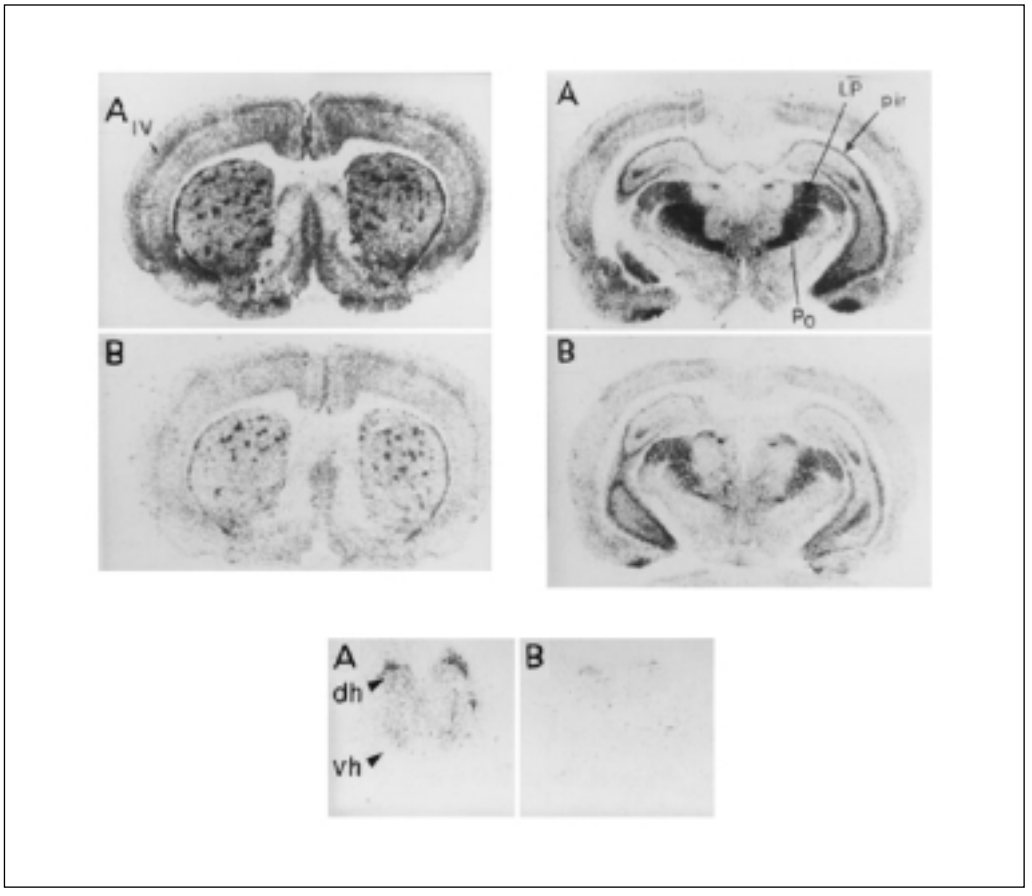


Fig. 1. Autorradiogramas representativos de la fijación del agonista opioide mu [^{3}H]DAMGO (5 nM) en secciones coronales de ratas a nivel del caudado-putamen, tálamo y médula espinal. A) Animales tratados con salino (7 días). B) Animales tratados con sufentanilo (2 µg/h, 7 días). IV: lámina IV de la corteza somatosensorial; pir: lámina piramidal del hipocampo; LP: núcleo lateroposterior talámico; Po: núcleo posterior talámico; dh: asta dorsal de la médula espinal; vh: asta ventral de la médula espinal.

po[14] (fig. 2). La expresión de GRK2 también está incrementada en el *locus coeruleus*[15] y en la corteza cerebral de ratas tratadas con morfina y en los cerebros de pacientes adictos a la heroína fallecidos por sobredosis[16]. Por otro lado, en ratones manipulados genéticamente que carecen de β-arrestina 2 la analgesia producida por morfina está potenciada y no se desarrolla tolerancia cuando la morfina se administra crónicamente[17,18]. Estos datos sugieren que GRK y β-arrestina 2 contribuyen *in vivo* a los procesos de adaptación celular responsables de la desensibilización, secuestro y *down-regulation* de los receptores opioides y al desarrollo de tolerancia.

Desacoplamiento de los receptores opioides de las proteínas Gi/o

Un método de gran utilidad para valorar el acoplamiento de los receptores opioides a sus correspondientes proteínas Gi/o consiste en el análisis de la capacidad de los agonistas para promover la fijación a membranas o secciones de SNC del análogo no hidrolizable [^{35}S]GTPγS. Los agonistas opioides administrados de forma aguda estimulan la fijación de [^{35}S]GTPγS en cultivos celulares y en membranas cerebrales, viéndose este estímulo marcadamente reducido tras el tratamiento crónico[19-21]. En la figura pue-

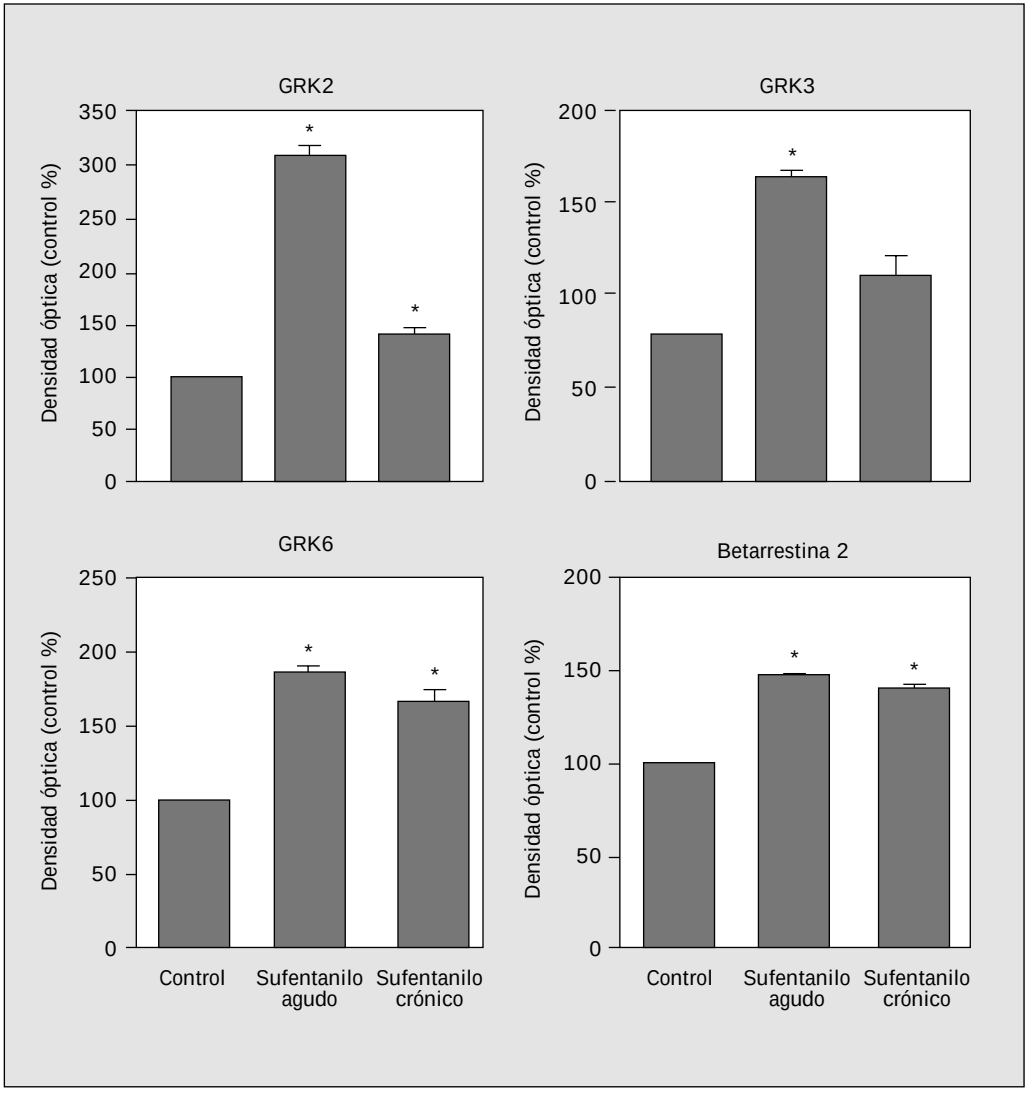


*Fig. 2. Expresión de GRK2, GRK3, GRK6 y β-arrestina 2 en lisados de corteza cerebral obtenidos de ratas tratadas 7 días con salino (control), tratadas de forma aguda con sufentanilo (1 µg/kg, s.c.) y tratadas crónicamente con sufentanilo (2 µg/h, 7 días). Los experimentos se realizaron mediante western blot. Los niveles de expresión se calcularon mediante densitometría (Scion Image software). Los resultados se expresan como media ± ESM del porcentaje de cambio en la densidad óptica del grupo de animales tratados en relación con el grupo control. El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA seguido del test de Dunnett. *p < 0,001.*

de observarse cómo en animales tratados crónicamente con sufentanilo se produce reducción del 40% en la fijación de [^{35}S]GTPγS inducida por DAMGO en secciones de médula espinal (fig. 3).

Regulación de la vía de la adenililciclasa

La regulación de la vía de la adenililciclasa tras la administración crónica de opiáceos está afectada de forma opuesta dependiendo de las re-

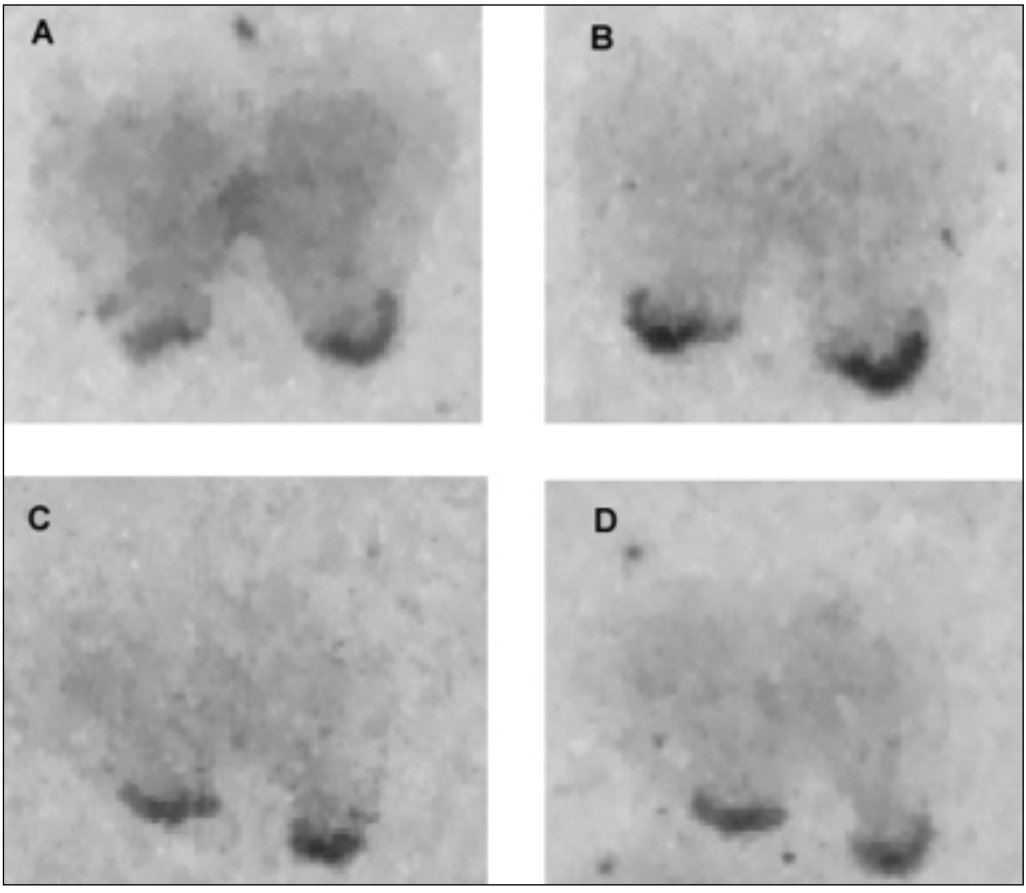


Fig. 3. Autorradiogramas representativos de la fijación [^{35}S]-GTPγS a nivel del asta dorsal de la médula espinal inducida por el agonista opioide mu DAMGO (10 µM). A y B) Animales tratados con salino 7 días; C y D) Animales tratados con sufentanilo (2 µg/h, 7 días). A y C representan la fijación basal de [^{35}S]-GTPγS. B y D representan el estímulo en la fijación de [^{35}S]-GTPγS provocado por DAMGO.

giones cerebrales analizadas. Típicamente se ha invocado una sensibilización de dicho sistema en áreas como el *locus coeruleus* y el núcleo *accumbens* en las manifestaciones del síndrome de abstinencia[3,4,22]. Por el contrario, en áreas como la corteza cerebral[23] y la médula espinal se observa el fenómeno contrario. Por un lado, la capacidad del opiáceo sufentanilo para inhibir la adenililciclasa tras su administración crónica se ve profundamente deprimida en ratas (fig. 4). Por otro lado, el desarrollo de tolerancia se acompaña de una inhibición en la respuesta a la propia forskolina que revierte mediante el bloqueo de canales de Ca^{++} tipo L. Teniendo en cuenta que la exposición crónica al sufentanilo provoca un aumento en la densidad de dichos canales en el SNC[24], es posible que un flujo incrementado de Ca^{++} esté relacionado con la disminución de la actividad enzimática de isoformas inhibidas por Ca^{++} de la adenililciclasa y con el desarrollo de tolerancia al sufentanilo.

Regulación de ARN mensajeros de factores de crecimiento transformante β durante la tolerancia y abstinencia a opiáceos

En los últimos años se ha observado que factores neurotróficos pertenecientes a la familia

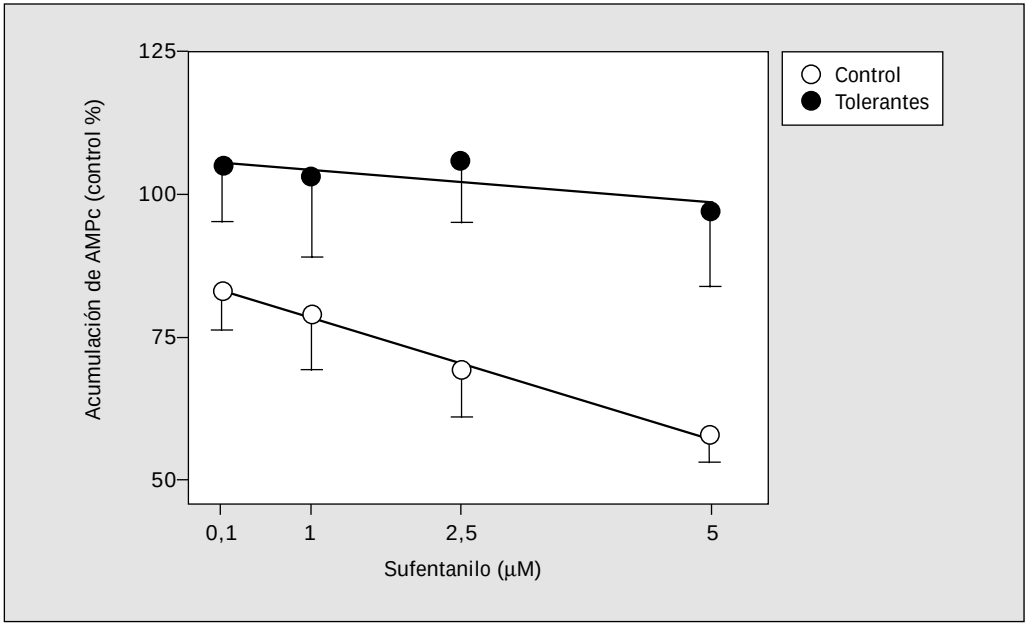


Fig. 4. Efecto inhibitorio del sufentanilo sobre la actividad de la adenililciclasa en mini prismas de cortezas cerebrales procedentes de ratas control y de ratas tratadas con sufentanilo (2 µg/h, 7 días). La capacidad del sufentanilo para inhibir la actividad de la adenililciclasa se evaluó incubando los mini prismas corticales con forskolina (10 µM) en presencia de concentraciones crecientes del opiáceo. Se midió la acumulación de adenosinmonofosfato cíclico (AMPc) mediante desplazamiento isotópico utilizando un kit comercial (TRK 432, Amersham International PLC, Amersham, UK). Las curvas concentración-respuesta se elaboraron con los valores medios ± ESM de los porcentajes de acumulación de AMPc respecto a los valores basales en el grupo de animales tratados y en el grupo control.

de las neurotrofinas[25] y el GDNF[26] están implicados en los procesos adaptativos desencadenados por el tratamiento crónico con opiáceos. Las activinas, miembros de la familia de factores de crecimiento transformante TGFβ, desempeñan un importante papel neurotrófico en el SNC[27-29]. La administración crónica de morfina provoca un incremento en los niveles de expresión de los ARNm de activinas, sus receptores (ALK4) y sus antagonistas (folistatina y BAMBI) en áreas del SNC. La expresión de ARNm de activina β-A (fig. 5) se induce fundamentalmente en hipocampo, en el caudado-putamen y en la corteza somatosensorial. La expresión de ARNm de activina β-B se induce fundamentalmente en hipocampo en las regiones CA2 y CA3. La expresión de ARNm de BAMBI se induce, fundamentalmente, en el giro dentado del hipocampo y en la corteza retrosplenial y piriforme. La expresión de folistatina incrementa en hipocampo y corteza piriforme. En los animales sometidos a 24 h de abstinencia precipitada con naltrexona, la expresión de ARNm de activinas y BAMBI desaparece en todas las regiones. De modo similar, aquellos animales a los que 15 min antes de la administración de la naltrexona son pretratados con nimodipina, a una dosis que no modifica la intensidad del síndrome de abstinencia, la expresión de ARNm de activinas y BAMBI es indetectable. Por el contrario, en aquellos animales pretratados con nimodipina, a una dosis eficaz, protectora frente al síndrome de abstinencia opiáceo, los niveles de expresión de ARNm de activinas y BAMBI alcanzan valores incluso superiores a los que presentan los animales tratados con morfina pero no sometidos a abstinencia. Estos resultados sugieren un papel para activinas en la tolerancia y abstinencia opiácea.

Agradecimientos

Los autores agradecen la asistencia técnica de Nieves García-Iglesias, Lourdes Lanza y Josefa

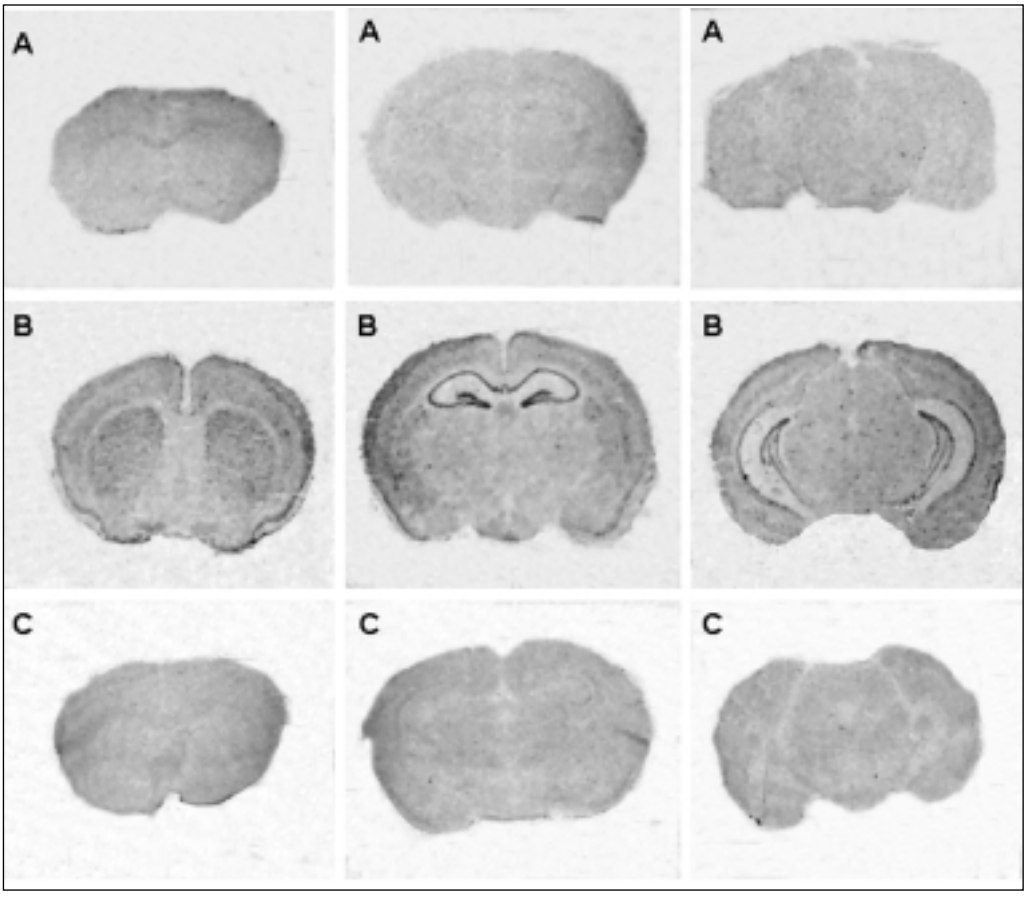


Fig. 5. Hibridación in situ representativa de la expresión de ARN mensajero de activina β–A en el sistema nervioso central de: A) ratones control; B) ratones tratados crónicamente con morfina (200 mg/kg en liberación retardada durante 7 días), y C) ratones sometidos durante 24 h a un síndrome de abstinencia provocado con naltrexona (1 mg/kg). La ribosonda utilizada contenía aproximadamente 700 pares de bases y fue marcada con ^{35}S-UTP.

Castillo. Este trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Educación y Cultura: Plan Nacional I+D (SAF99-0284), y Programa FEDER (1FD97-1572).

BIBLIOGRAFÍA

1. Law PY, Wong YH, Loh HH. Molecular mechanisms and regulation of opioid recpetor signalling. Annu Rev Pharmacol Toxicol 2000; 40: 389-430.
2. Liu JG, Anand KJ. Protein kinases modulate the cellular adaptations associated with opioid tolerance and dependence. Brain Res Brain Res Rev 2001; 38: 1-19.
3. Nestler EJ, Aghajanian GK. Molecular and cellular basis of addiction. Science 1997; 278: 58-63.
4. Nestler EJ. Molecular mechanisms of opiate and cocaine addiction. Curr Opin Neurobiol 1997; 7: 713-719.
5. Kohout TA, Lefkowitz RJ. Regulation of G protein-coupled receptor kinases and arrestins during receptor desensitization. Mol Pharmacol 2003; 63: 9-18.
6. Kovoor A, Celver JP, Wu A, Chavkin C. Agonist induced homologous desensitization of mu-opioid receptors mediated by G protein-coupled receptor kinases is dependent on agonist efficacy. Mol Pharmacol 1998; 54: 704-711.
7. Pitcher JA, Freedman NJ, Lefkowitz RJ. G protein-coupled receptor kinases. Annu Rev Biochem 1998; 67: 653-692.

8. Díaz A, Pazos A, Flórez J, Hurlé MA. Autoradiographic mapping of mu-opioid receptors during opiate tolerance and supersensitivity in the rat central nervous system. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 2000; 362: 101-109.
9. Eisinger DA, Ammer H, Schulz R. Chronic morphine treatment inhibits opioid receptor desensitization and internalization. J Neurosci 2002; 22: 10192-10200.
10. Kieffer BL, Evans CJ. Opioid tolerance-in search of the holy grail. Cell 2002; 108: 587-590.
11. Schulz R, Wehmeyer A, Schulz K. Opioid receptor types selectively cointernalize with G protein-coupled receptor kinases 2 and 3. J Pharmacol Exp Ther 2002; 300: 376-384.
12. Wang HL. A cluster of Ser/Thr residues at the C-terminus of m-opioid receptor is required for G protein-coupled receptor kinase 2-mediated desensitization. Neuropharmacology 2000; 39: 353-363.
13. Zhang J, Ferguson SS, Barak LS, Bodduluri SR, Laporte SA, Law PY et al. Role for G protein-coupled receptor kinase in agonist-specific regulation of mu-opioid receptor responsiveness. Proc Natl Acad Sci USA 1998; 95: 7157-7162.
14. Hurlé MA. Changes in the expression of G-protein coupled receptor kinases and β-arrestin 2 in rat brain during opioid tolerance and supersensitivity. J Neurochemistry 2001; 77: 486-492.
15. Terwilliger RZ, Ortiz J, Guitart X, Nestler EJ. Chronic morphine administration increases beta-adrenergic receptor kinase (beta ARK) levels in the rat locus coeruleus. J Neurochem 1994; 63: 1983-1986.
16. Ozaita A, Escriba PV, Ventayol P, Murga C, Mayor F, Garcia-Sevilla JA. Regulation of G protein-coupled receptor kinase 2 in brains of opiate-treated rats and human opiate addicts. J Neurochem 1998; 70: 1249-1257.
17. Bohn LM, Gainetdinov RR, Lin FT, Lefkowitz RJ, Caron MG. Mu-opioid receptor desensitization by beta-arrestin-2 determines morphine tolerance but not dependence. Nature 2000; 408: 720-723.
18. Bohn LM, Lefkowitz RJ, Gainetdinov RR, Peppel K, Caron MG, Lin FT. Enhanced morphine analgesia in mice lacking beta-arrestin 2. Science 1999; 286: 2495-2498.
19. Meana JJ, Gonzalez-Maeso J, Garcia-Sevilla JA, Guimon J. Mu-opioid receptor and alpha2-adrenoceptor agonist stimulation of [35S]GTPgammaS binding to G-proteins in postmortem brains of opioid addicts. Mol Psychiatry 2000; 5: 308-315.
20. Sim LJ, Selley DE, Dworkin SI, Childers SR. Effects of chronic morphine administration on mu opioid receptor-stimulated [35S]GTPgammaS autoradiography in rat brain. J Neurosci 1996; 16: 2684-2692.
21. Sim-Selley LJ, Selley DE, Vogt LJ, Childers SR, Martin TJ. Chronic heroin self-administration desensitizes mu opioid receptor-activated G-proteins in specific regions of rat brain. J Neurosci 2000; 20: 4555-4562.
22. Williams JT, Christie MJ, Manzoni O. Cellular and synaptic adaptations mediating opioid dependence. Physiol Rev 2000; 81: 299-343.
23. Hurlé MA, Goirigolzarri I, Valdizán E. Involvement of the cyclic AMP system in the switch from tolerance into supersensitivity to the antinociceptive effect of the opioid sufentanil in rats. Br J Pharmacol 2000; 130: 174-180.
24. Díaz A, Flórez J, Pazos A, Hurlé, MA. Opioid tolerance and supersensitivity induce regional changes in the autoradiographic density of dihydropyridine-sensitive calcium channels in the rat central nervous system. Pain 2000; 86: 227-235.
25. Akbarian S, Rios M, Liu RJ, Gold SJ, Fong HF, Zeiler S et al. Brain-derived neurotrophic factor is essential for opiate-induced plasticity of noradrenergic neurons. J Neurosci 2002; 22: 4153-4162.
26. Messer CJ, Eisch AJ, Carlezon WA Jr, Whisler K, Shen L, Wolf DH et al. Role for GDNF in biochemical and behavioral adaptations to drugs of abuse. Neuron 2000; 26: 247-257.
27. Bottner M, Krieglstein K, Unsicker K. The transforming growth factor-betas: structure, signaling, and roles in nervous system development and functions. J Neurochem 2000; 76: 2227-2240.
28. Hughes PE, Alexi T, Williams CE, Clark RG, Gluckman PD. Administration of recombinant human Activin-A has powerful neurotrophic effects on select striatal phenotypes in the quinolinic acid lesion model of Huntington's disease. Neuroscience 1999; 92: 197-209.
29. Schubert D, Kimura H, LaCorbiere M, Vaughan J, Karr D, Fischer WH. Activin is a nerve cell survival molecule. Nature 1990; 344: 868-870.

DISCUSIÓN

E. PORTILLO: ¿Por qué en algunos estudios has utilizado morfina para la tolerancia habiendo utilizado sufentanilo en los previos? Supongo que la elección del fármaco debe tener particular importancia. No sucederá lo mismo con morfina que con sufentanilo, o con otros de menor potencia.

M.A. HURLÉ: Los últimos datos que he presentado están enmarcados dentro de un estudio en el que analizamos de forma comparativa el comportamiento de los opiáceos más utilizados, heroína, morfina y metadona. En este momento los datos que tenemos analizados son los de morfina. Los estudios con metadona y heroína están en marcha. Nos pareció que, en relación con los procesos de tolerancia o de dependencia, tendría más interés saber qué sucede con dichos opiáceos. El sufentanilo fue elegido inicialmente por su gran afinidad por los receptores mu, por su gran potencia y por ser un fármaco de manejo cómodo.

E. PORTILLO: ¿No sería interesante incluir un fármaco de menor eficacia intrínseca como la buprenorfina? La buprenorfina genera una tolerancia muy rápida, pero no creo que desencadene todos estos mecanismos adaptativos.

M.A. HURLÉ: En los animales tratados con sufentanilo se observan una serie de procesos adaptativos que seguramente tendrán mucha importancia, pero que en el caso de los opiáceos no se puede concluir que un determinado mecanismo se pone en marcha de forma universal para todos ellos. Se ha demostrado, por ejemplo, que morfina es capaz de desarrollar tolerancia sin internalizar los receptores. Los fármacos que no internalizan el receptor estarían activando los efectores celulares de forma mantenida generando importantes mecanismos adaptativos responsables del desarrollo de tolerancia. Por el contrario, aquellos opiáceos que permiten la internalización del receptor permitirían a la célula cortar la señal sin necesidad de otro tipo de adaptaciones, generando mucha menos tolerancia. Esto es una teoría que encaja muy bien con los estudios realizados en cultivos celulares, pero yo tengo dudas respecto a su extrapolación al animal de experimentación o a la clínica.

E. PORTILLO: ¿Habéis realizado autorradiografía de canales de potasio?

M.A. HURLÉ: De canales de potasio no, aunque sí la hicimos de canales de calcio.

C. GOICOECHEA: En cuanto a los RGS, ¿actúan selectivamente sobre distintos tipos de proteínas G, Gi, Go, Gq?

M.A. HURLÉ: Está todavía bastante confuso. Lo que se expone es que la conformación que adquiere el receptor unido a un ligando concreto modifica la función de determinadas RGS, y esto podría incluso condicionar el tipo de vía de señalización que se va a poner en marcha. Parece que las funciones de las RGS son muy complejas. No existen datos concluyentes sobre su selectividad por una determinada proteína G.

R. MALDONADO: Referente al estudio de RGS y sufentanilo, ¿hasta qué punto consideras que la *down regulation* puede ejercer un papel importante? Por ejemplo, tenemos los estudios de M. Caron y R. Lefkowitz que demuestran esto de la betaarrestina y el estudio J. Whistler que demuestra lo contrario, morfina no produce *down regulation*.

M.A. HURLÉ: Estos estudios indican que morfina no internaliza los receptores, por tanto, no existe *down regulation*. Pero, curiosamente, en los ratones *knockout* de betaarrestina, se evita el desarrollo de tolerancia.

R. MALDONADO: Entonces mi duda está en cómo es posible explicar lo que se deduce del estudio de Whistler con lo que describe Lefkowitz.

M.A. HURLÉ: Es que yo no creo que ambos estudios sean coincidentes. Además, existen estudios en los que la morfina produce *down regulation.*

R. MALDONADO: Pero, ¿realmente relevantes *in vivo*? ¿También puede observarse *up regulation*?

M.A. HURLÉ: Sí, los hay, y también *up regulation*. También existen estudios en cultivos celulares en los que observa que un tratamiento muy breve con morfina no provoca internalización del receptor, pero si se mantiene ese tratamiento durante horas, sí se internaliza. También se observa internalización en respuesta a morfina cuando las células sobreexpresan GRK o betaarrestina. El problema es la extrapolación a modelos *in vivo* de los resultados obtenidos en cultivos transfectando el receptor o la proteína objeto de estudio. Por otro lado, establecer relaciones causa-efecto a partir de los resultados obtenidos *in vivo* es de una gran dificultad. Lo que obtenemos *in vivo* son pruebas circunstanciales de los fenómenos estudiados, pero generalmente no suelen ser concluyentes.

R. MALDONADO: Mi segunda pregunta es referente al sufentanilo. ¿Has encontrado en los animales tolerantes al sufentanilo una modificación en el umbral nociceptivo basal? Ya sabes que al menos con el fentanilo está claro que la tolerancia, que parece ser menor que con la morfina, se debe a una modificación basal en el umbral nociceptivo.

M.A. HURLÉ: No. Cuando se administra un tratamiento continuado con sufentanilo el umbral nociceptivo vuelve al valor basal.

R. MALDONADO: Pero, ¿no hay modificación del umbral basal en tus condiciones experimentales?

M.A. HURLÉ: El séptimo día no existen cambios en el umbral basal. Sin embargo, cuando realizamos estudios crónicos con animales que están tratados con metadona éstos muestran hiperalgesia. Tienen más bajo el umbral doloroso. Con metadona lo observamos, con sufentanilo no.

M. MIQUEL: Una cuestión sobre el alcohol. Sabemos que los efectos del alcohol están ligados a la activación de proyecciones propiomelanocortinérgicas, sobre todo las de betaendorfinas, desde el arqueado y, por tanto, a receptores mu, fundamentalmente, aunque el tema de los receptores delta está muy discutido. ¿Sabes si alguno de estos mecanismos, que vosotros habéis estudiado y proponéis, pudiera estar también participando en la tolerancia al alcohol?

M.A. HURLÉ: Algunos de estos estudios que he mostrado, como el del análisis de los canales de calcio tipo L dependientes de voltaje, buscaban fórmulas de prevención del desarrollo de tolerancia o de la abstinencia opiácea con fármacos. Nosotros habíamos estudiado el efecto de dihidropiridinas, en concreto de nimodipino, en el desarrollo de tolerancia y dependencia a opiáceos. Pues bien, el desarrollo de tolerancia y de dependencia a opiáceos es inhibido por antagonistas del calcio. Resultados similares se han obtenido en el caso del etanol, benzodiacepinas y barbitúricos. Los canales de calcio voltaje-dependientes están implicados en los procesos de tolerancia a varios fármacos, no sólo de opiáceos.

M. MIQUEL: La cuestión es si esta vía común involucra receptores mu o receptores opioides, o simplemente es una acción directa del alcohol sobre los canales del calcio, porque es totalmente diferente.

M.A. HURLÉ: No lo sé. Seguramente R. Maldonado te podrá indicar cómo están modificadas la dependencia y la tolerancia al etanol en los ratones *knockout* del receptor mu.

R. MALDONADO: Los ratones *knockout* de receptor mu no se autoadministran alcohol. Al menos, las propiedades reforzantes del etanol están disminuidas en el caso del *knockout* de mu. Está claro que para el refuerzo inducido por el etanol el receptor mu y los opioides endógenos ejercen un papel fundamental.

E. AMBROSIO: A nivel clínico, en estos momentos uno de los temas que se debaten continuamente es si no será mejor darles heroína a los heroinómanos. Parece fácil de responder que sí, pero claro, hay que justificarlo. Les hemos dado metadona durante mucho tiempo, porque era una sustancia aceptada por la sociedad, pero estamos buscando argumentos suficientes como para decir que sí a la heroína, y parece ser que la internalización o no de los receptores lo podría justificar, porque en principio morfina y heroína no internalizarían los receptores y metadona sí. ¿Podríamos realmente justificar que hay gente a la que le va bien la metadona y otra a quien le va mal?, lo que ocurre muchas veces, y, por tanto, hay que administrarles heroína. No solamente es un problema farmacocinético, como decíamos hasta ahora con el citocromo P450 que toca la metadona y en cambio no la heroína, y lo argumentábamos por esta vía, sino que ¿ahora podríamos decir que existen fenómenos farmacodinámicos que hacen diferente la metadona de la heroína y la morfina?

M.A. HURLÉ: Realmente existen muy pocos estudios en el animal de experimentación con heroína, como también se dispone de pocos datos comparativos, en condiciones experimentales idénticas, entre metadona o morfina. Entre otras cosas, porque es difícil establecer una pauta de administración asimilable a uno u otro fármaco, debido a diferencias farmacocinéticas. También es necesario tener en cuenta un aspecto social importante, y es que para la administración de heroína se selecciona a personas que obtienen muy poco beneficio de los programas de mantenimiento con metadona. Cuando te comentaba que estamos haciendo el estudio comparativo entre metadona y heroína lo que más nos importa es el posible efecto deletéreo del tratamiento mantenido durante años con metadona o con heroína. Además, las pautas de administración de heroína, dos veces al día, condicionan el que estos pacientes van a padecer síndrome de abstinencia una buena parte del día, ya que la heroína no les va a cubrir las 24 h. Esto obliga a hacer una valoración de hasta qué punto los propios síndromes de abstinencia repetidos tienen efecto neurotóxico. Hay que tener presentes estos aspectos, no solamente para el tratamiento de heroinómanos, sino también para el tratamiento crónico del dolor en la clínica, donde puede que encontremos sorpresas importantes en este sentido.

E. AMBROSIO: Mucho cuidado con el síndrome de abstinencia en humanos, ya que hasta un 80% es controlable. Si un individuo cree que mañana tendrá heroína, el síndrome de abstinencia baja hasta casi desaparecer. Y si a un mismo individuo le dices que no la va a tener aunque se lo vayas a dar después, el síndrome de abstinencia sube. Es solamente una observación.

M.A. HURLÉ: Yo no tengo ninguna experiencia clínica, pero siempre he oído decir a personas implicadas en programas de mantenimiento con heroína que los pacientes adictos acuden a los dispensarios para recibir su dosis de heroína en condiciones de estrés, nerviosismo, agresividad, etc.

E. AMBROSIO: La experiencia suiza no opina eso. Me refiero a cambiar totalmente la expectativa, es otra cosa.

Mecanismos implicados en la dependencia de cannabinoides

R. Maldonado

Laboratori de Neurofarmacologia, Facultat de Ciències de la Salut i de la Vida, Universitat Pompeu Fabra, Barcelona.

Introducción

Los preparados obtenidos a partir de la planta *Cannabis sativa*, tales como la marihuana y el hashish, constituyen el grupo de drogas ilícitas de mayor consumo en humanos. Dichas preparaciones contienen un elevado número de compuestos psicoactivos, los cannabinoides, de entre los cuales destaca el Δ^9-tetrahidrocannabinol (THC)[1]. Sin embargo, el potencial adictivo en humanos de estos preparados continua siendo un tema controvertido.

Los procesos adictivos son complejos tanto desde un punto de vista neurobiológico como conductual. Un primer indicativo de dichos procesos está representado por el desarrollo de los fenómenos de tolerancia y de dependencia física que aparecen como consecuencia de la adaptación del organismo, y en particular del sistema nervioso central, a la presencia continuada de la droga. Sin embargo, estos fenómenos tan sólo constituyen un aspecto parcial de las capacidades adictivas de una sustancia. El principal punto en común de todas las drogas de abuso es su capacidad para inducir efectos reforzantes, que son aquellos efectos motivacionales positivos de suma importancia para inducir el comportamiento de búsqueda y consumo de una droga. Este artículo está centrado en los estudios que han permitido definir la capacidad de los cannabinoides para inducir fenómenos de tolerancia, dependencia y efectos reforzantes, así como los mecanismos neurobiológicos implicados en dichos fenómenos.

Fenómenos de tolerancia a los cannabinoides

La administración crónica de diferentes agonistas cannabinoides desarrolla un fenómeno de tolerancia a la mayor parte de sus respuestas farmacológicas, tal y como se ha demostrado en estudios realizados en diferentes especies animales: ratones, ratas, palomas, perros y monos[2,3]. Estos estudios han demostrado la aparición de tolerancia a los efectos inducidos por los cannabinoides sobre las respuestas al dolor, control de la motricidad, temperatura corporal, respuestas cognitivas, motilidad gastrointestinal, evolución del peso corporal, función cardiovascular, actividad anticonvulsivante y respuestas endocrinas. El desarrollo de la tolerancia cannabinoide es particularmente rápido en estos modelos animales, y una importante disminución del efecto farmacológico ya fue observada tras la segunda administración de una dosis elevada de cannabinoide[4,5].

Se ha sugerido que pueden participar diversos mecanismos de tipo farmacocinético en el desarrollo de la tolerancia cannabinoide, tales como cambios en la absorción, distribución, biotransformación y excreción de estos compuestos. Sin embargo, el papel desempeñado por el conjunto de estos mecanismos farmacocinéticos parece muy secundario o incluso inexistente[6,7].

Las modificaciones farmacodinámicas que afectan la expresión, características de fijación y actividad funcional de los receptores cannabinoides CB-1, parecen desempeñar un papel importante en el desarrollo de la tolerancia cannabinoide. En este sentido, el número total de receptores cannabinoides CB-1 disminuyó en diversas estructuras cerebrales durante la administración crónica de diversos agonistas cannabinoides[8-10]. Los niveles de RNAm que codifica el receptor cannabinoide CB-1 también resultaron disminuidos en distintas áreas del sistema nervioso central durante el tratamiento crónico con cannabinoides, sobre todo en la porción anterior del cerebro[11,12]. Esta disminución en la densidad y expresión de los receptores cannabinoides CB-1 parece ejercer un papel importante en el desarrollo de la tolerancia. La administración crónica de cannabinoides también modifica la expresión

y la actividad funcional de las proteínas G, las cuales se encuentran funcionalmente acopladas a los receptores cannabinoides. En particular, una disminución de la fijación de [^{35}S]GTPγS tras la administración de un agonista cannabinoide, se ha observado en un amplio número de estructuras cerebrales en animales que han recibido un tratamiento crónico con cannabinoides[13,14].

La duración temporal de los cambios bioquímicos inducidos por la administración crónica de cannabinoides es muy corta, en acuerdo con la corta duración del fenómeno de tolerancia cannabinoide[15]. En este sentido, la mayor parte de los cambios inducidos a nivel de la expresión del RNAm que codifica por los receptores cannabinoides CB-1 y las subunidades α de las proteínas G vuelven a sus niveles basales transcurridas unas pocas horas tras el cese del tratamiento con cannabinoides[16].

Fenómenos de dependencia física de cannabinoides

La aparición de manifestaciones somáticas de un síndrome de abstinencia espontáneo tras el cese del tratamiento crónico con THC no se ha podido observar en diferentes especies animales (ratón, rata, paloma, perro y mono), ni siquiera tras la administración de dosis sumamente elevadas[17-20]. Ciertos estudios antiguos han descrito la aparición de determinadas manifestaciones de abstinencia espontánea tras el cese de una administración crónica de THC por vía intravenosa en perros[21] y monos[22]. Sin embargo, estudios posteriores han puesto en duda dichos resultados al no ser posible revertir dichas manifestaciones espontáneas de abstinencia con una nueva administración de THC[4]. A pesar de la ausencia de signos somáticos de abstinencia espontánea, se ha podido observar que la interrupción de un tratamiento crónico con THC en monos produce una alteración de una conducta operante previamente adquirida. Dicha alteración ha sido interpretada como una manifestación de una abstinencia espontánea al THC[23]. El cese de un tratamiento crónico con otros agonistas cannabinoides tampoco dio lugar a manifestaciones somáticas de abstinencia[24]. Sin embargo, un estudio reciente ha descrito la aparición de un síndrome de abstinencia espontáneo tras la interrupción de un tratamiento crónico con el agonista cannabinoide WIN 55,212-2[20]. La corta vida media del WIN 55,212-2, en comparación con el THC, podría explicar estos diferentes resultados.

La aparición de un síndrome de abstinencia desencadenado por la administración aguda de un antagonista cannabinoide ha sido demostrada en múltiples estudios. En efecto, la administración del antagonista selectivo de los receptores CB-1, SR-141716A, en animales (ratón, rata y perro) que han recibido un tratamiento crónico con THC precipita diversos signos que manifiestan una abstinencia cannabinoide. Las dosis de THC requeridas para inducir dependencia física en roedores son muy elevadas. Así, la abstinencia desencadenada por SR-141716A ha sido descrita en roedores que han recibido un tratamiento crónico con una dosis diaria de THC comprendida entre 10 y 100 mg/kg[5,20,25-27]. Las manifestaciones somáticas más características de la abstinencia cannabinoide en roedores son movimientos de sacudida de tronco *(wet dog shake)* y cabeza, temblor de patas, ataxia, posturas anormales, temblor generalizado, ptosis, piloerección, disminución de la actividad locomotora, masticación, lameteo, fricción y rascado[5,20,25-27]. Durante la abstinencia cannabinoide en roedores cabe destacar la presencia de una importante alteración en el control de la motricidad, sin aparición de signos vegetativos[5,27]. En perros, se han descrito tanto signos somáticos como vegetativos durante el síndrome de abstinencia cannabinoide desencadenado por SR-141716A. Así, la abstinencia cannabinoide en esta especie animal incluye signos tales como diarrea, vómitos, salivación, disminución del comportamiento social, temblores e incremento del periodo de vigilia[28]. Los receptores cannabinoides CB-1 son responsables de las manifestaciones somáticas de la abstinencia cannabinoide. En este sentido, la administración de SR-141716A en ratones *knockout* deficientes en receptores cannabinoides CB-1 que recibieron un tratamiento crónico con THC no desencadenó ningún signo de abstinencia[26].

Mecanismos implicados en la dependencia física de cannabinoides

El síndrome de abstinencia cannabinoide se encuentra asociado a un incremento compensatorio en la actividad de un sistema de señalización acoplado al propio receptor cannabinoide, la cascada del adenilatociclasa. Inicialmente, la activación aguda del receptor cannabinoide produce una inhibición de la actividad adenilatociclasa[29]. En contraste, durante el síndrome de abstinencia cannabinoide aparece localmente en el cerebelo un incremento en la actividad de dicha enzima. Sin embargo, la actividad adenilatociclasa no se ha visto modificada durante la abstinencia en otras estructuras cerebrales, como el

córtex frontal, el hipocampo, el estriado y la sustancia gris periacueductal[5]. Un incremento similar en los niveles de adenosinmonofosfato cíclico y en la actividad de la proteína cinasa A, ambos pertenecientes al mismo sistema de señalización intracelular, fue observado durante el tratamiento crónico con THC en el cerebelo, estriado y córtex[14]. El incremento observado en la vía del adenilatociclasa en el cerebelo durante la abstinencia cannabinoide parece ejecer un papel importante en las manifestaciones somáticas de dicha abstinencia. Así, las manifestaciones somáticas de la abstinencia cannabinoide resultaron atenuadas tras la microinyección local en el cerebelo de un inhibidor selectivo de la vía del adenilatociclasa, el Rp-8Br-cAMPS[27].

Por otra parte, diversos estudios han descrito la existencia de interacciones bidireccionales entre los sistemas opioide y cannabinoide en el desarrollo de los fenómenos de dependencia física. Así, el antagonista cannabinoide SR-141716A desencadenó en ratas dependientes de morfina diversas manifestaciones conductuales y bioquímicas de abstinencia opioide[30]. Por otra parte, el antagonista opioide naloxona precipitó diversas manifestaciones de abstinencia en animales dependientes de cannabinoides[21,30]. En contraste con estos resultados obtenidos en ratas, un estudio reciente indica que la administración de SR-141716A no precipitó ninguna manifestación de abstinencia en ratones dependientes de morfina, ni la naloxona indujo ninguna modificación comportamental en ratones tratados crónicamente con THC[31]. El uso de diferentes especies animales (rata y ratón) podría explicar estos resultados aparentemente contradictorios.

Una importante disminución de la intensidad de la abstinencia morfínica se ha observado en ratones *knockout* deficientes en receptores cannabinoides CB-1 que sugiere la participación de dichos receptores cannabinoides en la dependencia opioide[26]. Así mismo, la administración aguda de diversos agonistas cannabinoides[31-33] disminuye la intensidad de la abstinencia morfínica. Un efecto similar se observó cuando los animales recibieron THC antes de inducir la dependencia morfínica. Así, un tratamiento crónico con THC durante 3 semanas antes de comenzar la administración de morfina, disminuyó las manifestaciones somáticas de la abstinencia opioide y no modificó los efectos reforzantes de la morfina[34]. En consecuencia, la preexposición crónica a cannabinoides no modifica las respuestas motivacionales inducidas por opioides en el animal de experimentación.

La participación del sistema opioide endógeno en la expresión de la abstinencia cannabinoide también se ha estudiado mediante la utilización de ratones *knockout.* Así, el síndrome de abstinencia cannabinoide desencadenado por SR-141716A resultó disminuido en animales *knockout* deficientes del precursor de las encefalinas endógenas (preproencefalina)[35], pero no resultó modificado en animales *knockout* deficientes del precursor de las dinorfinas endógenas (prodinorfina)[36]. La abstinencia cannabinoide tampoco resultó modificada en ratones *knockout* deficientes en receptores opioides delta o kappa[37]. En ratones deficientes en receptores opioides mu tan sólo se observó una disminución de la abstinencia cannabinoide cuando el THC fue administrado a dosis de 30 o 100 mg/kg[31], pero no se observó modificación alguna cuando el THC fue administrado a dosis de 10 o 20 mg/kg[31,37]. Sin embargo, en ratones doble mutantes deficientes de receptores opioides mu y delta se observó una disminución de la abstinencia cuando el THC se administró a la dosis de 20 mg/kg, sugiriendo que se requiere una cooperación de ambos receptores opioides para obtener una adecuada manifestación de la abstinencia cannabinoide[38].

La elevación de los niveles extracelulares de CRF *(corticotropin releasing factor)*[39] y la disminución de la actividad dopaminérgica[40] en el sistema mesolímbico constituyen modificaciones bioquímicas comunes durante la abstinencia a diversas drogas de abuso, como los opioides, los psicoestimulantes y el etanol. Alteraciones bioquímicas similares también se han observado durante la abstinencia cannabinoide. Así, un incremento en la liberación de CRF ha sido descrito en el sistema límbico durante la abstinencia cannabinoide, el cual podría estar relacionado con la aparición de síntomas de estrés y de disforia[41]. En acuerdo con esta hipótesis, la actividad electrofisiológica de las neuronas dopaminérgicas mesolímbicas resultó disminuida durante la abstinencia cannabinoide, sugiriendo también la presencia de un estado de disforia[42].

Propiedades reforzantes y motivacionales inducidas por los cannabinoides

Las propiedades reforzantes de los cannabinoides son difíciles de observar en los animales de experimentación mediante los modelos comportamentales normalmente utilizados para medir estos fenómenos, tales como la preferencia de plaza condicionada y la autoadministración intravenosa[2,3]. Así, los cannabinoides producen frecuentemente respuestas aversivas en el modelo de la preferencia de plaza, principalmente cuando se utilizan altas dosis de estos compues-

tos[5,43,44]. Sin embargo, los agonistas cannabinoides también son capaces de producir efectos reforzantes mediante condiciones experimentales particulares, tales como el aumento del periodo de condicionamiento al cannabinoide y la evitación de las posibles consecuencias disfóricas de la primera exposición a la droga. En este sentido, una dosis de 1 mg/kg de THC produce preferencia de plaza en ratones si previamente se realiza una inyección de este cannabinoide en la jaula donde se encuentran los animales antes de comenzar las sesiones de condicionamiento[45]. Por otra parte, un gran número de estudios indican que el THC es incapaz de producir un comportamiento de autoadministración en ninguna de las especies animales en las que se ha investigado este proceso[19,46-50]. Tan sólo una reciente investigación llevada a cabo con monos ha demostrado que estos animales son capaces de autoadministrarse THC a dosis mucho menores a las que se habían utilizado en estudios anteriores y una vez que estos animales habían aprendido previamente a autoadministrarse cocaína[51]. Las propiedades farmacocinéticas del THC parecen ejercer un importante papel en la incapacidad de esta sustancia para generar un comportamiento de autoadministración, ya que otros agonistas cannabinoides sintéticos, tales como el WIN 55,212-2[52] o el CP 55,940[53], que poseen una vida media mucho más corta que el THC, inducen un comportamiento de autoadministración en roedores.

A pesar de estos resultados contradictorios en el animal de experimentación, los derivados del cannabis producen claros efectos reforzantes en humanos, lo que conlleva un comportamiento de búsqueda de estas drogas y finalmente su abuso. De acuerdo con esta observación, el THC es capaz de inducir efectos reforzantes en animales mediante las técnicas de autoadministración a una dosis similar a la contenida en una calada de un cigarrillo de marihuana (2-4 µg/kg). Sin embargo, en contraste con lo que ocurre en el caso de otras drogas de abuso, y como se ha indicado anteriormente, este comportamiento de autoadministración de THC siempre se ha observado en animales que han adquirido una conducta previa de autoadministración de otras drogas (cocaína). Los estudios animales también han revelado que los cannabinoides son capaces de activar el sistema dopaminérgico mesolímbico[54,55], lo que se ha relacionado directamente con sus propiedades reforzantes. En efecto, este sistema parece ser un sustrato neuronal común que media las propiedades motivacionales y reforzantes de todas las drogas de abuso[39].

BIBLIOGRAFÍA

1. Mechoulam R. Marihuana chemistry. Science 1970; 168: 1159-1166.
2. Maldonado R. Study of cannabinoid dependence in animals. Pharmacol Ther 2002; 95: 153-164.
3. Maldonado R. Opioid system involvement in cannabinoid tolerance and dependence. En: Maldonado R, ed. Molecular Biology of Drug Addiction. Totowa, NJ: Humana Press, 2002; 221-245.
4. Abood ME, Martin BR. Neurobiology of marijuana abuse. Trends Pharmacol Sci 1992; 13: 201-207.
5. Hutcheson DM, Tzavara ET, Smadja C, Valjent E, Roques BP, Hanoune J et al. Behavioural and biochemical evidence for signs of abstinence in mice chronically treated with delta-9-tetrahydrocannabinol. Br J Pharmacol 1998; 125: 1567-1577.
6. Martin BR, Dewey WL, Harris LS, Belckner JS. ^{3}H-delta-9-tetrahydrocannabinol tissue and subcellular distribution in the central nervous system and tissue distribution in peripheral organs of tolerant and nontolerant dogs. J Pharmacol Exp Ther 1976; 196: 128-144.
7. Magour S, Copher H, Fahndrich C. Is tolerance to delta-9-THC cellular or metabolic? the subcellular distribution of delta-9-tetrahydrocannabinol and its metabolites in brains of tolerant and non-tolerant rats. Psychopharmacology (Berl) 1977; 51: 141-145.
8. Rodriguez de Fonseca F, Gorriti MA, Fernandez-Ruiz JJ, Palomo T, Ramos JA. Downregulation of rat brain cannabinoid binding sites after chronic delta 9-tetrahydrocannabinol treatment. Pharmacol Biochem Behav 1994; 47: 33-40.
9. Fan F, Tao Q, Abood M, Martin BR. Cannabinoid receptor down-regulation with alteration of the inhibitory effect of CP-55,940 on adenylyl cyclase in the cerebellum of CP-55,940-tolerant mice. Brain Res 1996; 706: 13-20.
10. Rubino T, Vigano D, Massi P, Parolaro D. Changes in the cannabinoid receptor binding, G protein coupling, and cyclic AMP cascade in the CNS of rats tolerant to and dependent on the synthetic cannabinoid compound CP55,940. J Neurochem 2000; 75: 2080-2086.
11. Rubino T, Massi P, Patrini G, Venier I, Giagnoni G, Parolaro D. Chronic CP-55,940 alters cannabinoid receptors mRNA in the rat brain: an in situ hybridization study. Neuroreport 1994; 5: 2493-2496.
12. Romero J, Berrendero F, Manzanares J, Pérez A, Corchero J, Fuentes A et al. Time-course of the cannabinoid receptor down-regulation in the adult rat brain caused by repeated exposure to delta 9-tetrahydrocannabinol. Synapse 1998; 30: 298-308.
13. Sim LJ, Hampson RE, Deadwyler SA, Childers SR. Effects of chronic treatment with delta-9-tetrahydrocannabinol on cannabinoid-stimulated [^{35}S]GTPgS autoradigraphy in rat brain. J Neurosci 1996; 16: 8057-8066.
14. Rubino T, Vigiano D, Massi P, Spinello M, Zagato E, Giagnoni G et al. Chronic delta-9-tetrahydrocannabinol treatment increases cAMP levels and cAMP levels and cAMP-dependent protein kinase

activity in some rat brain regions. Neuropharmacology 2000; 39: 1331-1336.
15. Bass CE, Martin BR. Time course for the induction and maintenance of tolerance to Delta-9-tetrahydrocannabinol in mice. Drug Alcohol Depend 2000; 60: 113-119.
16. Rubino T, Patrini G, Massi P, Fuzio D, Vigano D, Giognoni G et al. Cannabinoid-precipitated withdrawal: a time-course study of the behavioral aspect and its correlation with cannabinoid receptors and G protein expression. J Pharmacol Exp Ther 1998; 285: 813-819.
17. McMillan DE, Harris LS, Frankenheim JM, Kennedy JS. L-D^9–tetrahydrocannabinol in pigeons: tolerance to the behavioral effects. Science 1970; 169: 501-503.
18. Dewey WL, Jenkins J, O'rourke T, Harris LS. The effects of chronic administration of trans-D^9–tetrahydrocannabinol on behavior and the cardiovascular system of dogs. Arch Int Pharmacodyn Ther 1972; 198: 118-131.
19. Harris RT, Waters W, Mcendon D. Evaluation of reinforcing capability of delta-9-tetrahydrocannabinol in rhesus monkeys. Psychopharmacologia 1974; 37: 23-29.
20. Aceto MD, Scates SM, Lowe JA, Martin BP. Spontaneous and precipitated withdrawal with a synthetic cannabinoid, WIN 55,212-2. Eur J Pharmacol 2001; 416: 75-81.
21. Kaymakcalan S, Ayhan IH, Tulunay FC. Naloxone-induced or postwithdrawal abstinence signs in D^9-tetrahydrocannabinol-tolerant rats. Psychopharmacology (Berl) 1977; 55: 243-249.
22. Deneau GA, Kaymakcalan S. Physiological and psychological dependence to synthetic delta-9-tetrahydrocanabinol THC in rhesus monkeys. Pharmacologist 1971; 13: 246.
23. Beardsley PM, Balster RL, Harris LS. Dependence on tetrahydrocannabinol in rhesus monkeys. J Pharmacol Exp Ther 1986; 239: 311-319.
24. Young AM, Katz JL, Woods JH. Behavioral effects of levonantradol and nantradol in the rhesus monkey. J Clin Pharmacol 1981; 21: 348S-360S.
25. Tsou K, Patrick SL, Walker JM. Physical withdrawal in rats tolerant to delta 9-tetrahydrocannabinol precipitated by a cannabinoid receptor antagonist. Eur J Pharmacol 1995; 280: R13-R15.
26. Ledent C, Valverde, O, Cossu G, Petitet F, Aubert JF, Beslot F et al. Unresponsiveness to cannabinoids and reduced addictive effects of opiates in CB1 receptor knockout mice. Science 1999; 283: 15-19.
27. Tzavara ET, Valjent E, Firmo C, Mas M, Beslot F, Defer N et al. Cannabinoid withdrawal is dependent upon PKA activation in the cerebelum. Eur J Neurosci 2000; 12: 1038-1046.
28. Lichtman AH, Wiley JL, Lavecchia KL, Neviaser ST, Arthur DB, Wilson DM et al. Effects of SR 141716A after acute or chronic cannabinoid administration in dogs. Eur J Pharmacol 1998; 357: 139-148.
29. Howlett AC, Fleming RM. Cannabinoid inhibition of adenylate cyclase. Pharmacology of the responses in neuroblastoma cell membranes. Mol Pharmacol 1984; 26: 532-538.
30. Navarro M, Chowen J, Carrera MRA, Del Arco I, Villanua MA, Martin Y et al. CB1 cannabinoid receptor antagonist-induced opiate withdrawal in morphine-dependent rats. Neuroreport 1998; 9: 3397-3402.
31. Litchtman AH, Sheikh HH, Loh SM, Martin BR. Opioid and cannabinoid modulation of precipitated withdrawal in delta-9-tetrahydrocanabinol and morphine-dependent mice. J Pharmacol Exp Ther 2001; 298: 1007-1014.
32. Hine B, Friedman E, Torrelio M, Gershon S. Tetrahydrocannabinol-attenuated abstinence and induced rotation in morphine-dependent rats: possible involvement of dopamine. Neuropharmacology 1975; 14: 607-610.
33. Bhargava HN. Effect of some cannabinoids on naloxone-precipitated abstinence in morphine-dependent mice. Psychopharmacology (Berl) 1976; 49: 267-270.
34. Valverde O, Noble F, Beslot F, Daugé V, Fournié-Zaluski MC, Roques BP. Delta 9-tetrahydrocannabinol releases and facilitates the effects of endogenous enkephalins: reduction in morphinewithdrawal syndrome wihout change in rewarding effect. Eur J Neurosci 2001; 13: 1816-1824.
35. Valverde O, Maldonado R, Valjent E, Zimmer AM, Zimmer A. Cannabinoid withdrawal syndrome is reduced in pre-proenkephalin knock-out mice. J Neurosci 2000; 15: 9284-9289.
36. Zimmer A, Valjent E, Koning M, Zimmer AM, Clarke S, Robledo P et al. Absence of delta-9-tetrahydrocannabinol dysphoric effects in dynorphin-deficient mice. J Neurosci 2001; 21: 2001.
37. Ghozland S, Mathews HWD, Simonin F, Filliol D, Kieffer BL, Maldonado R. Motivational effects of cannabinoids are mediated by mu- and kappa-opioid receptors. J Neurosci 2002; 22: 1146-1154.
38. Castañé A, Robledo P, Matifas A, Kieffer B, Maldonado R. Cannabinoid withdrawal syndrome is reduced in double mu and delta opioid receptor knockout mice. Eur J Neurosc 2003; 17: 155-159.
39. Koob GF. Drug addition: The Yin and Yang of hedonic homeostasis. Neuron 1996; 16: 893-896.
40. Rossetti ZL, Hmaidan Y, Gessa GL. Marked inhibition of mesolimbic dopamine release: common feature of ethanol, morphine, cocaine and amphetamine abstinence in rats. Eur J Pharmacol 1992; 221: 227-234.
41. Rodriguez de Fonseca F, Carrera MRA, Navarro M, Koob GF, Weiss F. Activation of corticotropin-releasing factor in the limbic system during cannabinoid withdrawal. Science 1997; 276: 2050-2054.
42. Diana M, Melis M, Muntoni AL, Gessa GL. Mesolimbic dopaminergic decline after cannabinoid withdrawal. Proc Natl Acad Sci USA 1998; 95: 10269-10273.
43. Parker LA, Gillies T. THC-induced place and taste aversion in Lewis and Sprague-Dawley rats. Behav Neurosci 1995; 109: 71-78.
44. Chaperon F, Soubrie P, Puech AJ, Thiebot MH. Involvement of central cannabinoid CB1 receptors in the establishment of place conditioning in rats. Psychopharmacology (Berl) 1998; 135: 324-332.

45. Valjent E, Maldonado R. A behavioural model to reveal place preference to delta 9-tetrahydrocannabinol in mice. Psychopharmacology (Berl) 2000; 147: 436-438.
46. Kaymakcalan S. Tolerance to and dependence on cannabis. Bull Narc 1973; 25: 39-47.
47. Corcoran ME, Amit Z. Reclutance of rats to drink hashish suspensions: free choice and forced consumption, and the effects of hypothalamic stimulation. Psycopharmacologia 1974; 352: 129-147.
48. Carney JM, Uwaydah MI, Balster RL. Evaluation of a suspension system for intravenous self-administration studies of water-insolubles compounds in the rhesus monkey. Pharmacol Biochem Behav 1977; 7: 357-364.
49. Gardner EL, Lowinson JH. Marijuana's interaction with brain reward system: update. Pharmacol Biochem Behav 1991; 40: 571-580.
50. Mansbach RS, Nicholson KL, Martin BR, Balster RL. Failure of D^9–tetrahydrocannabinol and CP 55,940 to maintain intravenous self-administration under a fixed-interval schedule in rhesus monkeys. Behav Pharmacol 1994; 5: 210-225.
51. Tanda G, Munzar P, Goldberg SR. Self-administration behavior is maintained by the psychoactive ingredient of marijuana in squirrel monkeys. Nat Neurosci 2000; 3: 1073-1074.
52. Martellota MC, Cossu G, Gessa GL, Fratta W. Self-administration of the cannabinoid receptor agonist WIN 55,212-2 in drug-naive mice. Neuroscience 1998; 85: 327-330.
53. Braida D, Pozzi M, Parolaro D, Sala M. Intracerebral self-administration of the cannabinoid receptor agonist CP 55,940 in the rat: interaction with the opioid system. Eur J Pharmacol 2001; 413: 227-234.
54. Chen J, Paredes W, Li J, Smith D, Lowinson J, Gardner EL. D9-tetrahydrocannabinol produces naloxone-blockable enhancement of presynaptic basal dopamine efflux in nucleus accumbens of conscious, freely-moving rats as measured by intracerebral microdialysis. Psychopharmacology (Berl) 1990; 102: 156-162.
55. Tanda G, Pontieri FE, Di Chiara G. Cannabinoid and heroin activation of mesolimbic dopamine transmission by a common μ_1 opioid receptor mechanism. Nature 1997; 276: 2048-2050.

DISCUSIÓN

M. CASAS: En el ámbito clínico se discute mucho si existe realmente dependencia o no, o si esa dependencia que tú nos has demostrado en estos momentos tiene relevancia clínica. Lo que preocupa más son unas hipótesis de trabajo que se formularon hace ya muchos años sobre si el cannabis facilita la entrada hacia otros tóxicos. Recientemente, en dos importantes artículos, uno de *JAMA* y otro de *American Journal of Epidemiology*, se habla de que el consumo de cannabis facilita la entrada hacia otros tóxicos. ¿Se podría inferir a partir de tus estudios algo así? Aparte de que el consumo de cannabis repetido psicotiza, las dos cosas que realmente daban tanto miedo, pues resulta que ahora ya nos dicen que sí que son verdad.

R. MALDONADO: La hipótesis *gateway*, la teoría de que el consumo de cannabis pueda facilitar el abuso de otras drogas de mayor repercusión, es un tema tremendamente polémico, y se pueden dar argumentos contundentes a favor y en contra. En cuanto a datos experimentales, existen estudios que muestran cosas claras, pero no de forma completamente concluyente. La administración de tetrahidrocannabinol (THC) parece que es capaz de sensibilizar los efectos locomotores de la morfina. Esto se inclinaría a favor de la teoría de la compuerta. Sin embargo, un estudio publicado en *European Journal of Neuroscience* (2001) demuestra que realizando un tratamiento crónico con THC durante 3 semanas, con una semana de lavado, y haciendo después un condicionamiento espacial para ver si existe refuerzo a morfina, no se produce aumento de los efectos reforzantes inducidos por la morfina. Creo que en este estudio se demuestra claramente que en los modelos experimentales que ahora mismo son más relevantes, cuando realizamos una administración crónica de THC no somos capaces de revelar una facilitación de los efectos reforzantes de los opioides. Por tanto, con los datos obtenidos en el animal de experimentación que tenemos sobre la mesa, yo diría que no existe ningún estudio que claramente demuestre la teoría de la compuerta. Es mi punto de vista, aunque es un tema polémico que podría dar mucho que hablar. Segundo, el cannabis, ¿produce o no un fenómeno psicótico? Yo creo que aquí existen tres teorías, y que una vez más se podrían dar argumentos muy contundentes para defender cualquiera de las tres. Primera teoría, el cannabis está produciendo una serie de cambios en el sistema dopaminérgico que facilitan la aparición del trastorno psicótico. Segunda, el enfermo psicótico lo único que está haciendo es una automedicación de su trastorno psicótico. Y tercera, que también tiene muchos puntos a favor y que evidentemente es una teoría polémica, estamos ante individuos que partiendo de unos trastornos de personalidad comunes para padecer ambos procesos, trastornos psicóticos y

abuso de drogas, caen finalmente y de una manera gradual en ambos procesos. Pienso que actualmente existen datos y múltiples argumentos para defender la primera, la segunda o la tercera. Personalmente no me atrevería a poner la mano en el fuego por ninguna de las tres.

E. AMBROSIO: Nosotros, cuando hemos llevado a cabo autoadministración de morfina en animales adultos previamente tratados con cannabinoides durante una semana, tampoco hemos encontrado efectos reforzantes en la morfina. Parece que quizá el consumo previo de cannabinoides en animales adultos de alguna manera no tiene efectos sobre las propiedades reforzantes de los opiáceos.

R. MORATALLA: Te quería preguntar si los cannabinoides dan paso al consumo de otras drogas mayores como los opiáceos. Me llama poderosamente la atención los dos ejemplos que habéis utilizado. Están realizados con morfina y la morfina no internaliza los receptores. Todos sabemos que el receptor cannabinoide CB-1 y los receptores opioides están acoplados a proteínas G. Una de las características que tienen los receptores acoplados a estas proteínas es la posibilidad de dimerización y heterodimerización entre distintos receptores, y esto modifica su respuesta. Tanto los receptores CB-1 como los mu, o los delta, están en las mismas neuronas en el estriado. Además, existe una interacción entre estos receptores, tú mismo has demostrado que cuando quitas el receptor mu no se produce condicionamiento de plaza con el cannabinoide, lo que sugiere, además de la necesidad de la interacción entre estos dos receptores para la expresión de algunas acciones de los cannabinoides, una activación directa o indirecta de los receptores mu por ligandos cannabinoides. Todos estos datos conjugados convenientemente podrían sugerir que efectivamente el consumo de los cannabinoides produce cambios en las rutas de señalización intracelular en las neuronas que contienen receptores mu, y que estos cambios preparan al organismo para una dependencia a opiáceos.

R. MALDONADO: En el tema de la dimerización, existen estudios que demuestran que el receptor mu y el receptor CB-1 dimerizan, y otros estudios que también demuestran que están en las mismas neuronas, en estriado y en el núcleo *accumbens*, o sea, que teóricamente es posible. Ahora, ¿cuál es el mecanismo de la interacción por el cual cuando quitamos el receptor opioide disminuimos la respuesta a los cannabinoides? Yo creo que aquí existen muchas hipótesis, y como en otros temas, creo que ahora mismo no podemos decir claramente cuál es la causa de esta interacción. Una hipótesis es, evidentemente, dimerización del receptor, otra hipótesis es la liberación de péptidos opioides endógenos. Al dar cannabinoide en agudo se produce una liberación de encefalinas en el núcleo *accumbens,* así como una liberación de dinorfinas en la médula espinal. Por otra parte, puede haber una interacción a nivel intracelular al compartir ambos grupos de receptores sistemas de señalización comunes. Yo creo que éstas serían las tres hipótesis básicas, ahora bien, que los dos actúen por sistemas comunes no quiere decir que haya una predisposición. Es como una persona a la que hayas tratado con morfina para inducir un efecto analgésico y que digas que por eso vas a predisponerla a consumir un cannabinoide; no es cierto. No creo que cualquiera de estas tres hipótesis pueda dar argumentos a favor o en contra de la teoría de la compuerta.

R. MORATALLA: El hecho de que científicamente no se haya descrito el mecanismo exacto de la interacción entre estos dos receptores, ni se haya comprobado en modelos animales la posible facilitación del consumo de opioides tras la exposición a cannabinoides, no quiere decir que no sea así. De hecho, los estudios epidemiológicos evidencian esta facilitación.

R. MALDONADO: Sobre estudios epidemiológicos no digo nada. Lo que digo es que en estudios de investigación básica no existen argumentos, y en eso estoy totalmente de acuerdo con lo que dice Emilio Ambrosio, hoy día no hay argumentos para afirmar claramente que existe una facilitación del refuerzo opioide tras la administración de cannabinoides.

R. MORATALLA: Con la morfina, por ejemplo, no se ha probado el sufentanilo.

R. MALDONADO: Bueno, pero yo no he visto a nadie inyectarse sufentanilo. O sea, si hablas de morfina y heroína, por ejemplo, ninguno de los dos produce internalización. Si quitas el receptor mu desaparecen los efectos de la morfina, y, por tanto, desaparecen todos los efectos de la heroína, ya sea con el ratón *knockout* del exón 1 o del exón 2, con lo cual un mismo receptor participa en todas las propiedades farmacológicas de morfina y de heroína. Si los dos opioides actúan sobre el mismo receptor, los dos están exentos de producir una internalización de receptores y la consecuente *down regulation* de éste. No creo que exista una razón para pensar que los efectos de la heroína fueran diferentes a los de la morfina.

R. MORATALLA: De cualquier manera estos receptores (mu y CB-1), no solamente se localizan en las mismas células, además, están ultraestructuralmente muy cerca. Esto se ha observado en estudios de microscopia electrónica.

R. MALDONADO: Pero el hecho de que actúen sobre el mismo receptor, ¿favorece o perjudica la hipótesis de la compuerta? Yo no lo veo.

R. MORATALLA: Sí que la favorece, porque yo pienso que producen los mismos cambios en el sistema de segundos mensajeros. Entonces al activar un receptor, si dimeriza con el otro, ¿produciría los mismos cambios *down the stream* de la señalización intracelular?

R. MALDONADO: Mira entonces, por ejemplo, la nicotina. Acaba de aparecer un estudio en el cual se demuestra que la nicotina produce también una *up regulation* en la vía de la ciclasa. Entonces cualquier persona que fume nicotina también va a tener una facilitación para poder consumir heroína. Yo no lo creo.

R. MORATALLA: Bueno, en ese caso habría que ver que estos receptores no sólo se colocalizaran en las mismas células sino que estuvieran ultraestructuralmente a una distancia de menos de 100 amstrongs y, además, que la activación de un receptor modificara las funciones del otro, como en el caso que nos ocupa del CB-1 y mu.

R. MALDONADO: Respecto a la modificación intracelular, la nicotina, en crónico, también produce una *up regulation* de la vía de la ciclasa, entonces teóricamente podría también producir una facilitación para el consumo de heroína. Yo creo que para que un resultado básico apoye realmente la teoría de la compuerta deberíamos basarnos en un estudio como el que ha citado Emilio Ambrosio, es decir, administramos en crónico THC, llevamos a cabo una autoadministración de morfina y nuestros animales aumentan la autoadministración de morfina, tienen un valor de *progressive ratio* en autoadministración que aumenta. Esto sí que es convincente, o hacemos un *conditioned place preference* y resulta que antes el refuerzo se producía con 5 mg/kg y ahora con 1 mg/kg ya aparece. Esto sí me convence, pero no le veo relación con que tengan mecanismos de acción paralelos y que produzcan las mismas modificaciones intracelulares.

M. MIQUEL: Enlazando con esta discusión, yo creo que una cuestión importante en la epidemiología, donde sí que existe esa relación de la compuerta, es el consumo de nicotina junto con el de cannabis. Es decir, ¿cuántos consumidores de cannabis se toman el cannabis en un té o comiéndolo? Se lo toman fumando. Es decir, ¿existen de verdad estudios que separen el posible efecto facilitador de la nicotina en las neuroadaptaciones que produce el cannabis?

R. MALDONADO: Algo hay. Nosotros, por ejemplo, hicimos la comparativa de los diferentes efectos farmacológicos inducidos por el THC en presencia o en ausencia de nicotina, y resulta que en presencia de nicotina tienes una potencialización de todas las respuestas farmacológicas del THC. Tienes una potencialización del refuerzo y el síndrome de abstinencia es mayor. O sea, que existe una clara facilitación, que esto interfiera en otras drogas de abuso, de esto sí que no tengo ni idea, pero en los efectos reforzantes y en el síndrome de abstinencia producido por THC, cuando existe presencia de nicotina, aumentan los dos.

M. MIQUEL: O sea, que podría ser que lo que están viendo los epidemiólogos es el efecto de la facilitación de la nicotina y no del cannabis. Porque hay una cosa que a mí me ha chocado, y es que es muy difícil conseguir que un animal se autoadministre benzodiacepinas. Pero cuando tú facilitas el sistema con alcohol, o, por ejemplo, creo que hay un estudio con cocaína, sí que consigues el consumo de benzodiacepina. Lo curioso es que cuando tú facilitas el sistema, la entrada al consumo sí que es mucho más evidente. Entonces, quizá estamos en una situación parecida.

R. MALDONADO: Por ejemplo, con benzodiacepinas, cuando realizas un estudio de *drug discrimination,* resulta que el THC produce un estímulo discriminativo que es tremendamente selectivo, y una de las poquísimas sustancias que muestra discriminación cruzada con el THC es precisamente el diazepam. Según mi conocimiento es la que más la produce. Hay un dato también con el MDMA, pero el efecto era mínimo, la que realmente tiene una discriminación cruzada relativamente aceptable resulta que es el diazepam.

G. GOICOECHEA: Yo no he observado en el modelo del síndrome de abstinencia con ratón la aparición de saltos. Pueden ser dos cosas: que no haya cambios o que sí. Si no hay cambios, ¿puede ser que el síndrome de abstinencia de cannabis en humanos no aparezca porque realmente tiene otro mecanismo de acción? Y otra pregunta es si lo habéis comprobado con otro tipo de cannabinoides que no sea el THC, como cannabinoides sintéticos.

R. MALDONADO: Respecto al salto, la repuesta es clara: no hay saltos. Puedes evaluar las condiciones experimentales que sea, pero en ninguna de éstas he visto a un ratón saltar durante la

abstinencia a cannabinoides. Supongo que vosotros no visteis tampoco a ninguna rata saltar con el THC. Simplemente porque las manifestaciones de la abstinencia cannabinoide son muy diferentes a la de las sustancias opioides. Por eso señalé el tema de la hiperlocomoción en uno e hipolocomoción en otro. Yo creo que eso es fundamental, porque en un síndrome de abstinencia opioide tienes una hiperlocomoción, en la abstinencia cannabinoide tienes lo contrario. Evidentemente, los circuitos cerebrales implicados son muy diferentes, estamos hablando para la abstinencia cannabinoide de una estructura totalmente marginal para lo que hasta ahora se decía que era la dependencia a drogas de abuso, el cerebelo. En el caso de los opioides ya ha comentado J. Pineda la importancia del *locus coeruleus* y de los mecanismos monoaminérgicos; son dos mecanismos completamente diferentes y unas manifestaciones muy distintas. Por ejemplo, las manifestaciones vegetativas, tan llamativas en el cuadro de la abstinencia opioide en el roedor, no aparecen en el caso de los cannabinoides. Con respecto a la extrapolación humana, yo creo que lo fundamental es el tema de las dosis. Estamos hablando de dosis que simplemente no son comparables, 20 µg/kg en el humano no es comparable con 20 mg/kg en el animal de experimentación. Partiendo de esta base, esto es un modelo farmacológico tremendamente útil para ver cómo se adapta el organismo a esta exposición masiva de THC, naturalmente muy útil para farmacología, pero no lo extrapolemos a lo humano. Y con respecto a la utilización de otros cannabinoides, nosotros no lo hemos hecho, pero sí, efectivamente, tras la administración crónica de HU210 se puede precipitar un síndrome de abstinencia muy llamativo; con el CP55,940 también se observa un síndrome de abstinencia muy claro, otros lo han observado con el WIN-55,212-2. Todos los cannabinoides son capaces de producir un síndrome de abstinencia, incluso se observa con agonistas cannabinoides de vida media-corta un síndrome de abstinencia espontáneo suave. Con lo cual la ausencia de síndrome de abstinencia espontáneo al parecer es una vez más consecuencia de la farmacocinética del THC.

E. PORTILLO: Has hablado en tu introducción sobre la posible existencia de otros tipos de receptores cannabinoides aparte del CB-1 y el CB-2, ¿puedes comentarme qué datos hay sobre esto?

R. MALDONADO: Thomas Freund publicó en el *European Journal of Neuroscience* que el *knockout* sin receptor CB-1 presenta un incremento de la ansiedad. Por otra parte, se describen efectos ansiolíticos tras la administración de SR-141716A, el antagonista CB-1, en animales *wild-type*. Estos efectos ansiolíticos también aparecen tras la administración de dicho fármaco en el animal CB-1 *knockout*. Es decir, el SR-141716A es capaz de producir una respuesta emocional supuestamente ligada a un receptor central diferente del receptor CB-1, y que evidentemente tampoco tiene nada que ver con el receptor CB-2 periférico.

E. PORTILLO: Pero puede ser otro tipo de receptor que no sea CB-1.

R. MALDONADO: Evidentemente puede ser otro tipo, pero hay muchos otros datos. Por ejemplo, la respuesta de la anandamida. Hay veces que la anandamida actúa a través de un receptor central diferente del receptor CB-1, y que por supuesto tampoco es el receptor CB-2. Creo que los primeros datos vienen de la anandamida, los datos de Thomas Freund ciertamente son muy bonitos pero son controvertidos. Existe una gran cantidad de literatura que demuestra que hay algún otro receptor que media efectos centrales de los cannabinoides.

C. FAURA: Tú utilizas estas dosis masivas de los cannabinoides, además, por vía intraperitoneal, ¿qué problemas se dan en el tratamiento crónico? ¿Tiene muchos efectos adversos, mucha toxicidad, mucha mortalidad?

R. MALDONADO: Ten en cuenta que los cannabinoides son sustancias muy seguras. La población de receptores CB-1 en el tronco encefálico es mínima, o sea, que los problemas de depresión respiratoria, por ejemplo, que tienes con los opioides en ningún momento los vas a tener con los cannabinoides. Por consiguiente, no aparecen problemas de toxicidad. No hay ningún animal que se muera con estas dosis de cannabinoides, lo que sí se ven son efectos somáticos muy llamativos, sobre todo con las primeras administraciones. Sin embargo, aparece una tolerancia relativamente rápida, como es el caso de la *popcorn behaviour* o "comportamiento como palomitas de maíz", es decir, la primera vez que administras THC se quedan todos los ratones en estado de inmovilidad, y en el momento en que reciben cualquier estímulo auditivo o táctil se ponen a saltar como si fueran palomitas de maíz. Esto lo observas tras la primera administración, pero no tras la segunda, al igual que una hipotermia, muy marcada, 4 ºC de caída de temperatura corporal. Se producen unos efectos somáticos muy importantes con las primeras administraciones, que natural-

mente tienen que ser muy aversivos para el animal, pero no hay toxicidad.

C. FAURA: Has presentado los datos de modificaciones receptoriales y bioquímicas, que supongo serán consecuencia también de esas dosis tan masivas.

R. MALDONADO: Sí, son muchos los grupos que han trabajado en esos temas, y por lo general suelen ser administraciones de THC entre 5 y 20 mg/kg.

J. PINEDA: En relación con el sustrato anatómico del síndrome de abstinencia de cannabinoides, has mencionado que existen datos que apoyan sobre todo la implicación del cerebelo. Es fácil de entender, por ejemplo, para algunos síntomas como la ataxia, pero no para todos. ¿Existen datos directos en el cerebelo? Me refiero a electrofisiológicos, registrando algún tipo de neurona, donde se vea si existe algún tipo de alteración después del tratamiento crónico. ¿Existen datos directos que demuestran la ausencia de implicación de otros núcleos, como el propio *locus coeruleus*?

R. MALDONADO: Con respecto al tema de los estudios electrofisiológicos, y según mi conocimiento, no existen estudios en el cerebelo. Los datos más llamativos son los que demuestran que la actividad adenilciclasa está aumentada y que se correlaciona el incremento de dicha actividad ciclasa y de la actividad proteína cinasa con la aparición del síndrome de abstinencia cannabinoide. También existen datos que demuestran que cuando se administra Rp-8-bromo-cAMPS, un inhibidor del AMPc, se inhibe la sintomatología de la abstinencia cannabinoide, y cuando se administra el activador, Sp-8-bromo-cAMPS, produce una sintomatología que es relativamente similar a la que aparece durante dicha abstinencia. O sea, estos datos farmacológicos son, desde mi punto de vista, bastante relevantes para mostrar que existe una relación entre los cambios producidos en el cerebelo y la sintomatología de la abstinencia cannabinoide. Comentar que hemos obtenido datos con la técnica de FURA-2 en colaboración con el grupo de Eduardo Soriano, donde se demuestra que en el momento en que se administra SR-141716A sobre un corte de cerebelo se producen cambios en la incorporación de calcio que concuerdan bien con las manifestaciones de la abstinencia cannabinoide. Según mis conocimientos, éstos son los únicos datos que existen sobre cerebelo con respecto a su participación en la abstinencia cannabinoide.

A. CASTAÑÉ: Nosotros hemos realizado la administración del antagonista SR-141716A en cerebelo, hipocampo, estriado y también a nivel intracerebroventricular, y hemos observado que cuando administramos SR en cerebelo tenemos un claro síndrome de abstinencia y cuando lo administramos en el estriado no obtenemos ninguna respuesta. Cuando administramos por vía intracerebroventricular también obtenemos una respuesta, aunque de menor intensidad que cuando se administra directamente en el cerebelo. En el caso del hipocampo también hemos observado un ligero síndrome de abstinencia. Cuando realizamos un análisis de un *global withdrawal score* tenemos un efecto significativo en estas estructuras.

J. PINEDA: ¿Habéis descartado, por ejemplo, inyectar en el *locus coeruleus*?

R. MALDONADO: Hemos presentado estudios realizados en el ratón donde somos incapaces de practicar una administración local de SR-141716A en el *locus coeruleus*.

A. CASTAÑÉ: Creo que sería interesante plantearse si otras proteínas cinasas como, por ejemplo, la proteína cinasa 2, que se ha demostrado que tiene un papel importante en la dependencia a opiáceos en el hipocampo, podrían también ejercer un papel importante para la dependencia de cannabinoides.

R. MALDONADO: Sí, naturalmente, está claro que hay otras vías. Ésta es la única vía que, por lo pronto, hemos estudiado, pero este mecanismo no puede explicarlo todo. No creo que una implicación exclusiva de la ciclasa en el cerebelo sea capaz de explicar todo el cuadro de abstinencia cannabinoide. Cuando inhibes la actividad ciclasa disminuyes la intensidad, pero no suprimes completamente la abstinencia, y cuando activas la ciclasa tienes ciertas manifestaciones, pero no tienes toda la sintomatología de la abstinencia cannabinoide.

S. ABANADES: En primer lugar, ¿cuál es la finalidad práctica de la obtención de un modelo de dependencia a cannabinoides, cuando en humanos, como has explicado, no existe tal dependencia, al menos clínicamente significativa? En segundo lugar ¿cuál sería la posible aplicación clínica futura del uso de antagonistas-agonistas o de cannabinoides naturales?

R. MALDONADO: En cuanto a la relevancia del modelo de dependencia física, en humanos hay un cuadro de alteración motivacional, pero no se puede decir que haya una dependencia física con todas sus manifestaciones, ahí estamos todos de acuerdo. ¿Qué interés tiene esto? El interés reside en conocer cómo se adapta el organismo a una exposición crónica de cannabinoides. Ésta es la idea básica con la que he-

mos partido para llevar a cabo estos estudios. Para esta adaptación evidentemente requerimos un procedimiento farmacológico alejado de la situación clínica, pero esto nos aporta toda una serie de datos que pueden resultar de gran interés. Conocer, por ejemplo, que dando estas dosis masivas resulta que las estructuras cerebrales que se adaptan son completamente diferentes a las que se adaptan en el caso de los opioides. Yo creo que esto es un dato relevante. ¿Y cuál es la extrapolación clínica? Ninguna, de acuerdo, pero tenemos la evidencia de que aún con una exposición masiva las adaptaciones son diferentes a las adaptaciones frente a los opioides. Con respecto a las aplicaciones terapéuticas ya sabéis que en España ya está permitida la utilización clínica de un cannabinoide como antiemético en el caso de la quimioterapia cancerosa, ésta es la primera indicación en nuestro país. En EE.UU. hay dos indicaciones aceptadas. La primera como antiemético, la segunda como fármaco orexígeno, en el caso de caquexia, ya sea producida por sida o por cáncer. Se pretende utilizar como analgésico en determinadas condiciones, esta tercera indicación no está completamente aceptada. Otras posibilidades futuras incluirían el tratamiento de trastornos motores. Existe un ensayo clínico en fase III que se está realizando ahora mismo en el Reino Unido en el caso de la esclerosis múltiple con resultados, al parecer, bastante prometedores. Así mismo, existe una gran cantidad de datos, como los aportados por el grupo de José Antonio Ramos y Javier Fernández-Ruiz, en cuanto a la posibilidad de tratamiento para otros trastornos motores, como la enfermedad de Parkinson y la enfermedad de Huntington. No olvidemos también los efectos a nivel periférico. En el caso del glaucoma se ha demostrado que disminuye la presión intraocular, aunque posiblemente se produzca una taquifilaxia a este efecto, aún no lo sabemos, pero es una potencial indicación terapéutica. También podemos citar otras indicaciones menores en las cuales yo ya creo menos, como por ejemplo el tratamiento del asma, por su efecto broncodilatador. Se habla también de un posible potencial terapéutico debido a su efecto vasodilatador, pero, ya digo, son indicaciones que yo pondría con un gran signo de interrogación. Los cannabinoides también tienen efectos antiinflamatorios muy claros de los que se podrían derivar aplicaciones terapéuticas.

Particularidades en los mecanismos de adicción al etanol

Mecanismos neuroenzimáticos de acción del alcohol: papel del acetaldehído

M. Miquel

Área de Psicobiología, Universitat Jaume I, Castelló de la Plana.

Introducción a la hipótesis del acetaldehído

La hipótesis del acetaldehído es ya antigua[1,2]. Dicha hipótesis plantea que algunos de los efectos del alcohol son debidos al acetaldehído, su primer metabolito oxidativo. Esta hipótesis aparece como una alternativa explicativa a los problemas surgidos en la descripción de los mecanismos de acción del etanol. Especialmente, aquellos que serían la causa de los cambios observados en la conducta tras el consumo de alcohol.

El etanol, como otras drogas de abuso, a través de sus acciones en diversos sistemas de neurotransmisión cerebral, produce efectos fisiológicos y afecta a diversos patrones de conducta[3,4]. No obstante, debido a que su molécula carece de un carbono asimétrico la interacción con estos sistemas cerebrales no es estereoselectiva[5]. Esta característica molecular diferencia al etanol de otras drogas de abuso, cuyo mecanismo de acción queda bien descrito por interacciones ligando-receptor. La falta de estereoselectividad ha complicado la descripción de su mecanismo de acción en las neuronas.

El acetaldehído, si bien es también una molécula estructuralmente simple, es mucho más reactiva que su precursor. Se ha demostrado que debido a la reacción del grupo carbonilo de la molécula de acetaldehído con los grupos nucleofílicos de los aminoácidos forma macromoléculas con éstos, pudiendo modificar así la fisiología celular y producir múltiples efectos en el sistema nervioso central (SNC)[6].

En la exposición que sigue a continuación me propongo analizar la viabilidad del acetaldehído como una sustancia neuroactiva, explicar los mecanismos enzimáticos del alcohol y su existencia en el SNC y, finalmente, exponer cuáles son las pruebas que actualmente avalan la hipótesis del acetaldehído.

El acetaldehído como sustancia neuroactiva

Efectos sobre la fisiología neuronal

El acetaldehído afecta a la fisiología de diversos sistemas cerebrales e induce en ellos cambios moleculares[7-18]. Hace más de dos décadas que se demostró la capacidad del acetaldehído para promover la liberación de noradrenalina en terminales del sistema nervioso periférico[7] y en el SNC[8,9]. Resultados similares a los referidos para la noradrenalina se han constatado para la serotonina y la dopamina[10]. Respecto a esta última, se observó que el acetaldehído mimetizaba, aunque con mayor velocidad, el incremento de ácido 3,4-dihidroxifenilacético inducido por etanol en el estriado[11]. El acetaldehído es, así mismo, capaz de promover la liberación de β-endorfinas en cultivos celulares hipotalámicos[12-14].

La regulación del eje hipotalámico-hipofisario-corticoadrenal puede ser también alterada por el acetaldehído. En un grupo de experimentos en los que se trataba a ratas con alcohol y cianamida sódica, un potente inhibidor de la enzima aldehído deshidrogenasa hepática (ALDH), se observaron fuertes incrementos de la corticosterona y elevaciones de los niveles de ácido ribonucleico de la hormona CRF y del neuropétido propiomelanocortina en el núcleo paraventricular del hipotálamo[15]. Así mismo, con este tratamiento, que eleva los niveles de acetaldehído, se afectó la expresión del factor genético de trascripción c-fos en el hipotálamo paraventricular[16].

Otro dato muy interesante es el relacionado con los efectos del acetaldehído sobre el proceso de la potenciación a largo plazo del giro dentado. El acetaldehído, administrado en los ventrículos laterales, reprodujo con diez veces más potencia el efecto inhibidor del etanol sobre este proceso de neuroplasticidad[17]. El mismo efecto fue observado inyectando a las ratas alcohol y un inhibidor de la ALDH[18].

Efectos del acetaldehído en la conducta

La acumulación periférica de acetaldehído ha sido tradicionalmente descrita como aversiva[1,19,20]. Esta cualidad aversiva ha sido la base de las terapias antialcohólicas con distintos inhibidores de la ALDH[1,19,20]. No obstante, ya desde el inicio de estas prácticas terapéuticas, algunos informes indicaban que no sólo los sujetos así tratados no dejaban de beber alcohol, sino que cuando ingerían dosis moderadas de la droga, sentían mayor euforia y mayores efectos calificados de placenteros[1,21]. Así mismo, se observó que la exacerbación del ánimo y la locuacidad de la que estos sujetos informaban correlacionaba positivamente con los niveles de acetaldehído en sangre[1,21].

En animales de laboratorio el acetaldehído actúa, al igual que el etanol, como una sustancia reforzante que afecta a la conducta motivada y permite establecer asociaciones condicionadas. Hace más de tres décadas se demostró que la administración de infusiones de acetaldehído aumentaba el consumo posterior de etanol en ratas[22]. Desde la década de 1980, sabemos también que el acetaldehído es autoadministrado por animales de laboratorio en el ventrículo o intravenosamente mediante una respuesta operante[22-24].

Mucho más recientemente se ha observado que la autoadministración cerebral de acetaldehído pudiera estar regionalizada en la zona posterior del área tegmental ventral. Desplazamientos rostrales de la cánula no permiten ver este efecto[25]. Un estudio previo del mismo grupo de investigación había descrito la misma localización para la autoadministración de alcohol en ratas Wistar[26].

El acetaldehído puede considerarse también como un potente estímulo incondicionado capaz de generar asociaciones pavlovianas. Estudios de la década de 1980 demostraron que su administración intracerebroventricular producía preferencia de lugar en ratas, fenómeno muy difícil de observar con la administración de alcohol[27]. En la misma línea, una investigación reciente indica que el acetaldehído puede inducir, a diferencia del etanol, una preferencia por el lugar en el que fue administrado en presencia de una señal olfatoria[28].

La estimulación locomotora típica de todas las drogas adictivas también ha sido observada con infusiones intracerebroventriculares de acetaldehído y de etanol[29,30]. El efecto activador del acetaldehído se produce, tanto después de una infusión aguda, como tras un tratamiento crónico con esta sustancia.

En resumen, tanto los estudios fisiológicos como de conducta permiten concluir que el acetaldehído es una sustancia neuroactiva cuyos efectos sobre los patrones de conducta lo asemejan al etanol y a las demás drogas de abuso.

Una de las cuestiones clave para la viabilidad de la hipótesis del acetaldehído es de dónde procede el acetaldehído que se encuentra presente en el SNC. Analicemos, por tanto, el mecanismo metabólico del etanol y los sistemas orgánicos en los que éste tiene lugar.

Metabolismo oxidativo del alcohol

Oxidación hepática del alcohol

El etanol se metaboliza fundamentalmente en acetaldehído por oxidación enzimática. En las situaciones de consumo oral, este proceso acontece principalmente en el hígado y se halla fundamentalmente mediado por la enzima alcohol deshidrogenasa (ADH) (alcohol: NAD-oxidorreductasa, EC 1.1.1.1)[31]. Otros dos sistemas enzimáticos hepáticos posibilitan la misma reacción y adquieren relevancia ante niveles muy elevados de alcohol o alguna deficiencia en el sistema de la ADH. Estos dos sistemas son el llamado sistema microsomal oxidativo del etanol (MEOS) y el mediado por el complejo catalasa-peróxido de hidrógeno (compuesto I)[31]. En un segundo paso el acetaldehído producido es metabolizado a acetato principalmente por la ALDH (EC 1.2.1.3). También existen indicios claros de la existencia de un metabolismo oxidativo extrahepático del etanol en diferentes órganos corporales, tales como el corazón, el estómago[32] y los riñones[33].

El acetaldehído periféricamente formado difícilmente puede alcanzar el SNC. En primer lugar, porque en el hígado la ALDH2 mitocondrial es una enzima extremadamente eficaz que reduce al mínimo la posibilidad de que exista acetaldehído circulante[34]. En segundo lugar, porque en la barrera hematoencefálica existe una importante vía de degradación de acetaldehído, mediada por una ALDH con una baja Km, que la hace muy eficiente a concentraciones muy pequeñas de acetaldehído[34]. Para que el acetaldehído, por tanto, pueda reaccionar con el sustrato neuronal debiera producirse directamente en el SNC.

Oxidación del alcohol en el sistema nervioso central

La posibilidad de un metabolismo oxidativo del etanol en el cerebro fue cuestionada durante muchos años, dada la dificultad de evaluar los nive-

les de acetaldehído en este tejido[35]. Hay que tener en cuenta que las cantidades de acetaldehído producidas durante un consumo normal de alcohol son tan pequeñas que difícilmente pueden ser medidas mediante los métodos cromatográficos de que disponemos hasta ahora. Por ejemplo, la administración gástrica a ratas de una dosis de etanol tan elevada como 4,5 g/kg produce 30 min después unas concentraciones en el líquido intersticial de la zona del caudado y del hipocampo de 96 mM de etanol y 10 µM de acetaldehído. A partir de estos parámetros se ha estimado que esto correspondería a 5 nmol/g si se realizara la detección en un homogeneizado de cerebro[36].

No obstante, actualmente tenemos numerosas pruebas de la oxidación enzimática de alcohol en el tejido neuronal[37-40]. En el caso del cerebro el mapa enzimático es menos conocido que en el hígado, y parece ser un tanto diferente. De hecho, la importancia relativa de los sistemas enzimáticos parece variar notablemente en el cerebro respecto al hígado. Así, hasta el momento, no se ha podido demostrar la funcionalidad de la isoforma I de ADH en el cerebro[41]. En el cerebro humano, y también en el de roedor, la isoforma más abundante de esta enzima es la clase III[42]. Sin embargo, esta isoforma tiene baja afinidad por el etanol y difícilmente es activada por éste; incluso en intoxicaciones etílicas graves no se alcanzan las concentraciones necesarias para que su contribución sea relevante[40].

También se ha descrito la presencia de citocromos pertenecientes al complejo enzimático MEOS, y, en concreto, se ha demostrado que el CYP450 cerebral es inducido por el etanol, como ocurre en el hígado[41,43]. Esta inducción ha sido asociada con la aceleración de la lipidoperoxidación y con los efectos tóxicos del etanol sobre las membranas neurales[44]. No obstante, en la actualidad no existe ningún dato concluyente sobre la relevancia funcional de la oxidación citocromal del etanol.

Finalmente, un gran número de pruebas avalan la presencia y viabilidad funcional del sistema catalasa-peróxido de hidrógeno en el SNC[1,2,45]. Numerosas investigaciones han demostrado la formación del acetaldehído tras la incubación del tejido neuronal con etanol[13,37,39,40,45]. Así mismo, existen pruebas de que esta formación de acetaldehído en el cerebro de rata se produce en un proceso oxidativo mediado por el sistema enzimático catalasa-peróxido de hidrógeno. Por ejemplo, la inhibición de la enzima con carbamida de calcio o con 3-amino-1,2,4-triazol puede prevenirse por la administración previa de etanol a homogeneizados cerebrales[37,45]. Esta protección de la inhibición de la catalasa implica que en el tejido neuronal el alcohol es capaz de unirse a la enzima e impedir la acción de los inhibidores irreversibles, y, por tanto, apoya la capacidad del tejido neuronal para oxidar etanol. Asimismo, la administración *in vivo* de AT o cianamida a roedores bloquea de manera dependiente de la dosis la producción de acetaldehído después de que los homogeneizados cerebrales de estos animales se incuben con etanol[39].

Un dato adicional procede de la comparación entre ratas recién nacidas y ratas adultas respecto a su capacidad de producción de acetaldehído. Dicha producción es más elevada en los homogeneizados cerebrales de las crías, los cuales demuestran tener más actividad catalasémica[46]. Igualmente, la producción de acetaldehído en cerebros de ratones acatalasémicos de la cepa C3HA es significativamente menor que la que tienen los cerebros procedentes de ratones con niveles control de catalasa[6]. Finalmente, es importante destacar que la acumulación de acetaldehído resulta más prominente en aquellas estructuras cerebrales donde se encuentra más cantidad de catalasa[47].

Efectos de las manipulaciones del sistema enzimático de la catalasa sobre los cambios de conducta provocados por el alcohol

Partiendo de la evidencia neuroquímica que presenta la enzima catalasa como una de las vías de producción de acetaldehído en el SNC, algunos laboratorios, entre los que se encuentra el nuestro, han estudiado los efectos de distintas manipulaciones de la catalasa en los cambios de conducta producidos por el alcohol. El objetivo de dichos trabajos es dilucidar en qué medida estos cambios de conducta dependen del acetaldehído producido cerebralmente, a través de la oxidación catalasémica del etanol. En los párrafos que vienen a continuación me centraré exclusivamente en la explicación de los datos aportados por nuestro laboratorio.

Nuestros estudios han sido abordados fundamentalmente con estrategias farmacológicas de inhibición e inducción de la actividad del sistema enzimático de la catalasa-H_2O_2. En la actualidad, estamos desarrollando estudios con compuestos que inactivan el acetaldehído producido.

Inhibición de la catalasa y conducta inducida por alcohol

El objetivo de los estudios de inhibición ha sido demostrar que sea cual fuere el mecanismo de

inhibición mediante el que el compuesto inhibe la enzima catalasa, las consecuencias funcionales de dicha inhibición son similares. Los trabajos experimentales se han llevado a cabo con dos inhibidores no competitivos de la enzima: el AT y la cianamida sódica; un inhibidor competitivo: la acida sódica y el plomo crónicamente administrado, cuyo mecanismo de inhibición no ha sido adecuadamente descrito. En todos los casos, nuestros trabajos demuestran que la inhibición de la catalasa es suficiente para bloquear los efectos estimulantes en la conducta locomotora de ratones[48-51] de una administración aguda de etanol. En estos estudios, el curso de la inhibición de la catalasa que se describe es paralelo a las consecuencias que estas inhibiciones tienen en la conducta locomotora inducida por el alcohol. Además, existe un efecto reductor aditivo cuando se trata a los animales con dos inhibidores[50]. Este bloqueo es específico para la estimulación producida por el alcohol, porque ni la actividad inducida por d-anfetamina, ni la del ter-butanol, un alcohol que no es oxidado por el sistema de la catalasa, son afectadas por las manipulaciones antes descritas[49,50]. La inhibición de la catalasa también potencia el efecto narcótico del alcohol en ratones[52].

El alcohol, crónicamente administrado, produce una serie de neuroadaptaciones en los circuitos responsables de la motivación y la emoción[53]. En roedores, una de las manifestaciones conductuales de estas neuroadaptaciones es la sensibilización al efecto inductor de la locomoción con el tratamiento repetido de alcohol[54-56]. En este sentido, se ha demostrado que el etanol se comporta como las demás drogas. En un estudio en fase de publicación hemos demostrado que la inhibición de la catalasa bloquea el desarrollo y expresión de la sensibilización locomotora al alcohol[57].

Inducción de la catalasa y conducta inducida por alcohol

Otra estrategia farmacológica llevada a cabo por este laboratorio ha consistido en la inducción de la enzima catalasa. Esta inducción se ha realizado con dos herramientas diferentes. Por un lado, se ha aprovechado la regulación al alza que la catalasa exhibe tras la terminación de un tratamiento crónico con cianamida sódica[58]. Igualmente, dicha inducción se ha conseguido tras un periodo de 7 días posterior a una inyección aguda de plomo[59,60]. En todos los casos, la inducción de la actividad de la enzima catalasa en homogeneizados de cerebro de ratón se correlacionó con la potenciación del efecto estimulante del etanol en la locomoción[58-60]. También en estos trabajos la potenciación del efecto es específica para el alcohol, y no fue observada con otras drogas inductoras de la actividad locomtora.

En otro estudio se siguió una estrategia mixta, induciendo inicialmente la catalasa con plomo y produciendo, a continuación, la inhibición de la enzima con AT[61]. Una vez más pudimos constatar la relación entre las consecuencias de la manipulación inductora e inhibidora de la catalasa y los cambios inducidos por el alcohol. La inhibición de la catalasa redujo de forma dependiente de la dosis el aumento de los efectos del etanol conseguida por el tratamiento previo con plomo.

La oxidación del etanol mediante el sistema de la catalasa depende de los niveles de H_2O_2 presentes que actúan como un factor limitante, ya que en ausencia de H_2O_2, la catalasa no forma compuesto I y no es capaz de oxidar el etanol[37]. Así pues, una alternativa para la inducción metabólica y, por tanto, para la elevación de los niveles de acetaldehído cerebral, es la modificación del ambiente oxidativo del cerebro. Un trabajo reciente de nuestro laboratorio[62] demuestra que la generación de especies de oxígeno reactivas observada después de una exposición a hiperoxia, induce el sistema enzimático de la catalasa en cerebro de ratón y, así mismo, incrementa el efecto estimulante que en la conducta locomotora de estos animales produce el alcohol.

A partir de los datos discutidos, se puede afirmar que la implicación del binomio catalasa-acetaldehído en el mecanismo de acción del alcohol posee un respaldo importante en la actualidad. No obstante, la implicación del acetaldehído en los efectos del etanol requiere aún muchas otras pruebas adicionales.

Localización neuroanatómica del metabolismo catalasémico y su relación con los cambios de conducta producidos por el alcohol

Estudios inmunohistoquímicos[63,64] han puesto de relieve que la catalasa se sitúa fundamentalmente en los cuerpos de neuronas catecolaminérgicas del troncoencéfalo y también en ciertos tipos de glía de las mencionadas áreas, por tanto el número total de células neurales con alta concentración de catalasa (a los mismos niveles que en los hepatocitos) es muy pequeña en relación con el total del cerebro. Esto explicaría los bajos niveles de actividad detectados en homogeneizados cerebrales de rata[39,40]. Por otro lado, la localización de las neuronas que contienen alta den-

sidad de catalasa contrasta notablemente con localizaciones previamente realizadas para la ALDH[65,66]. Sin embargo, tomados en su conjunto, estos datos sugieren que aunque la cantidad total de acetaldehído que pueda producirse en el encéfalo a través de la catalasa sea pequeña, existe la posibilidad de que se produzcan acumulaciones de acetaldehído suficientes para provocar cambios en la fisiología y la actividad de determinados grupos neuronales. De esta forma, aunque solamente cantidades muy pequeñas de alcohol sean oxidadas en el cerebro, la generación local de acetaldehído pudiera tener importantes consecuencias funcionales.

Una de las estructuras cerebrales en las que pudiera acontecer esta oxidación local es el núcleo arqueado del hipotálamo. En este núcleo se ha descrito alta densidad de catalasa[64], pero no se ha encontrado especial densidad de ALDH[66]. Por tanto, es posible que la producción de acetaldehído en el núcleo arqueado fuera relevante funcionalmente. Algunos de los trabajos que hemos desarrollado en los últimos años han ido dirigidos a describir la relevancia funcional de este núcleo en los efectos estimulantes del alcohol. La lesión del núcleo arqueado con monosodio glutamato bloquea de forma específica el efecto estimulante de una inyección de alcohol[67]. Esta misma lesión previene, además, el desarrollo de sensibilización locomotora al etanol, pero no altera la sensibilización a los psicoestimulantes[68]. Es importante destacar que los efectos del etanol, bloqueados por la lesión del núcleo arqueado, parecen estar ligados a las proyecciones β-endorfínicas originadas en dicho núcleo, ya que una lesión restringida a estas proyecciones, mediante estradiol valerato, bloquea igualmente el efecto de estimulación de una inyección aguda de alcohol en ratones hembra[69]. Corroborando el papel de las proyecciones β-endorfínicas en los efectos del alcohol, Sanchis y Aragon[70] han demostrado que la administración de AT antes de una inyección aguda de alcohol bloquea la reducción en los niveles sanguíneos de LH que el alcohol produce. Este efecto del alcohol está mediado por la liberación de β-endorfinas[71].

Nuevas estrategias de investigación en la hipótesis del acetaldehído

Una de las lagunas más evidentes en los datos hasta ahora obtenidos se refiere a la implicación del acetaldehído, centralmente producido, en los cambios moleculares que se han descrito tras la administración de etanol. La descripción de estos cambios es fundamental para entender cómo las drogas de abuso generan neuroadaptaciones estables. Un primer escalón imprescindible en estas alteraciones moleculares parece ser la inducción de factores de transcripción génica[44]. Otro paso necesario para demostrar la implicación del acetaldehído en los efectos del etanol consiste en la desactivación del acetaldehído una vez ha sido producido. Ambas líneas de investigación han sido abiertas en nuestro laboratorio y están siendo exploradas en la actualidad por diferentes miembros del equipo. Resultados preliminares nos permiten concluir que la desactivación del acetaldehído mediante un compuesto capaz de producir aductos estables con éste, la D-penicilamina, bloquea también el efecto estimulante de una administración aguda de alcohol.

Reconocimientos

Muchos de los datos discutidos en el presente manuscrito han sido obtenidos por los miembros del laboratorio de Psicofarmacología del Alcohol de la Universidad Jaume I de Castellón. Este laboratorio está dirigido por el Dr. Carlos G. Aragón y está formado por los siguientes miembros: Mercè Correa Sanz, Carles Sanchís-Segura, Juan José Canales, Laura Font Hurtado, Héctor Marín Manrique, Raúl Pastor Medall, y yo misma. Así mismo, contamos con la imprescindible asistencia técnica de Alicia Dosda y Gemma Caballero.

BIBLIOGRAFÍA

1. Smith BR, Aragon CMG, Amit Z. Catalase and the production of central acetaldehyde: A possible mediator of the psychopharmacological effects of ethanol. Addict Biol 1997; 2: 277-289.
2. Zimatkin SM, Liopo AV, Deitrich RA. Distribution and kineticks of ethanol metabolism in rat brain. Alcohol Clin Exp Res 1998; 22: 1623-1627.
3. Weiss F, Koob GF. Neuropharmacology of ethanol En: Meyer R et al, eds. Neuropharmacology of ethanol. Birkäuser: New Approaches, 1995; 125-151.
4. Mihic SJ, Harris RA. Alcohol actions at the $GABA_A$ receptor/chloride channel complex. En: Deitrich RA, Erwin VG, eds. Pharmacological Effects of Ethanol on the Nervous System. Boca Raton, FL: CRC Press, 1996; 51-72.
5. Fadda F, Rossetti ZL. Chronic ethanol consumption: from neuroadaptation to neurodegeneration. Progress Neurobiol 1998; 56: 385-431.
6. Sorrell MF, Tuma DS. Functional implications of acetaldehyde binding to cell constituents. Ann NY Acad Sci 1987; 492: 50-62.

7. Walsh MJ. Role of acetaldehyde in the interactions of ethanol with neuroamines. En: Roach MK et al, eds. Biochemical aspects of alcohol. Texas: University of Texas Press, 1971; 233-266.
8. Truitt EB, Walsh MJ. The role of acetaldehyde in the actions of ethanol. En: Kissin B, Begleiter H, eds. The biology of alcoholism. Nueva York: Plenum Press, 1971; 1: 161-195.
9. Thadani PV, Truitt EB. Effect of acute ethanol or acetaldehyde administration on the uptake, release, metabolism and turnover rate of norepinephrine in rat brain. Biochem Pharmacol 1977; 26: 1147-1150.
10. Ortiz A, Griffiths PJ, Littleton JM. A comparison of the effects of chronic administration of ethanol and acetaldehyde to mice: Evidence for a role of acetaldehyde in ethanol dependence. J Pharmacy Pharmacol 1974; 6: 349-360.
11. Barbaccia ML, Bosio A, Spano PF, Trabucchi M. Ethanol metabolism and striatal dopamine turnover. J Neural Transmiss 1982; 53: 169-177.
12. Reddy BV, Sarkar DK. Effect of alcohol, acetaldehyde and salsolinol on b-endorphin secretion from the hypotalamic neurons in primary cultures. Alcohol Clin Exp Res 1993; 17: 161-1267.
13. Reddy BV, Boyadjeva N, Sarkar DK. Effect of ethanol, propanol, butanol and catalase enzyme blockers on b-endorphin secretion from primary cultures of hypotalamic neurons: Evidence for a mediatory role of acetaldehyde in ethanol stimulation of b-endorphin release. Alcohol Clin Exp Res 1995; 19: 339-344.
14. Pastoric M, Boyadjieva N, Sarkar DK. Comparison of the effects of alcohol and acetaldehyde on proopiomelanocortin mRNA levels and b-endorphin secretion from hypothalamic neurons in primary cultures. Mol Cel Neurosci 1994; 5: 580-586.
15. Kinoshita H, Jessop D, Finn DP, Coventry TL, Roberts DJ, Ameno K et al. Acetaldehyde, a metabolite of ethanol, activates the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the rat. Alcohol Alcohol 2001; 36: 59-64.
16. Kinoshita H, Jessop D, Roberts DJ, Ameno K, Ijiri I, Hisida S et al. Effects of acetaldehyde on c-fos mRNA induction in the paraventricular nucleus following ethanol administration. Alcohol Alcohol 2002; 37: 432-435.
17. Abe K, Sugiura M, Yamaguchi S, Shoyama Y, Saito H. Saffron extract prevents acetaldehyde-induced inhibition of long-term potentation in the rat dentate gyrus in vivo. Brain Res 1999; 851: 287-289.
18. Abe K, Yamaguchi S, Sugiura M, Saito H. The ethanol metabolite acetaldehyde inhibits the induction of long term potentiation in the rat dentate gyrus in vivo. Br J Pharmacol 1999; 127: 1805-1810.
19. Hunt WA. Role of acetaldehyde in the actions of ethanol on the brain-A review. Alcohol 1996; 13: 147-151.
20. Eriksson CJP. The role of acetaldehyde in the actions of alcohol (update 2000). Alcohol Clin Exp Res 2000; 25, 5: 15S-32S.
21. Peachey JE, Brien JF, Loomis CW, Rogers BJ. A study of the calcium carbimide-ethanol interaction in man: Symptom responses. Alcohol Clin Exp Res 1980; 4: 32-329.
22. Myers RD, Veale WL. Alterations in volitional alcohol intake produced in rats by chronic intraventricular infusions of acetaldehyde, paraldehyde or methanol. Arch Int Pharmacodyn 1969; 180: 100-113.
23. Myers WD, Ng K, Singer G. Ethanol preference in rats with a prior history of acetaldehyde self-administration. Experientia 1984; 40: 1008-1010.
24. Brown ZW, Amit Z, Smith BR. Intraventricular self-administration of acetaldehyde but not ethanol, in naive laboratory rats. Psychopharmacology (Berl) 1979; 64: 271-276.
25. Rodd-Henricks ZA, Zaffaroni A, Goldstein A, McBride WJ, Li TK. The reinforcing effects of acetaldehyde in the posterior ventral tegmental area of alcohol-preferring rats. Pharmacol Biochem Behav 2002; 72; 55-64.
26. Rodd-Henricks ZA, McKinzie DL, Crile RS, Murphy JM, McBride WJ. Regional heterogeneity for the intracranial self-administration of ethanol withing the ventral tegmental area of female Wistar rats. Psychopharmacology (Berl) 2000; 149: 217-224.
27. Smith BR, Amit Z, Splawinsky J. Conditioned place preference induced by intraventricular infusions of acetaldehyde. Alcohol 1984; 1: 193-195.
28. Quetermont E, De Witte PD. Conditioned stimulus preference after acetaldehyde but not ethanol injections. Pharmacol Biochem Behav 2001; 68; 449-454.
29. Correa M, Arizzi MN, Betz A, Mingote S, Salamone JD. Locomotor stimulant effects of intraventricular injections of low doses of ethanol in rats: acute and repeated administration. Psychopharmacology [en prensa].
30. Correa M, Arizzi, MN, Betz, A, Mingote, S, Salamone, JD. Open field locomotor effects in rats after intraventricular injections of ethanol and the ethanol metabolites acetaldehyde and acetate. Psychopharmacology [en prensa].
31. Petersen DR, Erwin VG, Deitrich RA. Brain acetaldehyde metabolism during ethanol consumption. Res Monographics 1983; 9: 93-99.
32. Salmela KS, Kaihovaara P, Salaspuro M, Roine RP. Role of catalase in rat gastric mucosal ethanol metabolism in vitro. Alcohol Clin Exp Res 1996; 20: 1011-1015.
33. DeMaster EG, Redfern B, Shirota FN, Nagasawa HT. Differential inhibition of rat tissue catalase by cyanamide. Biochem Pharmacol 1986; 35: 2081-2085.
34. Zimatkin SM, Deitrich RA. Ethanol metabolism in the brain. Addict Biol 1997; 2: 387-399.
35. Hunt WA. Role of acetaldehyde in the actions of ethanol on the brain-A review. Alcohol 1996; 13: 147-151.
36. Westcott JY, Weiner H, Shultz J, Myers RD. In vivo acetaldehyde in the brain of the rat treated with ethanol. Biochem Pharmacol 1980; 29: 411-417.

37. Cohen G, Sinet PM, Heikkila R. Ethanol oxidation by rat brain in vivo. Alcohol Clin Exp Res 1980; 4: 366-370.
38. Song BJ, Cederbaum AI. Ethanol inducible cytochrome P450 (CYP2E1): Biochemistry, molecular biology and clinical relevance: 1996 Update. Alcohol Clin Ex Res 1996; 20: 138-146.
39. Aragon CMG, Rogan F, Amit Z. Ethanol metabolism in rat brain homogenates by a catalase-H202 system. Biochem Pharmacol 1992; 44: 93-98.
40. Gill, K, Menez JF, Lucas D, Deitrich RA. Enzymatic production of acetaldehyde from ethanol in rat brain tissue. Alcohol Clin Exp Res 1992; 16: 910-915.
41. Lands WEM. A review of alcohol clearance in humans. Alcohol 1998; 15: 147-160.
42. Rout UK. Alcohol dehydrogenases in the brain of mice. Alcoholism Clin Exp Res 1992; 16: 286-289.
43. Upadhya S, Tirumalai S, Boyd MR, Mori T, Ravindranath V. Cytocrome P4502E (CYP2E1) in brain: Constitutive expression, induction by ethanol and localization by fluorescence in situ hybridation. Arch Biochem Biophys 2000; 373: 23-24.
44. Montoliu C, Valles S, Renau-Piqueras J, Guerri C. Ethanol-induced oxygen radical formation and lipid peroxidation in rat brain: effect of chronic alcohol consumption. J Neurochem 1994; 63: 1855-1862.
45. Aragon CMG, Stotland LM, Amit Z. Studies on ethanol-brain catalase interaction: Evidence for central ethanol oxidation. Alcohol Clin Exp Res 1991; 15: 165-169.
46. Hamby-Mason R, Chen JJ, Schenker S, Pérez A, Henderson GI. Catalase mediated acetaldehyde formation from ethanol in fetal and neonatal rat brain. Alcohol Clin Exp Res 1997; 21: 1063-1072.
47. Aragon CMG, Amit Z. Differences in ethanol-induced behaviors in normal and acatalasemic mice: Systematic examination using a biovehavioral approach. Pharmacol Biochem Behav 1993; 4: 547-554.
48. Correa M, Miquel M, Sanchis-Segura C, Aragon CMG. Effects of chronic lead administration on ethanol-induced locomotor and brain catalase activity. Alcohol 1999; 19: 43-49.
49. Sanchis-Segura C, Miquel M, Correa M, Aragon CMG. The catalase inhibitor sodium azide reduces ethanol-induced locomotor activity. Alcohol 1999; 19: 37-42.
50. Sanchis-Segura C, Miquel M, Correa M, Aragon CMG. Cyanamide reduces brain catalase and ethanol-induced locomotor activity: Is there a functional link? Psychopharmacol (Berl) 1999; 144: 83-89.
51. Escarabajal D, Miquel M, Aragon CMG. A psychopharmacological study of the relationship between brain catalase activity and ethanol's induced locomotor activity in mice. J Studies Alcohol 2000; 61: 493-497.
52. Correa M, Sanchis-Segura C, Aragon CMG. Influence of brain catalase on ethanol-induced loss of righting reflex in mice. Drug Alcohol Dep 2001; 65: 9-15.
53. Robinson TE, Berridge KC. The psychology and neurobiology of addiction: an incentive-sensitization view. Addiction 2000; 95: 91-117.
54. Cunningham CL, Noble DC. Conditioned activation induced by ethanol: Role in sensitization and condictioned place preference. Pharmacol Biochem Behav 1992; 43: 307-313.
55. Masur J, Boerngen R. The excitatory component of ethanol in mice: a chronic study. Pharmacol Biochem Behav 1980; 13: 777-780.
56. Phillips TJ, Shen EH. Neurochemical bases of locomotion and ethanol stimulant effects. Int Rev Neurobiol 1996; 39: 243-282.
57. Miquel M, Font L, Aragon CMG. Ethanol- or acetaldehyde-induced sensitisation?: The role of brain catalase. Psychopharmacology [submitted].
58. Sanchis-Segura C, Miquel M, Correa M, Aragon CMG. Daily injections of cyanamide enhance both ethanol-induced locomotion and brain catalase activity. Behav Pharmacol 1999; 10: 459-465.
59. Correa M, Miquel M, Sanchis-Segura C, Aragon CMG. Acute lead acetated administration potentiates ethanol-induced locomotor activity in mice: The role of brain catalase activity. Alcohol Clin Exp Res 1999; 23: 799-805.
60. Correa M, Miquel M, Aragon CMG. Lead acetated potentiates brain catalase activity end enhances ethanol-induced locomotion in mice. Pharmacol Biochem Behav 2000; 66: 137-142.
61. Correa M, Sanchis-Segura C, Aragon CMG. Brain catalase activity is highly correlated with etanol-induced locomotor activity in mice. Physiol Behav 2001; 64: 641-647.
62. Pastor R, Sanchis-Segura C, Aragon CMG. Ethanol-stimulated behaviour in mice is modulated by brain catalase activity and H_2O_2 rate of production. Psychopharmacology (Berl) 2002; 165: 51-59.
63. Moreno S, Mugnaini E, Ceru MP. Immunocytochemical localization of catalase in the central nervous system of rat. J Histochem Cytochem 1995; 43: 1253-1267.
64. Zimatkin SM, Lindros KO. Distribution of catalase in rat brain: Aminergic neurons as possible targets for ethanol effects. Alcohol Alcohol 1996; 31: 167-174.
65. Zimatkin SM. Histochemical study of aldehyde dehydrogenase in the rat CNS. J Neurochem 1991; 56: 1-11.
66. Zimatkin SM, Deitrich RA. Aldehyde dehydrogenase activities in the brains of rats and mice genetically selected for different sensitivity to alcohol. Alcohol Clin Exp Res 1995; 19: 1300-1306.
67. Sanchis-Segura C, Aragon CMG. Consequences of monosodium glutamate or goldthioglucose arcuate nucleus lesions on ethanol-induced locomotion. Drug Alcohol Depend 2002; 6: 189-194.
68. Miquel M, Font L, Sanchis-Segura C, Aragon CMG. Neonatal administration of monosodium glutamate prevents the development of ethanol-, but not psychostimulant-induced, sensitization: a putative role of the arcuate nucleus. Eur J Neurosci 2003 17: 2163-2170.

69. Sanchis-Segura C, Correa M, Aragon CMG. Lesion on the hypothalamic arcuate nucleus by estradiol valerate results in a blockade of ethanol-induced locomotion. Behav Brain Res 2000; 114: 57-63.
70. Sanchis-Segura C, Aragon CMG. Brain catalase inhibition blocks ethanol-related decrease of blood luteinizing hormone levels in mice. Alcohol Clin Exp Res 2002; 26: 1275-1280.
71. Cicero TJ, Newman KS, Gerrity M, Schmoeker PF, Bell RD. Ethanol inhibits the naloxone-induced release of luteinizing hormone-releasing hormone from the hypothalamus of the male rat. Life Sci 1982; 31: 1587-1596.

DISCUSIÓN

F. Rodríguez de Fonseca: La catalasa es fundamental para todas las monoxigenasas que están implicadas tanto en síntesis como en degradación de monoaminas. ¿Habéis comprobado que los efectos que tenéis no pueden ser efectos secundarios a la manipulación o la dinámica de neurotransmisión de estos transmisores específicos de los efectos reforzadores positivos? Por ejemplo, el etanol libera dopamina en el núcleo *accumbens*, y si estás manipulando tanto la síntesis de dopamina como su degradación, estás alterando esa posible señal. ¿Habéis controlado la posibilidad de que sea el etanol y no el acetaldehído el que libere la dopamina en el núcleo *accumbens*?

M. Miquel: No, pero esa reflexión también la hemos hecho, y una de las cuestiones en las que empezaremos a trabajar es si la liberación de dopamina se debe al metabolismo del alcohol y en qué medida o se debe a un efecto indirecto sobre la monoaminoxidasa. Es un trabajo que hasta ahora se escapaba a nuestra posibilidad de laboratorio por la especialización técnica que teníamos, y que vamos a llevar a cabo en colaboración con la gente de Galénica de Valencia.

F. Rodríguez de Fonseca: Te lo decía porque también otra manera de comprobarlo es intentar observar si existe algún tipo de relación estructura-actividad. Vosotros no estáis planteando una diana molecular, sino que decís que es una especie muy reactiva. Al ser una especie muy reactiva puede estar tocando muchos frentes que no se controlan. Otra cosa es la dinámica de aparición del acetaldehído *in vivo* o por microdiálisis o en células.

M. Miquel: Medir acetaldehído en cerebro es dificilísimo. De hecho, al realizar un homogeneizado de cerebro, salvo que pongas un inhibidor de la aldehído deshidrogenasa, no se detecta, porque el rango es nanomolar y los cromatógrafos de gases no miden rangos nanomolares. Por tanto, el problema es de medida, no de que no haya acetaldehído. Pero una línea esperanzadora son unos datos recientes que hay sobre microdiálisis en líquido intersticial de zonas determinadas, como el caudado o el cerebelo. Parece que se puede detectar acetaldehído tras una dosis de 1 g/kg de alcohol en una rata. En cuanto al mecanismo de acción, sólo sabemos dos cosas: una, que el acetaldehído no se une a receptores ionotrópicos, no se comporta como el alcohol, y dos, que forma macromoléculas con dopamina, ácido 3,4-dihidroxifenilacético, serotonina y también con β-endorfina, y que esas macromoléculas cuando se sintetizan y si se administran al animal producen efectos reforzantes, efectos activadores, etc. Ésos son hoy por hoy los únicos datos de que disponemos.

M. Casas: Hace unos años se argumentó que los productos de condensación entre el acetaldehído y las aminas biógenas eran las tetrahidroisoquinolinas y el salsolinol, que también has nombrado. El salsolinol podría ser una forma de bajo rendimiento de entrar en la vía de los péptidos opioides. Es decir, traducido a la clínica, el alcohólico no es un alcohólico, sino que es un heroinómano en potencia, lo que pasa es que como la heroína no está en el mercado, pues se tira al alcohol, ya que es un individuo que necesita péptidos opioides, por decirlo así. Estoy seguro de que es una hipótesis que nos gusta mucho a los clínicos, que nos justificaría una realidad, ya que cuando le administras metadona el individuo deja de tomar alcohol y a la que le retiras la metadona vuelve a tomar alcohol. ¿Se podría explicar a través de la catalasa esta hipótesis de que realmente el etanol no actúa como etanol sino que actúa a través del sistema opioide?

M. Miquel: Exactamente. Ésa fue una tesis doctoral de uno de los miembros de nuestro laboratorio, Carles Sanchís-Segura. Todos nuestros datos sugieren que puede haber un metabolismo catalasémico del etanol en las zonas periventriculares del hipotálamo produciéndose la liberación de β-endorfinas. Es verdad que los datos de autoadministración de etanol en el área tegmental ventral, o en núcleo *accumbens*, de alguna manera, afectan a esa hipótesis, porque, claro, si el sistema fundamental es el sistema β-endorfínico, ¿por qué los animales se autoadministran acetaldehído o etanol en el

área tegmental ventral? Pero salvo ese escollo, todo encaja. Es muy interesante, puede ser el etanol y el acetaldehído vía β-endorfinas. Por ejemplo, en cortes de cerebro de animales tratados con etanol, la expresión de c-fos y el marcaje mu casi coinciden.

M. CASAS: Perfecto, porque además, lo que os decía antes que la prueba del nueve de los básicos es la clínica y eso encajaría perfectamente con la clínica.

P. ROBLEDO: ¿Habéis hecho o sabéis de alguien que haya hecho lesiones del arqueado, y qué efecto tienen sobre las propiedades reforzantes del alcohol?

M. MIQUEL: No. En estos momentos lo que hay son dos trabajos fuera y uno en fase de publicación que es de sensibilización. El único trabajo previo a los nuestros es de Crabbe y Dorsa (1985) que hicieron una lesión del arqueado también con glutamato monosódico, y midieron el efecto agudo. Cuando existe lesión el efecto estimulante agudo se reduce y la sensibilización se bloquea, pero no se sabe nada más. Nosotros ahora estamos realizando un trabajo que consiste en administrar un inhibidor, acida sódica, un inhibidor competitivo de la catalasa en arqueado directamente, y medir la conducta en ratas. Y confirmamos lo que hemos observado hasta ahora. Es decir, vemos una prevención del efecto depresor que tiene el alcohol en ratas.

P. ROBLEDO: Otra pregunta que te quería hacer era sobre la distribución de la catalasa. Has hablado del núcleo del tracto solitario y del arqueado. ¿Hay otras estructuras que destaquen por su concentración elevada en catalasa?

M. MIQUEL: Sí, catalasa hay en todos sitios. Lo que pasa es que cuando se hace inmunohistoquímica, lo que se observa es que evidentemente todas las células tienen catalasa, porque si no no pueden sobrevivir, pero existen zonas especialmente densas, lo que tiene sentido, porque son todas las zonas cuya barrera hematoencefálica es débil. Son zonas del cerebro que al no tener barrera hematoencefálica se tienen que defender ante tóxicos de otras maneras, por ejemplo, mediante enzimas antioxidantes; también la superóxido dismutasa está ahí muy coexpresada. Todas las zonas periventriculares, órganos circuventriculares, son zonas de expresión, pero la más alta expresión está en el tracto solitario y en el núcleo arqueado del hipotálamo. El tracto solitario es otra de las estructuras cuyas funciones en los efectos del alcohol están pendientes de estudio.

S. ERILL: ¿Tienes datos sobre penetrabilidad de la D-penicilamina en el sistema nervioso central? ¿Y sobre volativilidad del acetaldehído?

M. MIQUEL: No. Precisamente estamos buscando un inhibidor del paso de la D-penicilamina a través de la barrera hematoencefálica y todavía no lo hemos podido encontrar. Sería un inhibidor del transporte a través de las células endoteliales de la barrera hematoencefálica del tiol D-penicilamina, porque para otros aminoácidos existe, por ejemplo, para la hipotaurina o para la cisteína está la β-alanina, que bloquea el paso y bloquea, además, el efecto de la hipotaurina en la locomoción inducida por el alcohol. Pero para D-penicilamina no lo hemos encontrado.

S. ERILL: Quizás verapamilo. ¿Y sobre la volativilidad del acetaldehído?, ya que a lo mejor no se encuentra porque ya se ha ido.

M. MIQUEL: El aceltadehído es volátil, lo que pasa es que yo creo que no se encuentra en el cerebro por tres razones. Una es la proporción en la que se genera, la segunda es porque la aldehído deshidrogenasa es una enzima muy eficaz y la tercera es porque el poco acetaldehído que hay se une inmediatamente y ya no lo puedes medir. O sea la única solución para medir acetaldehído, probablemente la solución de futuro, sea un anticuerpo de la proteína, un anticuerpo para salsolinol o un anticuerpo para TIQ, un anticuerpo que realmente te permita evaluar el acetaldehído unido, porque acetaldehído libre queda poco.

S. ERILL: Te lo digo porque hay muchos componentes volátiles que simplemente durante la conservación del cerebro se pierden, y eso podría dar lugar a una posible forma de análisis sencillísima, que sería la extracción del cerebro inmediatamente después de la administración del alcohol, la colocación en el tubo de ensayo tapado con un tapón de goma, facilitar la evaporación colocándolo a 40 ºC y hacer cromatografía en fase de vapor, que es limpísima.

M. MIQUEL: Eso lo hacemos así cuando medimos alcohol. Normalmente lo hacemos en homogeneizado.

J. PINEDA: Respecto a la D-penicilamina, ¿se sabe de algún otro tipo de actividad que tenga sobre algún otro sistema?

M. MIQUEL: Lo único que sabemos sobre la D-penicilamina es que es un potente quelante de metales. No hay nada más publicado, al menos que yo conozca. Claro, la quelación de metales también habría que planteársela como un mecanismo de interacción con los efectos del alcohol. Por eso la idea es utilizar

también otro tipo de secuestradores. Hay un equipo de investigación, dirigido por Nagasawa, que llevó a cabo los estudios bioquímicos con la D-penicilamina y el secuestro de acetaldehído, y ahora tiene moléculas muchísimo más específicas, porque han descubierto cuál es el grupo que se une realmente al acetaldehído y están sintetizando captadores muy específicos. Nuestra idea es empezar a trabajar con estas moléculas, porque a lo mejor nos evitaríamos la quelación de metales.

E. AMBROSIO: Has dicho que el modelo no funciona en ratas, ¿a qué te refieres con eso?

M. MIQUEL: Me refiero a los efectos estimulantes del alcohol. No es posible inyectar alcohol a una rata y observar estimulación motora. Si tú haces que una rata consuma alcohol, a las concentraciones que ella decida consumir, e inmediatamente y la pones en un *open field*, entonces sí observas estimulación. Evidentemente para la ingesta la rata sí es un buen modelo. Pero el problema son los estudios de estimulación.

Cambios neurobiológicos inducidos por MDMA: mecanismos de neurotoxicidad

M.I. Colado

Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad Complutense, Madrid.

Introducción

La 3,4-metilenodioximetanfetamina (MDMA, "éxtasis") es un derivado anfetamínico sustituido en el anillo que también está estructuralmente relacionado con el alucinógeno mescalina. Se patentó en el año 1914, aunque no está claro si como agente supresor del apetito o como agente precursor de compuestos terapéuticamente activos. En la década de 1970 MDMA se comenzó a usar en psicoterapia debido a su supuesta capacidad para disminuir la ansiedad, aumentar la autoestima, desarbolar los mecanismos de defensa psicológicos y facilitar la comunicación terapéutica. Se administró por vía oral (75-175 mg) y se observó que también producía efectos simpaticomiméticos agudos, como incremento de la frecuencia cardíaca y de la presión sanguínea y un estado de ansiedad transitorio. En 1985, la Drug Enforcement Administration (DEA, EE.UU.) introdujo la MDMA dentro de la lista I de sustancias psicotrópicas debido a su alto potencial de abuso, ausencia de aplicación clínica, desacuerdo entre expertos sobre la seguridad para su uso bajo supervisión médica y evidencia de que la 3,4-metilenodioxianfetamina (MDA), un compuesto relacionado y principal metabolito de MDMA, inducía una degeneración de los terminales nerviosos serotoninérgicos en el cerebro de la rata.

No obstante, a partir de la década de 1980 MDMA ha llegado a ser muy popular como droga recreativa de abuso, principalmente entre amplios sectores de la población juvenil. La autoadministración de esta droga se realiza vía oral en forma de comprimidos o cápsulas, y generalmente los consumidores de MDMA son de fin de semana. El éxtasis aparece en una gran variedad de colores, formas y tamaños de tableta decorada con diversos diseños y logotipos. Como sucede con cualquier droga recreativa obtenida y preparada ilícitamente, la dosis y la pureza varían enormemente, pero las tabletas generalmente contienen 80-150 mg de MDMA.

El consumo humano de este compuesto es preocupante, debido a que estudios procedentes de diversos laboratorios han demostrado que MDMA, al igual que otros derivados anfetamínicos como metanfetamina, fenfluramina o p-cloroanfetamina, es tóxica para el cerebro de diversas especies animales.

Neurotoxicidad de MDMA

El efecto neurotóxico que produce MDMA en roedores es específico de la especie en el sentido de que hay marcadas diferencias entre el daño neuronal inducido por MDMA en la rata y el observado en el ratón.

La administración repetida de MDMA en el ratón produce, a largo plazo, un efecto neurotóxico selectivo sobre las vías dopaminérgicas nigroestriatales, ejerciendo poco efecto sobre las neuronas que contienen serotonina (5-HT)[1-3]. Este efecto neurotóxico se ha demostrado utilizando técnicas bioquímicas y se manifiesta mediante una disminución en la concentración de dopamina y sus metabolitos, los ácidos 3,4-dihidroxifenilacético y homovanílico en el estriado. Esta reducción en el contenido catecólico inducida por MDMA en el estriado del ratón probablemente refleja una degeneración neurotóxica de los terminales nerviosos dopaminérgicos similar a la que se observa tras la administración de metanfetamina en la rata y en el ratón[4-7].

En contraste con lo que ocurre en el ratón, en la rata MDMA se comporta como una neurotoxina serotoninérgica selectiva, de tal manera que una dosis única produce, a largo plazo, una pérdida de terminales nerviosos serotoninérgicos en diversas regiones cerebrales. La degeneración neuronal se manifiesta como una disminución significativa de la concentración de 5-HT y su metabolito, el ácido 5-hidroxiindolacético, una

reducción en la densidad de lugares de recaptación de 5-HT marcados con [^{3}H]-paroxetina[8,9] y una disminución en la inmunorreactividad de los axones serotoninérgicos finos en la corteza cerebral, estriado e hipocampo[10].

Especies reactivas de oxígeno y peroxidación lipídica

Existen relativamente pocos estudios orientados a evaluar los mecanismos implicados en el efecto neurotóxico de MDMA sobre las neuronas dopaminérgicas del estriado de ratón. No obstante, la evidencia experimental disponible indica que la neurotoxicidad de MDMA en el ratón se debe a un proceso de estrés oxidativo que se inicia inmediatamente después de la administración de la droga. MDMA provoca una disminución en las actividades de la superóxido dismutasa y de la glutatión peroxidasa y un incremento en el grado de peroxidación lipídica en diversas estructuras cerebrales[11]. Datos más directos se han obtenido recientemente en nuestro laboratorio, donde, utilizando la técnica de la microdiálisis intracerebral in vivo hemos demostrado que MDMA incrementa la conversión de ácido salicílico a ácido 2,3-dihidroxibenzoico (2,3-DHBA) en el dializado estriatal[2,12]. Esta medida es un método ampliamente aceptado para cuantificar la formación de radicales hidroxilo[8,13,14], e indica que MDMA está aumentando la formación de radicales libres en esta región cerebral[15]. Además, hemos demostrado que inhibidores de óxido nítrico sintasa neuronal, tales como AR-R17477AR y S-metiltiocitrulina, cuando se administran juntamente con MDMA, previenen el daño neuronal y el incremento en la formación de radicales hidroxilo inducidos por MDMA[2]. Estos compuestos no tienen actividad intrínseca como atrapadores de radicales libres y no modifican la hipertermia de MDMA[2]. Además, ratones transgénicos que sobreexpresan la enzima CuZn superóxido dismutasa son resistentes a la acción neurotóxica de MDMA[16]. El sistema de recaptación de dopamina parece desempeñar un importante papel, puesto que un compuesto inhibidor del transportador de dopamina, GBR 12909, coadministrado con MDMA previene la formación de radicales hidroxilo y el incremento en el índice de peroxidación lipídica inducido por la droga[12].

Respecto al mecanismo implicado en la producción del efecto neurodegenerativo en la rata, existen abundantes datos experimentales que indican la existencia de un proceso de estrés oxidativo similar al que ocurre en el ratón. Mediante microdiálisis intracerebral *in vivo*, se ha demostrado que MDMA también induce un incremento en la formación de radicales hidroxilo en el cerebro de la rata que se refleja por un aumento en la concentración de 2,3-DHBA en el dializado del hipocampo[8,17]. El atrapador de radicales hidroxilo alfa-fenil-N-ter-butilnitrona abole el incremento en los niveles de ácido 2,3-dihidroxibenzoico inducido por MDMA[8] y atenúa el daño neuronal a largo plazo[8,18,19]. Datos adicionales que apoyan la existencia de un proceso de estrés oxidativo se refieren a un incremento en el grado de peroxidación lipídica cerebral tras la administración de MDMA[20,21]. Los radicales hidroxilo son probablemente formados en los terminales serotoninérgicos, puesto que no se observa incremento en los niveles de 2,3-DHBA del dializado del hipocampo cuando MDMA se administra a ratas cuyos terminales nerviosos serotoninérgicos habían sido lesionados previamente por pretratamiento con fenfluramina[8]. Esta hipótesis es soportada por el hecho de que fluoxetina, que previene la entrada de MDMA en el terminal o más probablemente de un metabolito tóxico de la droga, reduce la formación de radicales libres inducida por MDMA[17].

Todos estos datos considerados en conjunto indican que MDMA induce la formación de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno que a su vez inducen un proceso de estrés oxidativo.

Selenio en dieta y neurotoxicidad de MDMA

El selenio es un micronutriente que está presente en alta proporción en algunos alimentos de la dieta de los mamíferos, como el brócoli, y forma parte del centro activo de la enzima glutatión peroxidasa y de varias enzimas dependientes de selenio. Concretamente, la glutatión peroxidasa contiene un residuo de selenocisteína en su centro activo que es esencial para su actividad peroxidasa. Por tanto, la actividad de la glutatión peroxidasa es altamente sensible al contenido de selenio en la dieta, de tal manera que existe una alta correlación entre la actividad de la glutatión peroxidasa, los niveles de selenio en la dieta y la resistencia al estrés oxidativo[22]. La glutatión peroxidasa junto con catalasa y superóxido dismutasa son los principales sistemas antioxidantes celulares frente a la formación de radicales libres. La superóxido dismutasa cataliza la dismutación del anión superóxido a peróxido de hidrógeno (H_2O_2)[23,24], mientras que glutatión peroxidasa y catalasa utilizan glutatión para reducir el peróxido de hidrógeno a agua (H_2O).

Puesto que especies reactivas de oxígeno parecen desempeñar un importante papel en el mecanismo de la neurotoxicidad inducida por

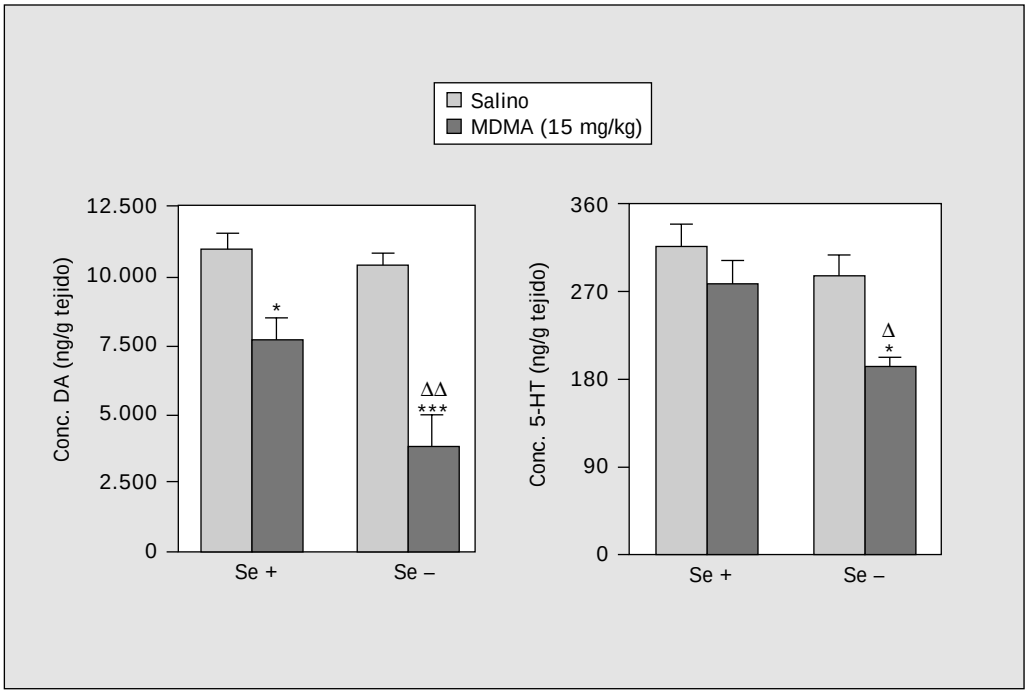


*Fig. 1. Efecto de MDMA (15 mg/kg, i.p., 3 veces, cada 3 h) sobre la concentración de dopamina (DA) en el estriado y de serotonina (5-HT) en la corteza cerebral de ratones mantenidos con una dieta deficiente o suplementada con selenio (Se). Los animales fueron mantenidos en tratamiento dietético 7 semanas antes de recibir MDMA y una semana después. Los resultados muestran la media ± ESM (n = 5-9). Diferente respecto al correspondiente grupo salino: *p < 0,05, ***p < 0,001. Diferente respecto al grupo Se (+) + MDMA: Δ p < 0,05, ΔΔ p < 0,01.*

MDMA en roedores y la glutatión peroxidasa es uno de los principales sistemas antioxidantes celulares frente a la formación de radicales libres, hemos evaluado recientemente en nuestro laboratorio la influencia del selenio en la dieta sobre los efectos a largo plazo inducidos por MDMA sobre las concentraciones de dopamina y 5-HT en el cerebro del ratón y de la rata. Para realizar este estudio, los animales se mantuvieron con una dieta deficiente en selenio (< 0,02 ppm) o suplementada en selenio (0,2 ppm) durante 8 semanas. En la séptima semana, los ratones recibieron 3 inyecciones de MDMA (15 mg/kg, i.p., con un intervalo de 3 h) y las ratas una única inyección de MDMA (12,5 mg/kg, i.p.). Todos los animales se sacrificaron 7 días más tarde, es decir, al final del tratamiento dietético.

Como cabía esperar la administración repetida de MDMA en el ratón, 7 días más tarde produjo una disminución en la concentración estriatal de dopamina en ambos grupos dietéticos, pero la depleción resultó mucho más pronunciada en el grupo deficiente de selenio (fig. 1). Pero, además, y quizá esto es lo más llamativo, observamos que la administración de MDMA en el grupo suplementado con selenio no alteró la concentración estriatal de 5-HT, exactamente igual que ocurre en animales mantenidos con una dieta estándar. Sin embargo, en situaciones de deficiencia en selenio la droga origina una pérdida significativa del contenido indólico (fig. 1).

Es importante destacar que esta potenciación de la neurotoxicidad de MDMA no se debe a un incremento en la respuesta hipertérmica a MDMA, puesto que tanto los animales mantenidos con un suplemento de selenio como aquellos deficientes de selenio mostraron un incremento similar en la temperatura rectal tras la inyección de MDMA.

Este incremento en la toxicidad de MDMA en ratones deficientes de selenio puede atribuirse a

una alteración en los mecanismos de detoxificación cerebrales (antioxidantes cerebrales) mediados por glutatión, ya que un tratamiento dietético prácticamente carente de selenio produce una disminución de aproximadamente un 30% en la actividad de la glutatión peroxidasa cerebral, concretamente en estriado y corteza, y esta reducción es lo suficiente para inducir un incremento en el grado de peroxidación lipídica cerebral que se refleja por un aumento en la formación de malondialdehído.

La administración de MDMA a la rata produjo, 7 días más tarde, una disminución en la concentración de 5-HT en la corteza, hipocampo y estriado. Ahora bien, el efecto que produce MDMA sobre estos parámetros serotoninérgicos es similar en ambos grupos dietéticos.

Podría pensarse que el tratamiento dietético con selenio por cualquier razón no había resultado eficaz para alterar el sistema de detoxificación cerebral en las ratas. Sin embargo, esta posibilidad queda descartada por el hecho de que en las ratas deficientes de selenio se observó una reducción de aproximadamente 35-45% en la actividad de la glutatión peroxidasa en corteza, hipocampo y estriado. Ahora bien, esta reducción no parece ser suficiente para aumentar el índice de peroxidación lipídica cerebral, puesto que la formación de malondialdehído fue similar en tejido cortical procedente de ambos grupos de animales suplementados o deficientes de selenio.

Conclusiones

La neurotoxicidad inducida por MDMA sobre las neuronas serotoninérgicas y dopaminérgicas de la rata y del ratón, respectivamente, resulta de la formación de radicales libres que a su vez induce un proceso de estrés oxidativo.

Una deficiencia en selenio altera el estado antioxidante celular en el cerebro del ratón y este efecto es suficiente para potenciar la neurotoxicidad inducida por MDMA.

La capacidad antioxidante del cerebro de la rata y del ratón difiere, y este hecho origina una diferente susceptibilidad al estrés oxidativo causado por MDMA en situaciones de bajo contenido de selenio en la dieta.

BIBLIOGRAFÍA

1. O'Callaghan JP, Miller DB. Neurotoxicity profiles of substituted amphetamines in the C57BL/6J mouse. J Pharmacol Exp Ther 1994; 270: 741-751.
2. Colado MI, Camarero J, Mechan AO, Sanchez V, Esteban B, Elliot JM et al. A study of the mechanism involved in the neurotoxic action of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, 'ecstasy') on dopamine neurons in mouse brain. Brit J Pharmacol 2001; 134: 1711-1723.
3. O'Shea E, Esteban B, Camarero J, Green AR, Colado MI. Effect of GBR 12909 and fluoxetine on the acute and long-term changes induced by MDMA ("ecstasy") on the 5-HT and dopamine concentrations in mouse brain. Neuropharmacology 2001; 40: 65-74.
4. Green AR, De Souza RJ, Williams JL, Murray TK, Cross AJ. The neurotoxic effects of methamphetamine on 5-hydroxytryptamine and dopamine in brain: evidence for the protective effect of chlormethiazole. Neuropharmacology 1992; 31: 315-321.
5. Baldwin HA, Colado MI, Murray TK, De Souza RJ, Green AR. Striatal dopamine release in vivo following neurotoxic doses of methamphetamine and effect of neuroprotective drugs, chlormethiazole and dizocilpine. Br J Pharmacol 1993; 108: 590-596.
6. Bowyer JF, Davies DL, Schmued L, Broening HW, Newport GD, Slikker W Jr et al. Further studies of the role of hyperthermia in methamphetamine neurotoxicity. J Pharmacol Exp Ther 1994; 268: 1571-1580.
7. Itzhak Y, Ali SF. The neuronal nitric oxide synthase inhibitor, 7-nitroindazole, protects against methamphetamine-induced neurotoxicity in vivo. J Neurochem 1996; 67: 1770-1773.
8. Colado MI, O'Shea E, Granados R, Murray TK, Green AR. *In vivo* evidence for free radical involvement in the degeneration of rat brain 5-HT following administration of MDMA ('ecstasy') and *p*-chloroamphetamine but not the degeneration following fenfluramine. Br J Pharmacol 1997; 121: 889-900.
9. Sanchez V, Camarero J, Esteban B, Peter MJ, Green AR, Colado MI. The mechanisms involved in the long-lasting neuroprotective effect of fluoxetine against MDMA ('ecstasy')-induced degeneration of 5-HT nerve endings in rat brain. Br J Pharmacol 2001; 134: 46-57.
10. O'Hearn E, Battaglia G, De Souza EB, Kuhar MJ, Molliver ME. Methylenedioxyamphetamine (MDA) and methylenedioxymethamphetamine (MDMA) cause selective ablation of serotonergic axon terminals in forebrain immunocytochemical evidence for neurotoxicity. J Neurosci 1988; 8: 2788-2803.
11. Jayanthi S, Ladenheim B, Andrews AM, Cadet JL. Overexpression of human copper/zinc superoxide dismutase in transgenic mice attenuates oxidative stress caused by methylenedioxymethamphetamine (ecstasy). Neuroscience 1999; 91: 1379-1387.
12. Camarero J, Sanchez V, O'Shea E, Green AR, Colado MI. Studies, using in vivo microdialysis, on the effect of the dopamine uptake inhibitor GBR 12909 on 3,4-methylenedioxymethamphetamine ('ecstasy')-induced dopamine release and free radical formation in the mouse striatum. J Neurochem 2002; 81: 961-972.

13. Chiueh CC, Krishna G, Tulsi P, Obata T, Lang K, Huang SJ et al. Role of dopamine autoxidation, hydroxyl radical generation and calcium overload in underlying mechanisms involved in MPTP-induced Parkinsonism. Adv Neurol 1992; 60: 251-258.
14. Giovanni A, Liang LP, Hastings TG, Zigmond MJ. Estimating hydroxyl radical content in rat brain using systemic and intraventricular salicylate; impact of methamphetamine. J Neurochem 1995; 64: 1819-1825.
15. Halliwell B, Kaur H. Hydroxylation of salicylate and phenylalanine as assays for hydroxyl radicals: a cautionary note visited for the third time. Free Rad Res 1997; 27: 239-244.
16. Cadet JL, Ladenheim B, Hirata H, Rothman RB, Ali S, Carlson E et al. Superoxide radicals mediate the biochemical effect of methylenedioxymethamphetamine (MDMA): Evidence from using CuZn-superoxide dismutase transgenic mice. Synapse 1995; 21: 169-176.
17. Shankaran M, Yamamoto BK, Gudelsky GA. Involvement of the serotonin transporter in the formation of hydroxyl radicals induced by 3,4-methylenedioxymethamphetamine. Eur J Pharmacol 1999; 385: 103-110.
18. Colado MI, Green AR. The spin trap reagent α-phenyl-N-tert-butyl nitrone prevents 'ecstasy'-induced neurodegeneration of 5-hydroxytryptamine neurons. Eur J Pharmacol 1995; 280: 343-346.
19. Yeh SY. N-tert-butyl-alpha-phenylnitrone protects against 3,4-methylenedioxymethamphetamine-induced depletion of serotonin in rats. Synapse 1999; 31: 169-177.
20. Colado MI, O'Shea E, Granados R, Misra A, Murray TK, Green AR. A study of the neurotoxic effect of MDMA ('ecstasy') on 5-HT neurons in the brains of mothers and neonates following administration of the drug during pregnancy. Br J Pharmacol 1997; 121: 827-833.
21. Sprague JE, Nichols DE. The monoamine oxidase-B inhibitor L-depenyl protects against 3,4-methylenedioxymethamphetamine-induced lipid peroxidation and long-term serotonergic deficits. J Pharmacol Exp Ther 1995; 273: 667-673.
22. Castano A, Cano J, Machado A, Low selenium diet affects monoamine turnover differentially in substantia nigra and striatum. J Neurochem 1993; 61: 1302-1307.
23. Freeman BA, Crapo JD, Biology of disease: free radicals and tissue injury. Lab. Invest. 1982; 47: 412-426.
24. Fridovich I. Superoxide dismutases. An adaptation to a paramagnetic gas. J Biol Chem 1989; 264: 7761-7764.

DISCUSIÓN

La discusión correspondiente a esta ponencia tuvo lugar conjuntamente con la ponencia siguiente, por lo que se ha publicado a continuación del próximo capítulo.

Aspectos neurobiológicos de la adicción a MDMA

P. Robledo

Laboratori de Neurofarmacologia, Facultat de Ciències de la Salut i de la Vida, Universitat Pompeu Fabra-IMIM, Barcelona.

Introducción

La 3,4-metilenodioximetanfetamina (MDMA), popularmente llamada éxtasis, es un derivado de las feniletilaminas con propiedades psicoestimulantes. Aunque su consumo se ha intensificado en Europa en los últimos años, su potencial adictivo aún no se ha demostrado. Este hecho puede deberse a que hasta el momento sólo se han documentado casos en los que el consumo de MDMA se realiza en fin de semana. Actualmente se empiezan a describir casos en los que se cumplen algunos de los criterios establecidos en el DSM-IV de farmacodependencia[1]. Lo que sí se ha demostrado claramente, en humanos y en animales de experimentación, es la capacidad de MDMA de producir efectos gratificantes que pueden contribuir a su consumo repetido. Por otra parte, la administración reiterada de esta sustancia puede desencadenar trastornos afectivos, como ansiedad y depresión, además de perturbaciones cognitivas[1-5]. También se ha descrito que MDMA produce neurotoxicidad persistente en los terminales neuronales serotoninérgicos en animales de experimentación[6] e incluso en humanos[7], pudiendo ésta participar en las alteraciones psicopatológicas presentes en ciertos consumidores. En este artículo se expondrán los principales mecanismos neurobiológicos implicados en las propiedades reforzantes de MDMA y también se mostrarán datos recientes generados en nuestro laboratorio sobre los procesos de dependencia a esta sustancia.

Propiedades reforzantes de MDMA

Muchos de los estudios que evalúan el potencial adictivo de las drogas se basan en la estimación de sus propiedades reforzantes, ya que son éstas las que fundamentalmente contribuyen a su búsqueda compulsiva y a su abuso. Los primeros estudios en animales demostrando las propiedades reforzantes de MDMA utilizaron la técnica de autoadministración intravenosa de drogas. El potencial reforzante de una droga, determinado en animales por este procedimiento, es el más claro indicador de su potencial adictivo en humanos. Así, se mostró que MDMA podía autoadministrarse en monos previamente entrenados a autoadministrarse cocaína[8-10]. Otros estudios han utilizado la técnica de autoestimulación intracerebral basada en el hecho de que una estimulación eléctrica en ciertas áreas cerebrales produce una sensación placentera. Una propiedad común que tienen las drogas de abuso es la de facilitar la estimulación eléctrica de dichos centros debido a sus propiedades euforizantes. Así, se ha demostrado que MDMA produce una disminución dependiente de la dosis del umbral de autoestimulación a nivel del hipotálamo lateral indicando un aumento de la recompensa inducida por la estimulación[11]. Las propiedades motivacionales de MDMA también se han estudiado por medio de la técnica de preferencia de plaza condicionada. Este paradigma se basa en asociar la administración de una droga con un ambiente neutro. Si la droga posee efectos apetitivos, el animal preferirá el ambiente asociado a la droga; si, por el contrario, ésta posee propiedades aversivas, el animal lo evitará. Así, se demostró que MDMA inducía, de una manera dependiente de la dosis, una preferencia de plaza en ratas[12,13]. Utilizando este protocolo en nuestro laboratorio hemos observado que una dosis de 10 mg/kg de MDMA también produce efectos reforzantes en ratones[14].

Sustrato neurobiológico implicado en las propiedades reforzantes de MDMA

La administración aguda de MDMA produce un aumento en las concentraciones extracelulares de serotonina (5-HT), dopamina y noradrenalina en varias estructuras cerebrales[15]. En

cuanto al sistema dopaminérgico mesolímbico, diversos estudios neuroquímicos han puesto de manifiesto su participación en los procesos de recompensa producidos por varias drogas de abuso. Así, por ejemplo, se ha demostrado que tanto los opioides como los cannabinoides, la nicotina, el alcohol, los psicoestimulantes y la MDMA producen un aumento de dopamina en el núcleo *accumbens* de la rata[13,16-19]. Por tanto, es muy probable que la proyección dopaminérgica desde el área tegmental ventral al núcleo *accumbens* participe en los efectos reforzantes de MDMA. Estudios conductuales han mostrado que el inhibidor de la liberación de dopamina, CGS 10746B, bloquea la preferencia de plaza inducida por esta sustancia en ratas[20] confirmando que la liberación de dopamina es necesaria para la expresión de los efectos reforzantes de MDMA. La implicación de la serotonina en las propiedades gratificantes de MDMA también se ha estudiado en animales de experimentación. Así, se ha demostrado que los antagonistas serotoninérgicos 5-HT_3 bloquean la preferencia de plaza inducida por MDMA en ratas[21] y los antagonistas 5-HT_2 bloquean la autoadministración de MDMA en el mono[11]. De igual modo, otros estudios sugieren que algunos de los efectos motivacionales inducidos por MDMA en ratas podrían estar mediados por los receptores 5-HT_{2C}[22]. Recientemente, se ha demostrado en humanos que un antagonista no selectivo de los receptores serotoninérgicos 5-HT_2, la ketanserina, y el inhibidor de la recaptación de la serotonina (citalopram) bloquean algunos efectos subjetivos inducidos por MDMA[23]. Estos datos sugieren la existencia de diversos subtipos de receptores serotoninérgicos implicados en los efectos estimulantes y motivacionales de MDMA. Sin embargo, una depleción serotoninérgica en ratas producida por una dosis neurotóxica de MDMA no afecta la preferencia de plaza inducida por esta droga[24], lo que sugiere que la liberación de serotonina no es necesaria para la expresión de los efectos reforzantes de MDMA. Los efectos de la noradrenalina sobre las propiedades reforzantes de MDMA no se han estudiado. No obstante, este neurotransmisor parece intervenir en los efectos producidos por drogas de abuso como la cocaína[25], y es muy probable que también participe en algunos de los efectos positivos inducidos por MDMA[26].

Por otro lado, también existen estudios que muestran la participación del sistema opioide en las propiedades gratificantes de MDMA, dado que la preferencia de plaza inducida por esta sustancia puede ser bloqueada por la naltrexona[12]. Más recientemente, se ha demostrado en ratas que la autoadministración intracraneal de MDMA puede ser modulada por el sistema cannabinoide endógeno. Así, las propiedades reforzantes de MDMA administrada directamente en el ventrículo cerebral se vieron disminuidas por el antagonista cannabinoide CB-1, el SR-171416A[27]. En conjunto, estos estudios muestran la multiplicidad de sistemas de neurotransmisión que modulan los efectos de recompensa inducidos por MDMA. No obstante, todavía queda por elucidar cuáles son los mecanismos precisos que intervienen en dicha modulación.

Alteraciones neuroquímicas y conductuales producidas por MDMA

La administración repetida de MDMA, al igual que la de otros psicoestimulantes como la anfetamina y la cocaína, producen cambios neuroquímicos en el sistema dopaminérgico mesolímbico que se asocian con una sensibilización conductual. En este sentido se ha demostrado que la administración repetida de MDMA produce un aumento a largo plazo de la locomoción así como de los niveles de dopamina en el núcleo *accumbens*[28,29]. Esta sensibilización parece ser independiente de la presencia de serotonina, puesto que también ocurre en animales donde una administración neurotóxica de MDMA ha producido una depleción serotoninérgica[29,30]. No obstante, diversos estudios indican la existencia de tolerancia a los efectos hiperlocomotores de MDMA[31] y a los efectos perturbadores de MDMA en tareas cognitivas en ratas[32] y en monos[33]. En los estudios que muestran sensibilización conductual al MDMA, las inyecciones se realizan en el mismo ambiente en el que se evalúa la conducta, mientras que en los estudios que muestran tolerancia las inyecciones se realizan en un ambiente diferente. Estos datos sugieren que el aprendizaje de las asociaciones entre la administración de la droga y el estímulo ambiental participa en la sensibilización conductual observada con MDMA. Estos datos también muestran la complejidad de las respuestas adaptativas inducidas por MDMA, probablemente debidas a la contribución de diferentes neurotransmisores.

La capacidad que tiene MDMA para actuar sobre los sistemas de neurotransmisión comunes implicados en las propiedades motivacionales de las drogas de abuso puede contribuir a cambios neuroquímicos y conductuales relacionados con la motivación y la conducta adictiva. Así, se ha demostrado que la administración repetida de MDMA produce deficiencias en la modulación inhibitoria de conductas de búsqueda de refuer-

zo[34]. En relación con estos resultados, existen estudios conductuales en ratas que demuestran que la administración repetida de MDMA aumenta la preferencia de plaza inducida por la cocaína[35] y facilita la adquisición de la conducta de autoadministración intravenosa de cocaína[36]. Estos datos sugieren que MDMA puede sensibilizar el sistema de recompensa de drogas psicoestimulantes, como la cocaína.

Por otra parte, la administración repetida de MDMA también produce alteraciones en los procesos de aprendizaje y memoria. Estudios en consumidores de MDMA que no han ingerido la droga durante 6 meses consecutivos muestran alteraciones cognitivas relacionadas con un aumento de la impulsividad y también perturbaciones en la memoria episódica[4]. Otros estudios demuestran que los consumidores de MDMA presentan una deficiencia de memoria a corto plazo, que podría estar relacionada con alteraciones en el sistema serotoninérgico[37]. De acuerdo con estos resultados, recientemente se ha demostrado en animales que un régimen neurotóxico de MDMA perjudica la retención a corto plazo de una tarea cognitiva[32]. Sin embargo, otros estudios en ratas muestran que las alteraciones conductuales producidas por MDMA pueden existir sin ir acompañadas de neurotoxicidad serotoninérgica[38]. Además, estudios en nuestro laboratorio utilizando ratones muestran que la administración subcrónica de MDMA, a dosis que no producen neurotoxicidad serotoninérgica ni dopaminérgica, es capaz de alterar específicamente la retención de una respuesta de evitación activa sin modificar la adquisición de esta respuesta (manuscrito en preparación). Estos resultados sugieren que los trastornos de memoria y aprendizaje producidos por MDMA no se deben a la depleción monoaminérgica, y que pueden deberse a cambios adaptativos a otros niveles. Existen algunos estudios que muestran que la administración tanto aguda como crónica de MDMA puede producir modificaciones en los receptores postsinápticos serotoninérgicos de tipo 5-HT_{1A} en ratas y en humanos[37]. Sin embargo, todavía no se han ofrecido estudios sobre las alteraciones que ocurren en los otros sistemas de neurotransmisión que participan en los procesos cognitivos, como el sistema dopaminérgico.

Dependencia física a MDMA

La interrupción del uso crónico de algunas drogas de abuso ha sido relacionada con la aparición de ciertas manifestaciones somáticas que varían dependiendo de cada sustancia. Por otro lado, las alteraciones motivacionales, tales como disforia, depresión y ansiedad, que normalmente van acompañadas de una desregulación de los sistemas neuroquímicos de recompensa, caracterizan el síndrome de abstinencia a la mayoría de las drogas de abuso[39]. Aunque la presencia de signos somáticos relacionados con un síndrome de abstinencia al MDMA no ha sido descrita hasta ahora, existen diversos estudios en humanos que muestran la aparición de ciertas alteraciones psicológicas incluyendo depresión, ansiedad, impulsividad y problemas de memoria que persisten por largos periodos después de la abstinencia a la droga[1-5]. En nuestro laboratorio hemos intentado desarrollar un modelo de dependencia física al MDMA en ratones. Este modelo consiste en administrar 10 mg/kg de MDMA dos veces al día durante 5 días y una vez el sexto día. Cuatro horas después de la última inyección, se administran antagonistas de los receptores serotoninérgicos 5-$HT_{1/2}$, antagonistas de los receptores adrenérgicos beta y adrenérgicos $alfa_1$ o antagonistas de los receptores dopaminérgicos D_1 y D_2. Mediante este protocolo, se observó que el antagonista no selectivo de los receptores adrenérgicos beta (timolol) y el antagonista inespecífico de los receptores 5-$HT_{1/2}$ (metergolina) indujeron algunas manifestaciones somáticas que pudieran estar relacionadas con la aparición de un síndrome de abstinencia, como temblor de patas y frotamiento de la cara, mientras que los antagonistas dopaminérgicos tipo D_1 y D_2 no produjeron dichas manifestaciones. Puesto que los signos somáticos observados fueron leves, se evaluó la posibilidad de que estas alteraciones somáticas se acompañaran de alteraciones motivacionales o de un incremento del estado de ansiedad. Con este fin, se administró el antagonista que producía el máximo número de signos somáticos (metergolina) a ratones crónicamente tratados con MDMA, y se evaluaron diferentes respuestas comportamentales. En el test de aversión de plaza condicionada, no se observó la conducta de evitación al ambiente asociado con el tratamiento, indicando la ausencia de manifestaciones motivacionales aversivas. Otro paradigma que se utilizó para evaluar las propiedades disfórico-aversivas de la abstinencia a MDMA fue la interrupción de un condicionamiento operante. En este paradigma, los animales se entrenan para obtener alimento en una caja de Skinner. Una vez han aprendido la tarea, se comienza el tratamiento crónico con MDMA (10 mg/kg, i.p.) o vehículo durante 5 días, dos veces al día. Tras el desarrollo de la dependencia, el día 6 se administra metergolina y se coloca nuevamente en las cajas

para evaluar la respuesta operante. Las posibles manifestaciones motivacionales negativas de una abstinencia a MDMA se reflejarían por una supresión de dicho comportamiento operante. En estas condiciones, el tratamiento con metergolina no produjo una supresión de la conducta operante para obtener comida en animales crónicamente tratados con MDMA. La falta de efecto supresor del tratamiento con metergolina en este paradigma también sugiere una ausencia de manifestaciones disfóricas. El posible aumento de un estado de ansiedad en estos animales se evaluó utilizando el paradigma de la caja blanca y negra. Como su nombre indica, este paradigma consta de dos compartimentos: uno oscuro y pequeño y el otro blanco y muy iluminado. Este procedimiento evalúa el conflicto existente entre la capacidad exploratoria del animal y las características aversivas del compartimento fuertemente iluminado. Con este protocolo tampoco se observaron conductas de tipo ansiogénico. Estos resultados indican que los signos somáticos producidos por el bloqueo de los receptores serotoninérgicos 5-$HT_{1/2}$ en animales crónicamente tratados con MDMA no están asociados con manifestaciones disfóricas o aversivas. Por consiguiente, los procesos adaptativos que conducen a la aparición de estas manifestaciones somáticas de abstinencia a MDMA no se acompañan de las clásicas alteraciones motivacionales que caracterizan los cuadros de abstinencia a otras drogas de abuso[13].

BIBLIOGRAFÍA

1. Jansen KL. Ecstasy (MDMA) dependence. Drug Alcohol Depend 1999; 53: 121-124.
2. Benazzi F, Mazzoli M. Psychiatric illness associated with “ecstasy”. Lancet 1991; 338: 1520.
3. Cohen RS. Subjective reports on the effects of the MDMA (“ECSTASY”) experience in humans. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry 1995; 19: 1137-1145.
4. Morgan MJ, McFie L, Fleetwood LH, Robinson JA. Ecstasy (MDMA): are the psychological problems associated with its use reversed by prolonged abstinence? Psychopharmacology (Berl) 2002; 159: 294-303.
5. Hernández-López C, Farré M, Roset, PN, Menoyo E, Pizarro N, Ortuño J et al. 3,4-methylenedioxymethamphetamine (Ecstasy) and alcohol interactions in Humans: psychomotor performance, subjective effects, and pharmacodynamics. J Pharmacol Exp Ther 2002; 300: 236-244.
6. O’Shea E, Esteban B, Camarero, J, Gree AR, Colado, MI. Effect of GBR 12909 and flouxetine on the acute and long term changes induced by MDMA (extasy) on the 5-HT and dopamine contentrations in mouse brain. Neuropharmacology 2001; 40: 65-74.
7. Parrott AC. Recreational Ecstasy/MDMA, the serotonin syndrome, and serotonergic neurotoxicity. Pharmacol Biochem Behav 2002; 71: 837-844.
8. Lamb RJ, Griffiths RR. Self-injection of d,1-3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) in the baboon. Psychopharmacology (Berl) 1987; 91: 268-272.
9. Beardsley PM, Balster RL, Harris LS. Self-administration of MDMA by rhesus monkeys. Drug Alcohol Depend 1986; 18: 149-157.
10. Fantegrossi WE, Ullrich T, Rice KC, Woods JH, Winger G. 3,4-Methylenedioxymethamphetamine (MDMA, «ecstasy») and its stereoisomers as reinforcers in rhesus monkeys: serotonergic involvement. Psychopharmacology (Berl) 2002; 161: 356-364.
11. Hubner CB, Bird M, Rassnick S, Kornetsky C. The threshold lowering effects of MDMA (ecstasy) on brain-stimulation reward. Psychopharmacology (Berl) 1988; 95: 49-51.
12 Bilsky EJ, Hubbell CL, Delconte JD, Reid LD. MDMA produces a conditioned place preference and elicits ejaculation in male rats: a modulatory role for the endogenous opioids. Pharmacol Biochem Behav 1991; 40: 443-447.
13. Marona-Lewicka D, Rhee GS, Sprague JE, Nichols DE. Reinforcing effects of certain serotonin-releasing amphetamine derivatives. Pharmacol Biochem Behav 1996; 53: 99-105.
14. Robledo P, Balerio G, Maldonado R. Behavioral responses induced by acute and chronic administration of MDMA. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol (submitted)
15. White SR, Obradovic T, Imel KM, Wheaton MJ. The effects of methylenedioxymethamphetamine (MDMA, «Ecstasy») on monoaminergic neurotransmission in the central nervous system. Prog Neurobiol 1996; 49: 455-479.
16. Tanda G, Pontieri FE, Di Chiara G. Cannabinoid and heroin activation of mesolimbic dopamine transmission by a common mu1 opioid receptor mechanism. Science 1997; 276: 2048-2050.
17. Yamamoto BK, Spanos LJ. The acute effects of methylenedioxymethamphetamine on dopamine release in the awake-behaving rat. Eur J Pharmacol 1988; 148: 195-203.
18. Pontieri FE, Tanda G, Orzi F, Di Chiara G. Effects of nicotine on the nucleus accumbens and similarity to those of addictive. Nature 1996; 18: 255-257.
19. Yoshimoto K, McBride WJ, Lumeng L, Li TK. Alcohol stimulates the release of dopamine and serotonin in the nucleus accumbens. Alcohol 1992; 9: 17-22.
20. Bilsky EJ, Montegut MJ, Nichols ML, Reid LD. CGS 10746B, a novel dopamine release inhibitor, blocks the establishment of cocaine and MDMA conditioned place preferences. Pharmacol Biochem Behav 1988; 59: 215-220.
21. Bilsky EJ, Reid LD. MDL72222, a serotonin 5-HT3 receptor antagonist, blocks MDMA’s ability to esta-

blish a conditioned place preference. Pharmacol Biochem Behav 1991; 39: 509-512.
22. Fletcher PJ, Korth KM, Robinson SR, Baker GB. Multiple 5-HT receptors are involved in the effects of acute MDMA treatment: studies on locomotor activity and responding for conditioned reinforcement. Psychopharmacology (Berl) 2002; 162: 282-291.
23. Liechti ME, Vollenweider FX. Which neuroreceptors mediate the subjective effects of MDMA in humans? A summary of mechanistic studies. Hum Psychopharmacol 2001; 16: 589-598.
24. Schechter MD. Effect of MDMA neurotoxicity upon its conditioned place preference and discrimination. Pharmacol Biochem Behav 1991; 38: 539-544.
25. Xu F, Gainetdinov RR, Wetsel WC, Jones SR, Bohn LM, Miller GW et al. Mice lacking the norepinephrine transporter are supersensitive to psychostimulants. Nature Neurosci 2000; 3: 465-471.
26. Rothman RB, Baumann MH, Dersch CM, Romero DV, Rice KC, Carroll FI et al. Amphetamine-type central nervous system stimulants release norepinephrine more potently than they release dopamine and serotonin. Synapse 2001; 39: 32-41.
27. Braida D, Sala M. Role of the endocannabinoid system in MDMA intracerebral self-administration in rats. Br J Pharmacol 2002; 136: 1089-1092.
28. Spanos LJ, Yamamoto BK. Acute and subchronic effects of methylenedioxymethamphetamine [(+/-) MDMA] on locomotion and serotonin syndrome behavior in the rat. Pharmacol Biochem Behav 1989; 32: 835-840.
29. Kalivas PW, Duffy P, White SR. MDMA elicits behavioral and neurochemical sensitization in rats. Neuropsychopharmacology 1998; 18: 469-479.
30. Itzhak Y, Ali SF, Achat CN, Anderson KL. Relevance of MDMA ("ecstasy")-induced neurotoxicity to long-lasting psychomotor stimulation in mice. Psychopharmacology (Berl) 2003; 166: 241-248.
31. Callaway CW, Geyer MA. Tolerance and cross-tolerance to the activating effects of 3,4-methylenedioxymethamphetamine and a 5-hydroxytryptamine 1B agonist. J Pharmacol Exp Ther 1992; 263: 318-326.
32. Marston HM, Reid ME, Lawrence JA, Olverman HJ, Butcher SP. Behavioural analysis of the acute and chronic effects of MDMA treatment in the rat. Psychopharmacology (Berl) 1999; 144: 67-76.
33. Frederick DL, Ali SF, Gillam MP, Gosset J, Slikker W, Paule MG. Acute effects of dexfenfluramin (d-FEN) and methylenedioxymethamphetamine (MDMA) before and after short-course, high-dose treatment. Ann N Y Acad Sci 1998; 844: 138-190.
34. Taylor JR, Jentsch JD. Repeated intermittent administration of psychomotor stimulant drugs alters the acquisition of Pavlovian approach behavior in rats: differential effects of cocaine, d-amphetamine and 3,4-methylenedioxymethamphetamine («Ecstasy»). Biol Psychiatry 2001; 50: 137-143.
35. Horan B, Gardner EL, Ashby CR, Jr. Enhancement of conditioned place preference response to cocaine in rats following subchronic administration of 3, 4, methylenedioxymethamphetamine (MDMA). Synapse 2000; 35: 160-162.
36. Fletcher PJ, Robinson SR, Slippoy DL. Pre-exposure to (+/-)3,4-methylenedioxy-methamphetamine (MDMA) facilitates acquisition of intravenous cocaine self-administration in rats. Neuropsychopharmacology 2001; 25: 195-203.
37. Reneman L, Endert E, de Bruin K, Lavalaye J, Feenstra MG, de Wolff FA et al. The acute and chronic effects of MDMA («ecstasy») on cortical 5-HT2A receptors in rat and human brain. Neuropsychopharmacology 2002; 26: 387-396.
38. Fone K, Beckett IAT, Swettenham JM, Ball M, Maddocks L. Long-term changes in social interaction and reward following repeated MDMA administration to adolescent ratswithout accompanying serotonergic neurotoxicity. Psychopharmacology (Berl) 2002; 159: 437-444.
39. Maldonado R. The neurobiology of addiction. J Neural Transm, 2003 Suppl.: 1-14.

DISCUSIÓN*

M. MIQUEL: Habéis demostrado que la coadministración de un inhibidor de la recaptación de serotonina (5-HT) protege de algunos de los efectos que habéis medido en el éxtasis. Sin embargo, parece que en la calle la gente usa simultáneamente ambas sustancias. ¿Cuál sería la explicación para la toma conjunta de Prozac® y éxtasis? ¿Existe algún dato sobre una posible potenciación de los efectos euforizantes?

I. COLADO: Lo que nosotros hemos demostrado es que cuando se coadministra con el éxtasis previene los efectos a largo plazo, pero en cuanto a la prevención de los efectos agudos no tenemos ninguna evidencia experimental que pueda explicar por qué el individuo está tomando un inhibidor de la recaptación de 5-HT (IRSR) junto con el éxtasis. Nosotros sabemos que el IRSR no previene la hipertermia de la MDMA pero no sabemos si previene o no sus efectos euforizantes y reforzantes. Existe un ensayo clínico en voluntarios sanos, realizado por Vollen-

*Discusión conjunta de las ponencias de Isabel Colado (artículo anterior) y Patricia Robledo.

weider, donde un ISRS (citalopram) previene los efectos euforizantes del éxtasis. Pero se trata de estudios realizados en el laboratorio dando una dosis de éxtasis muy baja, no se corresponde con lo que está pasando en la calle. En realidad no sabemos cuál es el efecto final de la coadministración ISRS + éxtasis, supongo que el ISRS no prevendrá los efectos euforizantes del éxtasis, porque si los previniera los consumidores no se lo tomarían.

R. Maldonado: ¿Tienes datos de si dosis más elevadas en ratones son capaces de producir depleción serotoninérgica o noradrenérgica?

I. Colado: No, porque la dosis que nosotros hemos utilizado ya es lo suficientemente alta. Dosis más altas, y con este protocolo que nosotros administramos, provocaría una mortalidad muy importante. La dosis de 30 mg/kg es la dosis más alta que hemos utilizado, tres veces consecutivas cada 3 h, y, desde luego, no produce neurotoxicidad serotoninérgica, aunque no sabemos si produce neurotoxicidad noradrenérgica porque no lo hemos estudiado.

C. de Felipe: ¿Cuáles son los datos de toxicidad en humanos?

I. Colado: Los trabajos que están apareciendo en consumidores indican que lo que más se asocia con el consumo de éxtasis a largo plazo son fundamentalmente trastornos de la memoria, trastornos de la capacidad de concentración, disminución de la capacidad para desarrollar tareas que requieran un esfuerzo excesivo y, también, disminución de la capacidad de aprendizaje. Pueden aparecer cuadros depresivos, pero lo que predomina son trastornos en la memoria a largo plazo.

C. de Felipe: ¿Está demostrado que exista muerte neuronal directa?

I. Colado: No, no se ha demostrado ni en rata ni en ratón. De momento no hay nada de eso. Los estudios de inmunohistoquímica indican una pérdida del terminal, pero no del cuerpo neuronal, que parece permanecer intacto, por lo menos en la rata y en el ratón. En el mono existen algunos estudios que indican que también hay pérdida del soma. El mono es extremadamente sensible al efecto del éxtasis, mucho más sensible que la rata y el ratón.

F. Rodríguez de Fonseca: Estáis utilizando 10 mg/kg y cuatro dosis. A esa dosis que estáis discutiendo en el ratón, ¿crees que la posible contribución neurotóxica sería relevante?

I. Colado: Pues ésa era una pregunta que yo tenía para P. Robledo. Si había analizado el cerebro de esos animales y si podía separar los efectos que provoca el éxtasis sobre el comportamiento de un posible efecto neurotóxico subyacente presente tras la administración repetida de éxtasis.

P. Robledo: Sí. Justamente hemos analizado los cerebros de estos ratones y no vemos neurotoxicidad dopaminérgica en los terminales con la dosis de 10 mg/kg, una vez al día durante 4 días. Es posible que para observar la neurotoxicidad dopaminérgica se necesiten 3 dosis diarias durante 4 días o 2 dosis diarias durante 4 días y un poco más altas, tal vez de 20 o 25 mg/kg.

I. Colado: Es cierto que el intervalo de administración es muy importante.

F. Rodríguez de Fonseca: ¿Sabes si a estas dosis alguien ha realizado algún estudio sobre la inducción de un perfil ansiogénico por parte del éxtasis? Lo comento porque los ISRS podrían ayudar a disminuir esa posible ansiedad inducida y podrían funcionar como unos ansiolíticos adecuados para evitar un posible efecto agudo durante unas dosis de carga. Ésta es una posibilidad que no sé si habéis valorado.

I. Colado: Pues la verdad es que no sabría qué contestarte. Sé que se ha realizado algún estudio al respecto, pero no te sabría decir el resultado.

P. Robledo: En ratones es variable, porque parece ser que las dosis bajas son ansiogénicas y las altas son ansiolíticas. Pero nosotros tenemos resultados contrarios a éstos en ratones. Existen estudios en ratas que muestran que MDMA puede ser ansiogénica.

R. Moratalla: ¿Existe alguna vulnerabilidad selectiva de las terminales dopaminérgicas, TH, en el estriado con el MDMA? Porque el transportador de la dopamina se concentra más en la matriz que en los estriosomas. Si los bloqueadores del transportador inhiben la neurotoxicidad, tendrías que ver también que distintas zonas del estriado, como la matriz y los estriosomas, tienen distinta vulnerabilidad. Esto en cuanto a las terminales dopaminérgicas en el estriado, lógicamente también se debería reflejar, a más largo plazo, en la sustancia negra.

I. Colado: No, nosotros no lo hemos hecho y no hay ningún estudio descrito en el ratón al respecto. Lo único que sabemos es que el bloqueador del transportador previene la toxicidad porque está previniendo la entrada en el terminal de un metabolito tóxico del éxtasis, no del éxtasis. De tal manera que si nosotros administramos directamente la droga en el cerebro de la rata, por ejemplo, no hay ningún signo de neurotoxicidad, lo que indica que necesita el metabolismo a nivel periférico para ser tóxica.

R. MORATALLA: Porque, por ejemplo, con 1-metil-4-penil-1,2,3,6-tetrahidropiridina sí que se ha observado que existe distinta vulnerabilidad en distintas zonas del estriado. Con respecto a la matriz se mueren antes los terminales que están en la matriz y perduran más los terminales que están en los estriosomas.

I. COLADO: En el ratón no existe ningún estudio al respecto.

S. ABANADES: Con respecto a lo que se ha dicho del artículo de Vollenweider en la interacción de éxtasis y citalopram en humanos, en nuestro grupo tenemos un estudio realizado en este mismo sentido con paroxetina y MDMA. Sin estar publicados todavía los resultados, podemos decir que son parecidos a los del grupo de Wollenweider, en el sentido de que tanto los efectos fisiológicos como el refuerzo producidos por MDMA se reducen notablemente en la interacción con paroxetina. En cuanto a la explicación de que los usuarios tomen ISRS junto con éxtasis, según opiniones de los propios usuarios, podría ser para reducir los efectos colaterales de la administración de éxtasis, como son la tensión mandibular, la taquicardia o la hipertensión arterial. Sin embargo, no es una práctica que se realice habitualmente, debido a que precisamente los efectos subjetivos que buscan, las sensaciones placenteras, se reducen notablemente con esa práctica.

X. CODONY: Con relación al tema de la toxicidad, y teniendo en cuenta que parece que la fluoxetina actúa de inmediato, cosa que para la actividad antidepresiva no es así, ya que necesita cierto tiempo, ¿hasta qué punto el receptor sigma podría tener un papel para el cual la fluoxetina tiene afinidad? Ligandos de ese receptor han demostrado actividad neuroprotectora. Y ligado a esto, ¿se sabe si otros moduladores serotoninérgicos que no sean los inhibidores de la recaptación, como agonistas, tienen el mismo efecto que la fluoxetina?

I. COLADO: No sé si existe algún trabajo descrito en la literatura utilizando otros agonistas o antagonistas. Creo recordar que algún antagonista serotoninérgico se mostraba como neuroprotector frente a la neurotoxicidad de MDMA, pero tampoco sé muy bien si se ha comprobado el efecto que estos compuestos provocan sobre la hipertermia de la MDMA. Porque todo lo que previene la hipertermia de la MDMA es protector *per se*, o por lo menos reduce mucho la toxicidad a largo plazo. Lo que preguntas no te lo puedo contestar, porque no sé hasta qué punto existe algún estudio fiable en ese sentido. Respecto a la relación fluoxetina-receptores sigma, nosotros no hemos comprobado nada de eso. Lo que sí sabemos, desde luego, es que inmediatamente después de la administración de MDMA se produce un incremento masivo en la liberación de 5-HT en diferentes estructuras cerebrales. Y si hemos administrado previamente fluoxetina, esa liberación de 5-HT se reduce. Existe otro ISRS (fluvoxamina) que se comporta de manera similar a la fluoxetina frente a los efectos inmediatos y a largo plazo que produce el éxtasis. Parece, por tanto, que el efecto de estos inhibidores frente a la toxicidad de MDMA está relacionado con su capacidad para bloquear el transportador de 5-HT. En cualquier caso, la posible interacción de fluoxetina con el receptor sigma no la hemos investigado.

Neuroadaptaciones producidas por el consumo y la abstinencia de cocaína

E. Ambrosio Flores

Departamento de Psicobiología, Universidad Nacional de Educación a Distancia (UNED), Madrid.

Introducción

Aunque el abuso de opiáceos y de alcohol puede ser tratado parcialmente con algunos fármacos, lamentablemente no existen tratamientos eficaces de este tipo para el abuso de cocaína y otras drogas psicoestimulantes. Además, nos encontramos con el problema crónico de la recaída en el consumo de estas drogas. Ello plantea la necesidad de: *a)* instituir programas de prevención del abuso de drogas que resulten más efectivos, y *b)* conocer mejor los mecanismos de acción de estas sustancias, con la esperanza de elaborar fármacos que puedan ayudar a la recuperación de los pacientes. A este respecto, hasta la fecha se conoce que las acciones de la cocaína sobre el sistema nervioso se ejercen a través de varios mecanismos: *a)* bloqueando los canales de Na+ dependientes de voltaje, donde se derivan las propiedades de la cocaína como anestésico local; *b)* inhibiendo la recaptación de dopamina, serotonina y noradrenalina, a través del bloqueo competitivo de sus transportadores en esos terminales monoaminérgicos; *c)* actuando presinápticamente sobre el transportador vesicular de la dopamina, localizado en los terminales nerviosos mesolímbicos y nigroestriales, que se encarga de almacenar la dopamina del citoplasma previamente sintetizada y/o la dopamina recaptada desde el espacio sináptico, y *d)* a través de su afinidad por sitios de unión de receptores como los receptores serotoninérgicos, receptores muscarínicos M1 y M2 y receptores sigma.

La cocaína tiene también propiedades simpaticomiméticas que parecen ser debidas a sus efectos sobre la noradrenalina en los terminales posganglionares del sistema nervioso autónomo, rama simpática, produciendo un aumento de la frecuencia cardíaca, vasocontricción de arteriolas y venoconstricción de venas a través del músculo liso vascular, intensa midriasis por contracción del músculo radial, aumento de las secreciones salivar, gástrica y pancreática, e intensa sudoración. A su vez, esta activación noradrenérgica sería la responsable del aumento de la presión arterial y de la vigilancia, por su efecto sobre el *locus coeruleus.*

Numerosos datos en la literatura científica sugieren que las acciones de la cocaína sobre la dopamina parecen ser fundamentales en las propiedades psicomotoras, euforizantes y reforzantes de la droga en sujetos no modificados genéticamente. Esta observación está apoyada por el hecho de que la potencia de drogas del tipo de la cocaína como reforzadores positivos correlaciona con su potencia como inhibidores de la recaptación de la dopamina, pero no con la potencia como inhibidores de serotonina o noradrenalina[1]. Sin embargo, se ha comprobado recientemente que, en ratones desprovistos del gen del transportador de dopamina, la función de la serotonina en las acciones reforzantes positivas de la cocaína puede ser relevante[2].

Desde un punto de vista neuroanatómico, la mayoría de las acciones de la cocaína que impliquen aspectos reforzantes y psicomotores parecen deberse a la acción de la cocaína sobre un circuito o un sistema específico: el circuito mesocorticolímbico dopaminérgico. El consumo crónico de la cocaína parece alterar este circuito generando modificaciones en la actividad de poblaciones neuronales, en la regulación receptores de neurotransmisores[3], adaptaciones moleculares en las vías moleculares de transducción de señales y en la regulación de la expresión génica[4]. Se cree que estos cambios podrían estar relacionados con el deseo intenso por el consumo de la droga y su búsqueda, y con el desarrollo de fenómenos de tolerancia y sensibilización. No obstante, aunque en las últimas tres décadas la investigación sobre los mecanismos de acción de la cocaína se ha centrado sobre todo en el sistema dopaminérgico, al que se le considera el sistema homólogo,

esta droga también actúa sobre otros muchos sistemas de neurotransmisores de los que los datos más abundantes se refieren al serotoninérgico, noradrenérgico, opioidérgico, glutamatérgico, gabaérgico y al del neuropéptido CRF *(corticotropin releasing factor).* Más adelante comentaremos nuestros resultados sobre algunos de estos sistemas heterólogos, pero antes nos referiremos a los posibles mecanismos que están operando en las recaídas en el consumo de cocaína.

Mecanismos implicados en las recaídas en el consumo de cocaína

Uno de los aspectos más difíciles del tratamiento de las adicciones a drogas es el problema de las recaídas. El intenso deseo por consumir la droga y el uso compulsivo de ésta son dos importantes características que acompañan al fenómeno de las recaídas en el consumo de cocaína. Aunque se desconocen los mecanismos neurobiológicos de las recaídas en la adicción a esta y a otras sustancias, se acepta generalmente que los mismos sistemas neurales implicados en los efectos reforzantes de las drogas están también implicados en las recaídas, ya que la conducta de búsqueda de la droga es común a ambos procesos. Existen, sin embargo, dos teorías que son opuestas en sus predicciones sobre las recaídas.

Un grupo de teorías sostiene que la recaída se inicia a partir de la activación de los sistemas de refuerzo, tal y como ocurre con la administración aguda de la droga. Son teorías que mantienen la existencia de un proceso proponente como explicación de la recaída[5-8]. Otro grupo de teorías sugiere la existencia de un proceso opuesto (oponente) al ocasionado por la administración aguda de la droga. Este proceso produciría una hipofuncionalidad en los sistemas de refuerzo que se traducirían en estados disfóricos durante la retirada de la droga[9]. Así, la búsqueda de la droga sería una necesidad para aliviar el estado de malestar producido por la ausencia de la droga. Ambas teorías, de proceso oponente y de proceso proponente, tienen dificultades para explicar fenómenos diversos. La teoría del proceso oponente, por ejemplo, no explica ciertas evidencias que se enumeran a continuación:

1. Los períodos de máxima autoadministración de la droga no coinciden con los de máxima disforia como consecuencia de la abstinencia. Esto es, existe muy baja relación entre los efectos de la retirada en sí misma y la búsqueda de droga para un amplio número de sustancias[10].

2. Existen numerosos informes médicos y científicos que indican que el alivio de los efectos de la abstinencia es un método poco efectivo en el tratamiento de la adicción.

Existe una gran probabilidad de que se produzca la recaída en el consumo de la droga después de haber pasado un largo periodo sin que haya habido consumo.

Verdaderamente, se desconoce si los estímulos condicionados asociados previamente con los efectos de la retirada de la droga son los que en definitiva producen nuevamente el reinicio del consumo. Así, parece que hay una escasa correlación entre el deseo intenso por la droga y los efectos de retirada de ésta[7].

3. Se ha comprobado que en los informes subjetivos de cocaína y otras drogas dicho deseo es a menudo más alto después de la administración de la droga, cuando ésta está produciendo efectos placenteros subjetivos, que cuando los síntomas de la abstinencia de la droga han sido eliminados o se encuentran muy reducidos.

4. Los animales se autoadministran directamente en regiones cerebrales una serie de drogas que no producen síntomas de abstinencia[11]. Sin embargo, la administración pasiva de la droga en estas regiones a animales que han extinguido su respuesta para la administración intracraneal de la droga reinstaura de nuevo la respuesta[5].

Estos datos sugieren la existencia de un mecanismo de búsqueda de drogas (motivación de incentivo) independiente de un reforzamiento negativo. En conjunto, las evidencias señaladas parecen indicar que las dos características más importantes de la adicción, el deseo intenso por su consumo y la probabilidad de recaída en éste no parecen estar relacionadas exclusivamente con un intento de escapar de las consecuencias aversivas de la abstinencia. Estos dos factores pudieran motivar episódicamente la búsqueda y consumo de la droga, e incluso aumentar sus efectos reforzantes, pero no serían las únicas causas, ni las causas primarias del deseo intenso por la droga y su consumo compulsivo[12].

Por su parte, en cuanto a la teoría del proceso proponente, existen datos que no están en la línea de una teoría del reforzamiento positivo. Además, en los postulados de esta teoría acordes con planteamientos de reforzamiento positivo está implícita la confusión del término reforzamiento positivo con estados centrales subjetivos afectivos, provocados por el consumo de la droga y experimentados como positivos por el sujeto. De hecho, se confunde el efecto con su explicación.

Las principales críticas a la identificación del reforzamiento positivo de la droga con un estado subjetivo hedónico se detallan a continuación:

1. Existen drogas psicoestimulantes, como la nicotina, que no producen euforia y, sin embargo, tienen un potencial adictivo alto[13]. Además, el inicio en el consumo puede producir más bien estados disfóricos y, a pesar de que su consumo prolongado conlleva consecuencias negativas, el deseo intenso y el consumo de la droga se mantienen. Si el consumo de la droga se mantuviese por simples contingencias de reforzamiento, la autoadministración de la droga se extinguiría, pero usualmente esto no ocurre[14].

2. El estado placentero que una droga pueda producir cuando es administrada de forma aguda no parece existir cuando el sujeto se expone a estímulos ambientales asociados a su consumo, los cuales sí parecen producir un intenso deseo por volver a consumirla. Estos hechos apoyan una disociación entre los estados placenteros inducidos por la administración aguda de la droga y el deseo de su consumo[15,16]. Sin embargo, no se ha de descartar una asociación entre el deseo intenso por la droga y algún tipo de "memoria explícita" que guarde experiencias de carácter placentero asociadas con el consumo pasado de la droga.

3. Los humanos se autoadministran dosis bajas de drogas a pesar de que no causan efectos placenteros conscientes. Este hecho se ha observado con cocaína[17], pero también con opiáceos[18].

Existen otros datos que encuentran escasa relación entre el reforzamiento producido por la droga y estados subjetivos placenteros[14,19] . Esto ha llevado a sugerir la existencia de distintos sistemas neurales en la mediación de los efectos subjetivos producidos por la droga y su actuación como reforzador positivo[20,21]. En conjunto, estos datos dan idea de la dificultad de mantener la existencia de una teoría de proceso proponente u oponente que se base en las consecuencias subjetivas afectivas producidas por la autoadministración o la abstinencia de las drogas[7]. Pero, por otro lado, ambas teorías mantienen que más que la posible influencia de estados subjetivos en las recaídas, es probable la existencia de neuroadaptaciones a largo plazo inducidas por la droga en los sistemas de recompensa cerebral, lo cual explicaría que la búsqueda de la droga y el deseo siguen persistiendo aún transcurrido un periodo largo de tiempo. La administración crónica de la droga podría producir dos tipos de cambios neuroadaptativos. El primero de éstos sería consecuencia de los efectos farmacológicos directos de la droga. Este tipo de neuroadaptaciones produciría tolerancia a los efectos fisiológicos. Desde un punto de vista motivacional, neuroadaptaciones similares a las fisiológicas podrían participar en el desarrollo de tolerancia a los efectos reforzantes de las drogas y producir consecuencias aversivas durante su abstinencia. En este caso, se daría un proceso oponente. Inversamente, los efectos farmacológicos directos de una administración crónica de drogas pudieran también producir procesos proponentes, tales como sensibilización de la respuesta celular a los neurotransmisores (homólogos y heterólogos de la cocaína), los cuales podrían incrementar la propia sensibilidad a los efectos reforzantes de las drogas[3,22,23]. Un segundo cambio neuroadaptativo sería consecuencia de las fuertes asociaciones que se forman entre los efectos reforzantes de las drogas y los estímulos ambientales asociados al consumo de éstas. De este modo, estímulos en un principio neutrales adquieren la habilidad de provocar respuestas similares a las que se producen en sujetos adictos, tanto en presencia de la droga como en su ausencia[16,24]. Ante la presentación de tales estímulos, que pueden causar bien una suave euforia o bien una intensa disforia, los sujetos muestran un intenso deseo por volver a administrarse la droga.

Dado que, como acabamos de ver, las teorías actuales sobre los mecanismos que parecen estar operando en las recaídas en la adicción a cocaína mantienen que un factor muy importante en ese fenómeno puede ser la existencia de neuroadaptaciones a largo plazo, en las páginas siguientes comentaremos los resultados obtenidos por nuestro grupo sobre posibles cambios neuroadaptativos que se producen en diversos sistemas de neurotransmisores tras la autoadministración de cocaína y la extinción de esa conducta en ratas de laboratorio.

Neuroadaptaciones producidas tras la extinción de la conducta de autoadministración de cocaína

Combinando la metodología de la autoadministración intravenosa de drogas (el mejor modelo animal para estudiar directamente los efectos reforzantes positivos de las drogas) con las de autorradiografía cuantitativa de receptores y de histoquímica por hibridación *in situ*, hemos analizado si el consumo crónico de cocaína y su abstinencia puede conllevar neuroadaptaciones en algunos elementos reguladores de la transmisión del sis-

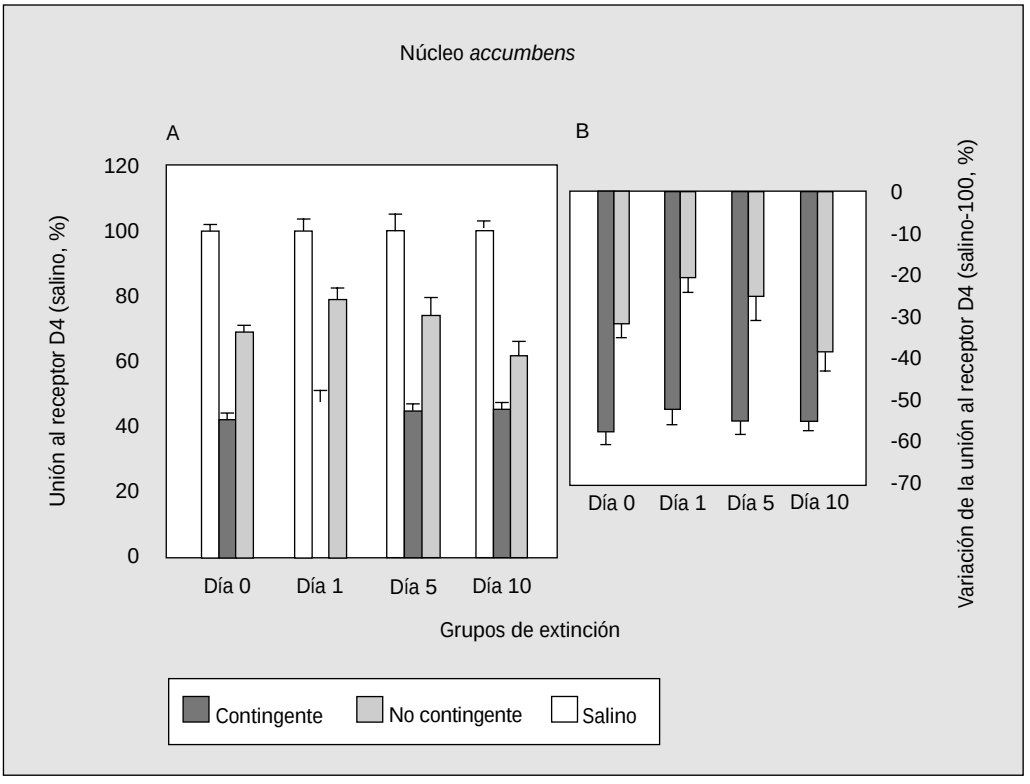


Fig. 1. Valores de la unión al receptor D4 en el núcleo accumbens *durante la autoadministración y extinción de esta conducta. Los valores están representados como porcentaje respecto al salino.*

tema homólogo de la cocaína (el dopaminérgico) y otros sistemas heterólogos, como el glutamatérgico, el opioidérgico y el del neuropéptido CRF.

El objetivo esencial de estos estudios ha sido conocer más acerca de posibles factores de tipo endógeno que pueden participar en las recaídas en la adición a la cocaína. A tal fin, hemos aplicado en nuestro trabajo un diseño de tríadas para estimar la influencia de factores cognitivos y farmacológicos en la abstinencia de cocaína. Concretamente, se han estudiado simultáneamente tres tipos de animales: uno, que se autoadministra la droga "sabiendo" que puede obtenerla realizando un comportamiento (en nuestro caso apretar una palanca) y que, por tanto, regula su comportamiento de ingesta (sujeto contingente); otro, emparejado con el anterior, que recibe la droga de forma pasiva, porque el ordenador pone en marcha automáticamente la bomba de inyección cuando el animal que se autoadministra lo hace (sujeto no contingente), y un tercero, emparejado también con el contingente, que recibe suero salino (salino) cuando el contingente se autoadministra cocaína. Este último sujeto hace de control de la situación experimental en la que los otros dos se someten a los efectos de la cocaína. Este diseño nos permite tener una estimación de la influencia de las "expectativas" de los animales que pueden buscar y conseguir la droga, en contraposición a los que reciben la droga de forma pasiva y no tienen comportamiento de búsqueda. En las figuras 1-6 se presentan resultados representativos de nuestros hallazgos sobre las neuroadaptaciones inducidas por la cocaína en los sistemas dopaminérgico, glutamatérgico, opioidérgico y de CRF en los mismos animales que recibieron la droga siguiendo el diseño experimental anteriormente descrito.

En lo que se refiere a los receptores del sistema dopaminérgico, no encontramos cambios significativos en los del subtipo D1, pero sí en todos los de la familia D2 en regiones del cerebro ante-

rior, como la corteza prefrontal, el núcleo *accumbens* en sus divisiones Core y Shell, el tubérculo olfatorio y la corteza piriforme. En la figura 1 se presentan resultados del subtipo D4 en el núcleo *accumbens*[25]. En el resto de las figuras presentamos también solamente datos del núcleo *accumbens*, con el fin de que sea más fácil la comparación entre los distintos sistemas de neurotransmisores estudiados. No obstante, es preciso decir que se han analizado otras muchas regiones cerebrales, si bien el patrón que se muestra en el núcleo *accumbens* es representativo de lo que ocurre en otras regiones del cerebro anterior. En la figura 2 mostramos los resultados hallados con el transportador de dopamina. En la figura 3 se presentan datos del sistema glutamatérgico, concretamente del subtipo NMDA[25] y, en la figura 4, resultados de la expresión génica de la subunidad NMDAR1 del receptor NMDA[26]. En la figura 5 mostramos datos referidos a la expresión génica de proencefalina[27] y, por último, en la figura 6, presentamos los resultados obtenidos cuando hemos analizado la expresión génica de CRF1 en el núcleo paraventricular del hipotálamo[28] (la región cerebral donde mayoritariamente se sintetiza este neuropéptido).

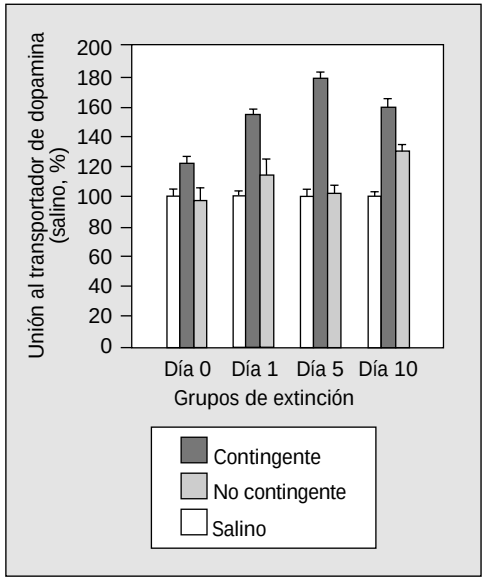


Fig. 2. Valores de la unión al transportador de dopamina en el núcleo accumbens *durante la autoadministración y extinción de esta conducta. Los valores están representados como porcentaje respecto al salino.*

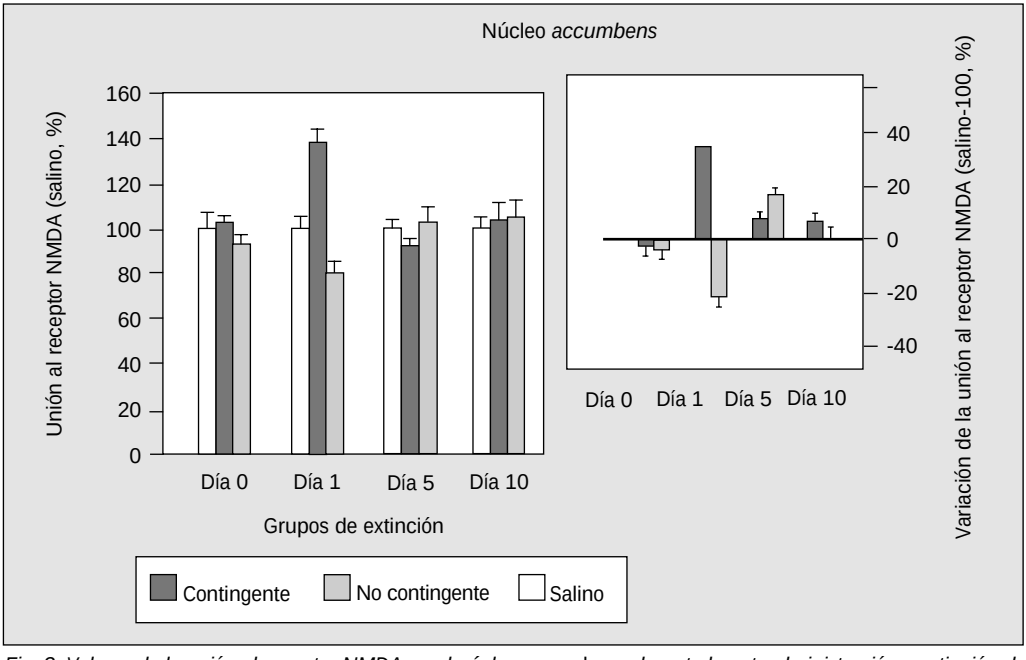


Fig. 3. Valores de la unión al receptor NMDA en el núcleo accumbens *durante la autoadministración y extinción de esta conducta. Los valores están representados como porcentaje respecto al salino.*

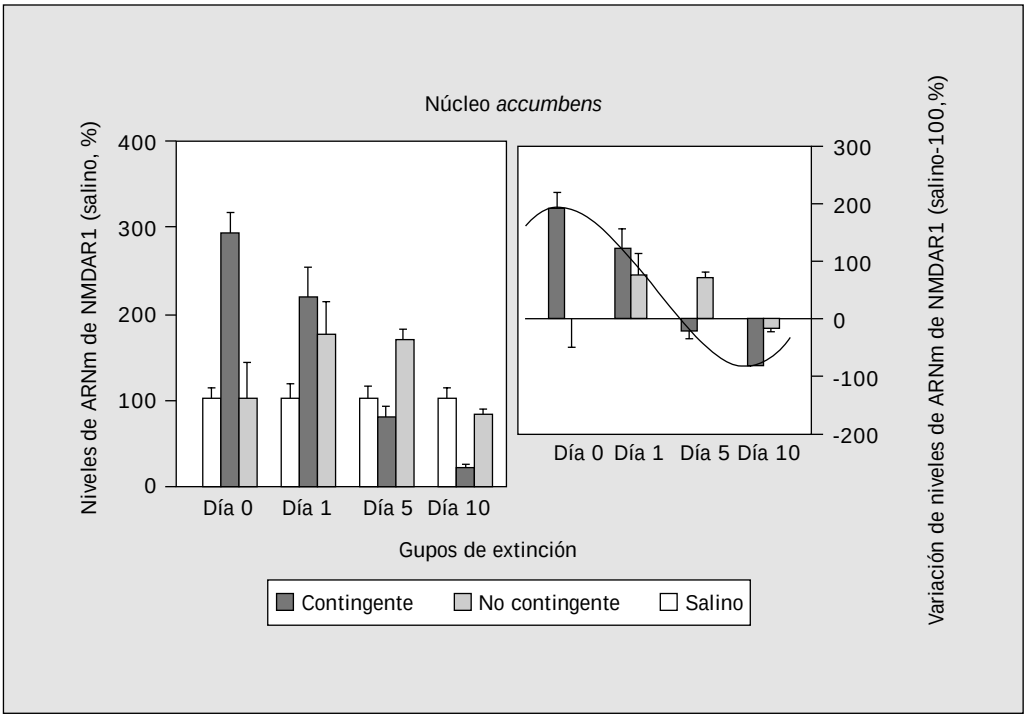


Fig. 4. Valores de la expresión génica de la subunidad de NMDAR1 en el núcleo accumbens *durante la autoadministración y extinción de esta conducta. Los valores están representados como porcentaje respecto al salino.*

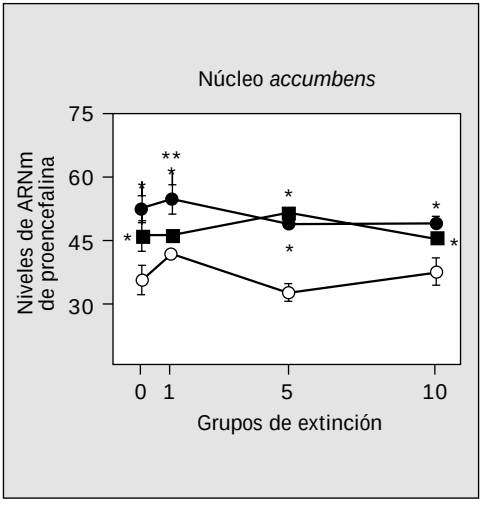


Fig. 5. Valores de la expresión génica de proencefalina en el núcleo accumbens *durante la autoadministración de cocaína y su extinción.*

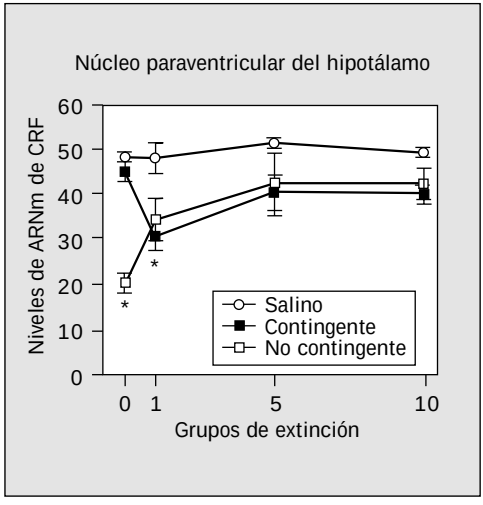


Fig. 6. Valores de la expresión génica de CRF en el núcleo accumbens *durante la autoadministración de cocaína y su extinción.*

Dado que en estos estudios hemos empleado secciones cerebrales de los mismos sujetos experimentales, una visión en conjunto de estos resultados nos permite realizar una serie de observaciones, comentadas a continuación.

Conclusiones

Globalmente, interpretamos que nuestros datos reflejan, en primer lugar, que existen cambios neuroadaptativos en todos los sistemas de neurotransmisores estudiados, ya sea en unos casos en la unión a los receptores de la familia D2 dopaminérgicos y de NMDA, ya sea en el contenido de ARNm de neuropéptidos, como la proencefalina y CRF, o en el de la subunidad NMDAR1 del receptor NMDA, como consecuencia de la administración y retirada de cocaína. En segundo lugar, esos datos también sugieren que factores cognitivos como "las expectativas" de los sujetos ante la posibilidad de conseguir la droga son aspectos importantes que deben considerarse, puesto que en aquellos animales que "saben" qué hacer para buscar y conseguir la droga (los del grupo contingente) los cambios neuroadaptativos son más acusados y muestran claras diferencias respecto a los otros grupos. En tercer lugar, comparando los hallazgos de los receptores dopaminérgicos y glutamatérgicos, los cambios neuroadaptativos son más duraderos y mantenidos en el sistema dopaminérgico, lo cual sugiere que en los efectos de la abstinencia de cocaína a medio y largo plazo parecen participar más esos elementos neurales del sistema dopaminérgico que los del glutamatérgico. No obstante, esos receptores glutamatérgicos pueden ser importantes en la fase de retirada temprana de cocaína, dada la importancia del sistema glutamatérgico en procesos de aprendizaje. Concretamente, esos datos sugieren que el ambiente estimular asociado a la administración contingente y no a otro tipo de administración puede aumentar la unión a los receptores glutamatérgicos del subtipo NMDA. En cuarto lugar, también pensamos que la expresión génica de subunidades del sistema glutamatérgico o de neuropéptidos, como los opioides y el CRF, también varía en función del ambiente estimular asociado a la administración contingente de la droga, si bien las neuroadaptaciones producidas en el sistema de CRF son transitorias. Por último, todos estos resultados sugieren que aquellos fármacos y/o tratamientos que tengan potencialidad de ser útiles en la terapia de las recaídas en la adicción a la cocaína deben diseñarse teniendo presente que se producen neuroadaptaciones simultáneas y duraderas en distintos elementos reguladores de la comunicación química de diversos sistemas de neurotransmisores.

BIBLIOGRAFÍA

1. Ritz MC, Lamb RJ, Goldberg SR, Kuhar MJ. Cocaine receptors on dopamine transporters are related to self-administration of cocaine. Science 1987; 237: 219.
2. Rocha BA, Fumagalli F, Gainetdinov RR, Jones SR, Ator R, Giros B. Cocaine self-administration in dopamine transporter knocknout mice. Nature Neurosci 1998; 1: 132-137.
3. White FJ, Hu X-T, Zhang X-F, Wolf ME. Repeated administration of cocaine or amphetamine alters neuronal responses to glutamate in the mesoaccumbens dopamine system. J Pharmacol Exp Ther 1995; 273: 445-454.
4. Fitzgerald LW, Nestler EJ. Cocaine regulation of signal transduction of pathways. En: Hammer RP, eds. Neurobiology of Cocaine. USA: CRC Press Inc., 1995; 225-246.
5. Stewart J, De Wit H, Eikelboom R. Role of unconditioned and conditioned drug effects in the self-administration of opiate and stimulants. Psychol Rev 1984; 91: 251-268.
6. Wise RA, Bozarth MA. A psychomotor stimulant theory of addiction. Psychol Rev 1987; 94: 469-492.
7. Robinson TE, Berridge KC. The neural basis of drug craving: an incentive-sensitization theory of addiction. Brain Res Rev 1993; 18: 247.
8. Self DW, Nestler EJ. Molecular mechanisms of drug reinforcement and addiction. Annu Rev Neurosci 1995; 18: 463-495.
9. Koob GF, Le Moal M. Drug abuse: hedonic homeostatic dysregulation. Science. 1997; 278: 52-58.
10. Jaffe JH. Current concepts of addiction. En: O'Brien CP, Jaffe JH, eds. Addictive States. Nueva York: Raven Press, 1992; 1-21.
11. Wise RA, Hoffman DC. Localization of drug reward mechanisms by intracranial injections. Synapse 1992; 10: 247-263.
12. Schuster C. Drug-seeking behavior: implications for theories of drug dependence. En: Edwars G, Lader M, eds The nature of drug dependence. Nueva York: Oxford, 1990; 171-193.
13. Robinson JH, Pritchard WS. The meaning of addiction: reply to West. Psychopharmacol (Berl) 1992; 108: 411-416.
14. Falk JL, Dews PB, Schuster CR. Commonalities in the environmental control of behavior. En: Levison PK, Gerstein DR, Maloff DR, eds. Commonalities in Substance Abuse and Habitual Behavior. Lexington, M.A.: D.C. Heath & Co., 1993; 47-110.
15. Childress AR, McLellan AT, Ehrman R, O'Brien CP. Classically conditioned responses in opioid and cocaine dependence: a role in relapse? NIDA Res Monogr 1988; 84: 25-43.
16. O'Brien CP, Childress AR, McLellan AT, Ehrman R. A learning model of addiction. En: O'Brien CP, Jaffe

JH, eds. Addictive States. Nueva York: Raven Press, 1992; 157-177.
17. Fischman MW, Foltin RW. Self-administration of cocaine by humans: a laboratory perspective. En: Bock GR, Whelan J, eds. Cocaine: Scientific and Social Dimensions. CIBA Foundation Symposium n.º 166. Wiley, Chichester, UK, 1992; 166: 165-180.
18. Lamb RJ, Preston KL, Schindler C, Meisch RA, Davis F, Katz JL et al. The reinforcing and subjective effects of morphine in post-addicts: a dose-response study. J Pharmacol Exp Ther 1991; 259: 1165-1173.
19. Katz JL, Goldberg SR. Preclinical assessment of abuse liability of drugs. Agents Actions 1988; 23: 18-26.
20. White N, Sklar L, Amit Z. The reinforcing action of morphine and its paradoxical side effect. Psychopharmacol (Berl) 1977; 52: 63-66.
21. Martin GM, Bechara A, Van der Kooy D. The perception of emotion: parallel neural processing of the affective and discriminative properties of opiates. Psychobiol 1991; 19: 147-152.
22. Henry DJ, White FJ. Repeated cocaine administration causes persistent enhancement of D1 dopamine receptor sensitivity within the rat nucleus accumbens. J Pharmacol Exp Ther 1991; 258: 882.
23. Carlezon WA Jr, Boundy VA, Haile CN, Lane SB, Kalb RG, Neve RL et al. Sensitization to morphine induced by viral-mediated gene transfer. Science 1997; 277: 812-814.
24. Wikler A. Dynamics of drug dependence. Implications of a conditioning theory for research and treatment. Arch Gen Psychiatry 1973; 28: 611-616.
25. Ambrosio E, Crespo JA. Neuroadaptative changes in dopaminergic and glutamatergic system during cocaine withdrawal. En "Recent advances in the neurobiology of drug addiction". 6th Internet World Congress for Biomedical Sciences-INABIS 2000. Editado por Internet Association for Biomedical Sciences. p. 4, ponencia número 25.
26. Crespo JA, Oliva JM, Ghasemzadeh MB, Kalivas PW, Ambrosio E. Neuroadaptative changes in NMDAR1 gene expresión after extinction of cocaine self-administration. Ann NY Acad Sci 2002; 965: 1-14.
27. Crespo JA, Manzanares J, Oliva JM, Corchero J, Palomo T, Ambrosio E. Time course of extinction from cocaine self-administration differentially regulates proenkephalin gene expression in rat brain. Neuropsychopharmacology 2001; 25(2): 185-194.
28. Crespo JA, Manzanares J, Oliva JM, Corchero J, García-Lecumberri C, Ambrosio E. Extinction of cocaine self-administration produces alterations in corticotropin releasing factor gene expression in paraventricular nucleus of the hypothalamus. Mol Brain Res 2003; 117: 160-167.

DISCUSIÓN

F. Rodríguez de Fonseca: Tengo una pregunta con respecto al CRF hipotálamo, ya que nosotros también observamos una disociación muy clara entre el núcleo paraventricular y el central. ¿Vosotros no habéis observado la zona del núcleo central o la zona del núcleo del lecho de la estría terminal?

E. Ambrosio: No lo hemos analizado en estas zonas.

F. Rodríguez de Fonseca: Te lo digo porque si te interesa creo que es muy importante, sobre todo con vistas a los efectos adaptativos de los ciclos repetitivos de abstinencia. Hay claramente un gradiente lateromedial, y rostro caudal, en los cambios en la expresión del RNA mensajero y del propio tejido, en relación con las experiencias agudas y las experiencias crónicas de la abstinencia. Van en direcciones completamente opuestas. En el núcleo del lecho de la estría terminal lo observas perfectamente en el gradiente lateromedial y núcleo central frente a núcleo paraventricular. La caída del RNA mensajero posiblemente puede estar asociada al cambio de secreción de glucocorticoides, que no sé si la habéis observado, pero que durante el periodo de abstinencia posiblemente en el animal contingente se incremente bastante. En todos los modelos que se han realizado, al menos desde el núcleo central de la amígdala, existe una liberación asociada a la abstinencia.

E. Ambrosio: Lo que ocurre es que esos estudios se han realizado fundamentalmente por microdiálisis. Pero aquí estamos haciendo un estudio *in vitro* y después de periodos muy prolongados de autoadministración.

F. Rodríguez de Fonseca: Estoy hablando de los estudios de microdiálisis por períodos muy prolongados de autoadministración y también acompañados de administraciones de RNA mensajero. Datos que a lo mejor no han aparecido en la publicación, pero que están hechos. Comentar que el gradiente en el núcleo del lecho de la estría terminal, que es una estructura muy interesante porque en ella también, como pasa con el núcleo *accumbens* en el núcleo vasolateral de la amígdala, existe una confluencia de muchísimas otras áreas cerebrales. Por otro lado, una cosa que es muy llamativa es que en humanos sí que está descrita claramente la re-

ducción del receptor D2 prácticamente para todas las drogas de abuso. He observado que en el sur de España, donde existe un gran consumo de cocaína, hablando con los farmacéuticos, es curioso que ahora se está utilizando olanzapina, lo mismo que clozapina, para el tratamiento de la cocaína, de manera puramente empírica por parte de las familias o del propio adicto. No sé si tienes algún comentario a este respecto, pero es que en tu lista no aparecía y me parece que es muy llamativa la cantidad de estos antagonistas dopaminérgicos atípicos que se están vendiendo.

E. AMBROSIO: No se han realizado estudios serios con olanzapina, a doble ciego. Y lo que dices es curioso porque la olanzapina precisamente se une con cierta preferencia al receptor D4 de la dopamina. Si estos datos pudieran de alguna manera ser comparados con lo que ocurre en humanos, quizás esas personas tendrían en teoría una reducción importante de ese receptor, del D4, precisamente la principal diana de ese fármaco.

R. MALDONADO: Me parece muy interesante la selectividad del cambio que tenéis tan sólo en los animales contingentes en las diferentes poblaciones de los receptores D2 y en el transportador. ¿Habéis evaluado algún otro estímulo, alguna otra droga? Porque esto lo primero que lleva a pensar es que es debido exclusivamente al incentivo o a la búsqueda de la droga. Posiblemente cualquier otro comportamiento instrumental, con un incentivo tan potente como la cocaína, a lo mejor también produce el mismo cambio. ¿Habéis comprobado el efecto de otras drogas o simplemente un estímulo natural como puede ser la realización de un comportamiento instrumental para buscar comida?

E. AMBROSIO: No, pero sería interesante. El problema es que este tipo de estudios son enormemente trabajosos. Solamente obtener esos animales nos ha costado 4 años, y luego la cuantificación de los estudios lleva un trabajo importante. Pero sí, estamos pensando hacerlos con otras drogas, emplear bolitas de comida como refuerzo, etc.

E. PORTILLO: Iba a comentar lo mismo que ha dicho R. Maldonado. Me ha llamado mucho la atención esa diferencia tan brutal simplemente por el hecho de recibir la droga no contingentemente.

E. AMBROSIO: Pues esto va en la línea de lo que ha comentado F. Rodríguez sobre la importancia de la cognición: cómo la cognición es capaz de afectar a la neuroquímica.

M. MIQUEL: Hace unos años se publicó en un trabajo de microdiálisis que para la liberación de dopamina que la anfetamina induce se producía algo parecido. La máxima liberación la produce la administración contingente de anfetamina, pero no la forzada por el investigador, que es mucho más reducida.

E. PORTILLO: ¿No puede haber algún tipo de explicación menos “abstracta” que la importancia de la cognición?

F. RODRÍGUEZ DE FONSECA: No es abstracta, es un ejemplo del concepto de lo que es motivación. Motivación es guiar la conducta hacia un propósito, eso significa poner todos tus sistemas cerebrales hacia la conducta que estás ejecutando, por tanto el resultado que obtienes, es decir, la respuesta, el refuerzo, es algo que tiene toda una planificación, unas expectativas, un resultado, una evaluación y eso es predecible. Lo no contingente no es predecible y no es esperable, y quizás podrías cambiar el diseño con una “tetra” de las que estábamos comentado ahora añadiendo un cuarto grupo en el cual apareciera un individuo en su caja, al cual la luz se le enciende contingente con la inyección, es no contingente porque no es instrumental, pero viene condicionada de manera que con el paso de las sesiones el individuo desarrolla un condicionamiento simple, de luz, de efectos diríamos psicoactivos, que con la primera abstinencia y la segunda recaída prácticamente debería igualarse a la conducta instrumental, o al menos tener una situación diferencial que te permitiera separarlos.

E. PORTILLO: En este caso hay un condicionamiento, porque la luz te predice lo que va a pasar después. Pero en el caso que ha expuesto E. Ambrosio lo único que hay es un fármaco que llega a la rata, sin saber la rata por qué le llega. Esto es un efecto puramente del fármaco, que no sucede en el otro caso o que sucede cambiado.

F. RODRÍGUEZ DE FONSECA: Tienes la idea de que la diana farmacológica actúa siempre en el sistema y hace siempre lo mismo independientemente de cómo esté el sistema. Aquí no, aquí es precisamente porque actúa en el sistema que guía la conducta, modifica completamente la estructura cerebral en función de si la conducta ha sido programada y ejecutada o la conducta no está en curso. De la misma manera que tú tienes la inhibición sensorial y puedes aislarte completamente de estímulos que en otras condiciones podrían provocar cambios dramáticos en la expresión de genes y en la adaptación de tus neuronas, por ejemplo luz,

sonido, olfato. Ahora mismo, por ejemplo, estás pendiente exclusivamente de la transmisión oral, por lo tanto del sonido, tus sensaciones táctiles en las puntas de los dedos de los pies no sirven para nada ni estás programándolas, pero si tu conducta necesita esas sensaciones, porque estás por ejemplo conduciendo, inmediatamente el sistema ha cambiado y ya no es el mismo. Hay una información relevante que está en curso y eso lo cambia todo, es lo que llaman los ingleses el *will*, que no solamente es la voluntad, es la voluntad programada para hacer algo y obtener un resultado. Eso es todo lo que guía la conducta de un individuo, y no tiene nada que ver con el hecho de que tenga un fármaco o no lo tenga. No es una situación fármaco-respuesta, va mucho más allá. Es un sistema que está activo para ejecutar una conducta, y el otro para modular un sistema que no está activo y donde la conducta no importa. Faltan entonces todos los elementos de la cadena.

Evaluación experimental del potencial adictivo en animales

X. Codony

Descubrimiento Biológico, Farmacología Conductual, Esteve I+D, Barcelona.

Introducción

Los modelos animales de adicción incluyen todos aquellos procedimientos que permiten obtener alguna información acerca de los procesos básicos implicados en el abuso y dependencia a sustancias, tanto a nivel conductual como farmacológico o fisiológico. El desarrollo de nuevas moléculas para su uso terapéutico implica siempre un balance entre los beneficios que reporta y los efectos indeseables que, en mayor o menor grado, puedan llevar asociados. Para las moléculas destinadas al tratamiento de patologías del sistema nervioso central, un punto particularmente relevante a descartar es la posible capacidad para inducir fenómenos de adicción o dependencia. Por tanto, una de las aplicaciones más importantes de estos modelos es la de servir como filtro con el cual discriminar entre diferentes entidades químicas y ayudar a seleccionar la molécula más adecuada para su desarrollo y eventual utilización terapéutica. Esta aproximación condiciona y limita el tipo de modelo y procedimiento a utilizar, así como las variables a considerar. Normalmente la primera fase de la evaluación del potencial adictivo de una nueva sustancia se realiza en animales libres de todo tratamiento y estabulados en condiciones estándar. Por tanto, factores que podrían condicionar la capacidad adictiva como posibles adicciones previas o paralelas, como es habitual con el alcohol o el tabaco, situaciones tales como el estrés o las relaciones interpersonales y el entorno social, no se tienen en cuenta. Así, por ejemplo, si en un estudio de autoadministración (AA) se sustituye la cocaína por una sustancia con menor potencia reforzante, ésta no será capaz de mantener la respuesta y, por tanto, concluirse, erróneamente, que no tiene potencial adictivo. Diferentes tipos de estrés, físico, social o emocional, pueden facilitar la adquisición o aumentar la AA de diversas drogas tanto en roedores como en primates no humanos. Así mismo, la capacidad del grupo social para modular los efectos de diversas drogas sobre el individuo experimental ha sido descrita desde hace tiempo[1,2]. Recientemente se ha demostrado, utilizando el modelo de AA intravenosa (AAIV) en monos, que la cocaína tiene mayor eficacia como reforzador en los individuos subordinados que en los dominantes[3].

Estos aspectos, junto con otras consideraciones del máximo interés, como las diferencias sexuales[4], las diferencias genéticas no ligadas al sexo, que pueden explicar la diferente susceptibilidad de los individuos a los efectos de las drogas[5-7], las influencias ambientales en el resultado final de un determinado procedimiento[8,9], o el papel de los ritmos circadianos[10] no serán abordados en este artículo, en el que presentaremos una breve revisión de los principales métodos utilizados para evaluar el potencial adictivo en animales de experimentación.

Criterios para la validación de los modelos animales

Las categorías más ampliamente usadas para validar los modelos animales dentro de la psicofarmacología son la validez predictiva, la validez de constructo, la validez etiológica, la validez de convergencia/discriminación y la validez de apariencia[11]. Brevemente, un modelo tiene *validez predictiva* en la medida en que es capaz de sugerir lo que sucederá en el humano a partir de las observaciones realizadas con el modelo. Ello implica que se ha de tener la capacidad clínica para tener observaciones comparables. La *validez de constructo* hace referencia al grado de precisión con que el modelo mide aquello para lo que ha sido diseñado. La *validez etiológica*, como su nombre indica, hace referencia al grado de similitud de la etiología del fenómeno estudiado en el animal y en el humano. Dado el conocimiento, con demasiada frecuencia escaso, que se tiene de las patologías psiquiátricas, parece claro que

no se puede ser muy exigente con un determinado modelo en este punto. El auge y las posibilidades que la genética está aportando con la proteogenómica o con la generación de mutantes o animales transgénicos pueden dar más relevancia a este tipo de validación. Un modelo tiene *validez de convergencia* cuando los resultados correlacionan con los obtenidos en otros modelos que miden el mismo "constructo". Contrariamente, un modelo tendrá *validez discriminante* cuando sea capaz de medir aspectos diferentes a los medidos por otros. Finalmente, la *validez de apariencia* hace referencia al grado de semejanza entre la conducta del animal y los síntomas específicos que se dan en el humano. Si bien los demás criterios de validez tienen valor heurístico, los criterios necesarios y suficientes para la validación de los modelos animales en el ámbito que nos ocupa se reducen a dos: su fiabilidad y su capacidad predictiva[12]. Fiabilidad se refiere a la consistencia y estabilidad con que las variables pueden ser observadas, tanto las independientes como las dependientes. En este punto cabe mencionar que, con demasiada frecuencia, se insiste en la consistencia de los datos, infravalorando la variabilidad, incluso considerándola como un error, cuando a veces, precisamente la variabilidad es "el fenómeno". El tema de la validez de un modelo hace referencia, en definitiva, a las bases del método científico y un análisis detallado de los modelos que vamos a discutir escapa a las pretensiones de este artículo.

Sujeto experimental

La diversidad de sujetos experimentales utilizados en el estudio de los mecanismos implicados en los procesos de adicción es muy amplia. Se han utilizado invertebrados como el nemátodo *Caenorhabditis elegans*, el molusco *Aplysia californica* o el insecto *Drosophila melanogaster*. En el estudio de la adicción a sustancias, las especies de invertebrados que han recibido más atención han sido *D. melanogaster* y *C. elegans.* Estas especies tienen la ventaja de la simplicidad (p. ej., unas 300.000 neuronas en *Drosophila* y 302 neuronas en *C. elegans*) y una genética profusamente caracterizada. Las moscas tienen capacidad para tomar decisiones ante señales visuales contradictorias, y pueden generalizar entre señales relacionadas[13], lo cual permite atribuirles unas capacidades superiores a las que habitualmente estamos dispuestos a otorgarles. Estas especies disponen de casi todos los neurotransmisores, receptores, canales y sistemas de transducción de señales que actúan en vertebrados, con algunas excepciones. Recientemente, se ha demostrado cómo la dopamina ejerce una papel relevante en la respuesta de *Drosophila* a cocaína, nicotina o etanol, proponiéndose a dicho sujeto experimental como un buen modelo para el estudio de las respuestas conductuales promovidas por las drogas de abuso[14]. Finalmente, otras ventajas a tener en cuenta son las poblaciones manipulables y el tiempo entre generaciones (para una revisión consúltese Wolf FW y Heberlein U[15]).

Dentro de los vertebrados se utilizan muchas especies, incluyendo peces (p. ej., *Danio rerio*), palomas, perros, gatos, cerdos y diversos primates no humanos (p. ej., *Macaca sp.*, *Saimiri sciureus*, *Papio sp.*, *Cercopithecus aethiops*). Sin embargo, los roedores, rata y ratón, son sin duda las especies más utilizadas, con una creciente importancia del ratón por la irrupción de los ratones *knockout*. En este punto cabe mencionar las precauciones a tomar con dichos ratones en cuanto a procesos tales como la compensación que la ausencia de un determinado gen puede ejercer durante el desarrollo en otros sistemas, las diferencias debidas al fondo genético sobre el cual estudiamos a un gen particular o la importancia de discriminar una determinada característica fenotípica de otros efectos que puedan afectar inespecíficamente dicha característica[16,17].

Modelos animales del potencial adictivo

Los modelos que se van a discutir van destinados a poner de relieve la capacidad reforzante positiva de la sustancia estudiada. Sin embargo, bajo otras circunstancias los mismos modelos pueden servir para evaluar las propiedades de dichas sustancias para actuar como reforzadores negativos cuando se produce la retirada de éstas. La mayoría de los signos físicos asociados con la retirada de una sustancia adictiva pueden ser fácilmente cuantificados. Sin embargo, la medición del estado motivacional, mediante la aplicación de las técnicas operantes, ha demostrado ser más sensible en la valoración de los efectos de la abstinencia (para una revisión consúltese Koob GF[12]).

Autoadministración

Utilizando las técnicas de condicionamiento operante definidas por Skinner, si la infusión de una sustancia en contingencia con una determinado conducta (p. ej., apretar una palanca) incrementa la probabilidad de que se vuelva a producir la conducta que condujo a la obtención de

la infusión, la sustancia puede ser considerada como un estímulo reforzante positivo, y, por tanto, estudiada como cualquier otro reforzador positivo, como el agua o la comida. Es sin duda uno de los modelos más utilizados para el estudio de los procesos neurobiológicos implicados en la adicción. El método de AA más habitual es por vía intravenosa, pero también se han utilizado otras rutas de administración, como la oral, la intracraneal y, en menor grado, la intragástrica.

Autoadministración oral. Este método tiene como principales ventajas que no requiere preparación quirúrgica de los sujetos ni aparatos especiales. Existen dos aproximaciones, una se basa simplemente en la libre elección de la botella de la cual se bebe. A partir de esta configuración básica, se han desarrollado diversas variantes[18]. En general, estos procedimientos experimentales puede mantenerse por largos periodos de tiempo y el número de animales utilizados puede ser muy elevado. La otra aproximación implica el uso de programas de condicionamiento operante, el entrenamiento del sujeto experimental a realizar una respuesta para obtener el reforzador. La AA oral se utiliza, sobre todo, para estudiar la adicción a etanol. Limitaciones debidas a solubilidad, estabilidad, gusto o cantidad de sustancia necesaria han restringido su uso para otras drogas o nuevas sustancias.

Autoadministración intracraneal. La AA intracraneal permite diseccionar la localización anatómica de las áreas cerebrales responsables de la acción reforzante de una sustancia. La posibilidad de coadministrar antagonistas selectivos permite, además, analizar la implicación de los diferentes sistemas de neurotransmisión. Recientemente, utilizando esta técnica en rata, se ha podido discriminar en qué zona del núcleo *accumbens* ejerce su efecto reforzante la cocaína[19]. En este mismo estudio, la coadministración del antagonista D2/D3 sulpirida bloqueó el efecto de la cocaína. Sin embargo, la demostración de un efecto reforzante tras la administración de una sustancia en una localización específica, o su bloqueo con antagonistas selectivos, sólo indica que esa zona o sistema de neurotransmisión son *suficientes* para inducir reforzamiento, pero no nos indica que esa zona/sistema sean *necesarios* para el efecto reforzante de una sustancia administrada sistémicamente. Puede suceder que existan diversas zonas cerebrales cuya activación sea *suficiente* para reforzar la conducta. Los estudios de administración intravenosa juntamente con el bloqueo selectivo en zonas discretas puede ayudar en la identificación de dichas zonas *necesarias*.

Autoadministración intravenosa. En el modelo de AAIV, al sujeto experimental se le implanta, habitualmente en la yugular, un catéter a través del cual el animal puede administrarse la sustancia a estudiar. El catéter se hace pasar subcutáneamente hasta la zona dorsal interescapular o hacia la cabeza, donde se fija y se hace accesible, y se conecta a una bomba de infusión. Aunque los estudios iniciales se hicieron en mono, la mayor parte de los estudios se han realizado en rata. El avance de la manipulación genética y la irrupción de los ratones *knockout* ha llevado a muchos laboratorios a adaptar el modelo a esta especie. Como en todos los procedimientos de conducta operante, si el sujeto experimental tiene un buen nivel de actividad, el aprendizaje de la respuesta puede producirse al azar, pero generalmente, para que el animal empiece a responder, debe realizarse una primera administración (*priming)* por parte del experimentador. Si quiere evitarse esta primera administración no contingente puede aumentarse la motivación mediante un cierto grado de privación de comida, poniendo comida en las palancas u otros sistemas. La mayoría de las drogas de abuso han demostrado capacidad de inducir AAIV en una especie u otra. Algunas sustancias, como por ejemplo el Δ^9-tetrahidrocannabinol (THC), pueden requerir de condiciones especiales para mantener su AAIV[19]. Existen en la literatura múltiples variantes experimentales y aplicaciones de este procedimiento donde se analiza el potencial adictivo de nuevas moléculas, la capacidad de antagonizar el efecto de diferentes drogas o la interacción de diferentes sistemas de neurotransmisión[20-23].

Los problemas asociados a este modelo son varios. Algunos son de orden puramente técnico, como las dificultades para mantener el catéter operativo y los cuidados necesarios para evitar posibles infecciones o el tiempo necesario para obtener un nivel estable de respuesta. Otros problemas que se dan en los experimentos de sustitución, particularmente cuando hablamos de la evaluación del potencial reforzante de una nueva sustancia, pueden ser: *a)* las posibles interacciones entre la droga utilizada para obtener el patrón estable de respuesta y la nueva sustancia a estudiar, y *b)* una capacidad reforzante menor a la de la droga sustituida que sea incapaz de mantener la respuesta. En la evaluación directa de una nueva sustancia nos podemos encontrar con: *a)* la posible interferencia con los procesos de aprendizaje; *b)* una sustancia puede necesi-

tar de periodos de exposición considerables para manifestar su capacidad reforzante, y *c)* la sustancia puede tener potencial adictivo sólo bajo determinadas circunstancias. Sin embargo, junto a una elevada validez de apariencia, este modelo ha demostrado una alta concordancia entre la capacidad de una sustancia para mantener AAIV en animales y su potencial adictivo en humanos.

Programas de reforzamiento

Como ya se ha comentado, los principios del condicionamiento operante pueden ser aplicados directamente en los estudios de AA. Por tanto, los resultados obtenidos dependen del programa de reforzamiento utilizado, tal y como sucede con otros reforzadores más convencionales. La elección de un determinado programa estará en función del objetivo o proceso a estudiar.

Programas simples. Estos programas requieren un número determinado de respuestas para obtener la infusión de la sustancia. Son el punto de partida de los demás programas de reforzamiento y aportan como resultado básico la capacidad o no de mantener un patrón estable de respuesta.

Programas múltiples. En estos experimentos dos programas de reforzamiento para dos reforzadores distintos se suceden alternativamente en una misma sesión. Con ello se intenta evaluar el efecto específico de una manipulación experimental sobre un reforzador determinado, así como el efecto del patrón de respuesta de un reforzador sobre el otro y viceversa.

Programas de razón progresivos. Estos programas se han utilizado para evaluar la eficacia reforzadora de la sustancia autoadministrada, mediante el incremento del número de respuestas necesarias para obtener el reforzador y determinando la razón de respuesta a partir de la cual el animal deja de responder *(breaking point).*

Programas de segundo orden. En el condicionamiento clásico, un estímulo condicionado (EC) puede actuar como un reforzador, incrementando las conductas que conducen a la presentación del estímulo. Para ello precisa de una historia previa con un reforzador primario. Los primeros estudios para evaluar la capacidad de un EC para actuar como reforzador implicaban la extinción del reforzador primario, con lo que los resultados eran débiles y breves. Ello condujo al desarrollo de programas de segundo orden en los que el reforzador primario no desaparece, pero para su obtención el sistema requiere que el animal responda para obtener diversos EC. Posteriormente, estos programas se adaptaron a los paradigmas de AA. Estos programas permiten analizar la conducta del animal antes de la obtención de la primera dosis de droga *(drug-seeking)* y tras la obtención de la droga *(drug-taking)*, pudiéndose analizar ambas conductas y su modulación ambiental o farmacológica por separado (para una revisión consúltese Everitt BJ y Robbins TW[24]; Schindler CW et al[25]).

Autoestimulación intracraneal

La estimulación eléctrica con microelectrodos de ciertas zonas cerebrales tiene efecto reforzante. Los animales de experimentación aprenden rápidamente la respuesta que conduce a la autoestimulación. Se postula que con esta intervención experimental se puede actuar directamente sobre los circuitos neuronales que se activan de forma natural con los reforzadores naturales (agua, comida, sexo, etc.). Las sustancias con potencial adictivo disminuyen el umbral necesario de autoestimulación intracraneal para mantener el nivel de respuesta. Es decir, la frecuencia y el número de respuestas necesarias para que la estimulación mantenga el nivel de respuesta disminuye si la sustancia administrada tiene capacidad reforzante.

Estudios de discriminación

La hipótesis de trabajo en estos estudios es que cuando una sustancia es capaz de inducir discriminación lo hace mediante los mismos mecanismos que inducen los efectos “subjectivos” en humanos. Aunque existen múltiples variantes, los estudios de discriminación implican el entrenamiento de los animales en la realización de una respuesta operante a fin de obtener una recompensa cuando han sido tratados con la sustancia a estudiar, y deben realizar otra respuesta cuando han sido tratados con vehículo. El animal debe discriminar cuál es su estado interno, tras una administración u otra, a fin de elegir la respuesta correcta. Una vez establecida la discriminación, sustancias con capacidad para inducir los mismos efectos internos llevarán al sujeto experimental a efectuar la misma respuesta[26]. Se dice entonces que las nuevas sustancias “generalizan” para la droga inicialmente administrada. Con este protocolo, los estudios de discriminación son una

buena herramienta para identificar la relativa similitud de los efectos discriminantes y un indicador del potencial adictivo. La capacidad de discriminar los efectos de una sustancia *per se*, no por generalización respecto a una droga conocida, no indica que esa sustancia tenga potencial adictivo en humanos. Fármacos como los neurolépticos o los antihistamínicos pueden ser discriminados en estudios animales y no son drogas de abuso.

Preferencia condicionada de lugar

El modelo de preferencia condicionada de lugar (conocida como CPP, en inglés) se basa en la asociación espacial y temporal entre el efecto reforzante de la sustancia administrada y los estímulos ambientales presentes cuando se está produciendo el efecto reforzante, siguiendo los principios del condicionamiento Pavloviano. Conceptualmente, el modelo tiene similitud con la situación en humanos, donde la probabilidad de recaída aumenta al volver al entorno donde se consumió la droga. El aparato básico de CPP consiste en una caja experimental con dos compartimientos conectados directamente a través de una puerta o mediante un tercer compartimiento. Los dos compartimientos difieren en diversos aspectos (suelo, color, olor, iluminación, o incluso la forma de éstos), de manera que sean suficientemente diferenciables por el animal. Se plantean entonces dos posibilidades: *a) no balanceado*, si el animal manifiesta preferencia por uno de los compartimientos, o *b) balanceado*, si le son indiferentes, por lo menos en cuanto al tiempo de permanencia se refiere, que es el parámetro principal que se contabiliza. En la versión más habitual, los compartimientos son equivalentes y lo que se pretende es que el efecto reforzante de la sustancia sea el único estímulo que haga permanecer al animal más tiempo en el compartimiento donde la ha recibido. Una descripción detallada de las múltiples variantes está más allá del objetivo de este artículo (para una revisión consúltese Tzschentke TM[27]). En cualquier caso, la capacidad de inducir CPP ha sido demostrada para muchas drogas. En el caso del THC, que inicialmente mostraba aversión condicionada de lugar, la preexposición a cannabinoides antes del condicionamiento comportó CPP[28]. Por otra parte, y añadiendo valor al modelo, sustancias consideradas aversivas inducen aversión condicionada de lugar. Mayoritariamente, las sustancias que inducen AA han demostrado capacidad para inducir preferencia de lugar.

Conclusiones

Los modelos animales pueden aportar una información valiosa en la investigación de la adicción y la dependencia a sustancias químicas, aunque ninguno de los modelos utilizados sea capaz de cumplir todos los criterios de validez exigibles a un modelo animal. Esta carencia se debe, principalmente, y por ello insalvable, a la distancia existente entre el sistema nervioso humano y el de los animales utilizados, pero también se debe a la falta de conocimiento de los procesos neurobiológicos que sustentan la conducta adictiva y la dependencia.

Los modelos disponibles tienen un alto grado de fiabilidad y los resultados son reproducibles con diferentes especies, laboratorios y sustancias. Sin embargo, la validez predictiva, aunque bien establecida cuando los resultados indican capacidad reforzante de la sustancia estudiada, es más limitada cuando los resultados son negativos, debido a la multiplicidad de factores que pueden afectar al potencial adictivo de una sustancia.

BIBLIOGRAFÍA

1. Crowley TJ, Stynes AJ, Hydinger M, Kaufman IC. Ethanol, methamphetamine, pentobarbital, morphine, and mokey social behavior. Arch Gen Psychiatry 1974; 31: 829-838.
2. Miczek KA, Gold LH. d-Amphetamine in squirrel monkeys of different social status: effects on social and agonistic behavior, locomotion, and stereotypes. Psychopharmacology (Berl) 1983; 81: 183-190.
3. Morgan D, Grant KA, Gage HD, Mach RH, Kaplan JR, Prioleau O et al. Social dominance in monkeys: dopamine D2 receptors and cocaine self-administration. Nature Neurosci 2002; 5: 169-174.
4. Lynch WJ, Roth ME, Carroll ME. Biological basis of sex differences in drug abuse: preclinical and clinical studies. Psychopharmacology (Berl) 2002; 164: 121-137.
5. Crabbe JC, Phillips TJ. Genetics of alcohol and other abused drugs. Drug Alcohol Depend 1998; 51: 61-71.
6. Nestler EJ. Genes and Addiction. Nat Genet 2000; 26(3): 27-281.
7. Nestler EJ, Landsman D. Learning about addiction from the genome. Nature 2001; 409: 834-835.
8. Crabbe JC, Wahlsten D, Dudek BC. Genetics of Mouse behaviour: Interactions with laboratory environment. Science 1999; 284: 1670-1672.
9. Wahlsten D, Metten P, Phillips TJ, Boehm II SL, Burkhart-Kasch S, Dorow J et al. Different data from different labs: lessons from studies of gene-environment interaction. J Neurobiol 2003; 54(1): 283-311.

10. Abarca C, Albrecht U, Spanagel R. Cocaine sensitization and reward are under the influence of circadian genes and rhythm. Proc Natl Acad Sci USA 2002; 99(13): 9026-9030.
11. Geyer MA, Markou A. Animal models of psychiatric disorders. En: Psychopharmacology-The fourth Generation of Progress. The American College of Neuropsychopharmacology (ACNP website) 2000.
12. Koob GF. Animal models of drug addiction. En: Psychopharmacology-The fourth Generation of Progress. The American College of Neuropsychopharmacology (ACNP website) 2000.
13. Tang S, Guo A. Choice behavior of *Drosophila* facing contradictory visual cues. Science 2001; 294: 1543-4537.
14. Bainton RJ, Tsai LTY, Singh CM, Moore MS, Neckameyer WS, Heberlein U. Dopamine modulates acute responses to cocaine, nicotine and ethanol in *Drosophila*. Current Biology 2000; 10: 187-194.
15. Wolf FW, Heberlein U. Invertebrate models of drug abuse. J Neurobiol 2003; 54(1): 61-178.
16. Dockstader CL, Van der Kooy D. Mouse strain differences in opiate reward learning are explained by differences in anxiety, not reward or learning. J Neurosci 2001; 21(22): 9077-9081.
17. Crawley JN. What's wrong with my mouse? Behavioral Phenotyping of Transgenic and Knockout Mice. Canadá: Wiley-Liss, 2000.
18. Spanagel R, Hölter SM. Pharmacological validation of a new animal model of alcoholism. J Neural Transm 2000; 107: 669-680.
19. Rodd-Henricks ZA, McKinzie DL, Li TK, Murphy JM, McBride WJ. Cocaine is self-administered into the shell but not the core of the nucleus accumbens of Wistar rats. J Pharmacol Exp Ther 2002; 303(3): 1216-1226.
20. Maldonado R, Rodríguez de Fonseca F. Cannabinoid addiction: behavioral models and neural correlates. J Neuroscience 2002; 22(9): 3326-3331.
21. Pilla M, Perachon S, Sautel F, Garrido F, Mann A, Wermuth CG et al. Selective inhibition of cocaine-seeking behaviour by a partial dopamine D_3 receptor agonist. Nature 1999; 400: 371-375.
22. Navarro M, Carrera MRA, Fratta W, Valverde O, Cossu G, Fattore L et al. Functional interaction between opioid and cannabinoid receptors in drug self-administration, J Neurosci 2001; 21(14): 5344-5350.
23. Weiss F, Ciccocioppo R, Parsons LH, Katner S, Liu X, Zorrilla EP et al. Compulsive drug-seeking behavior and relapse. Neuroadaptation, stress, and conditioning factors. Ann N Y Acad Sci 2001; 937: 1-26.
24. Everitt BJ, Robbins TW. Second-order schedules of drug reinforcement in rats and monkeys: measurement of reinforcing efficacy and drug-seeking behaviour. Psychopharmacology (Berl) 2000; 153: 17-30.
25. Schindler CW, Panlilio LV, Goldberg SR. Second-order schedules of drug self-administration in animals. Psychopharmacology 2002; 163: 327-344.
26. De Vry J, Jentzsch KR. Discriminative stimulus effects of BAY 38-7271, a novel cannabinoid receptor agonist. Eur J Pharmacol 2002; 457: 147-152.
27. Tzschentke TM. Measuring reward with the conditioned place preference paradigm: a comprehensive review of drug effects, recent progress and new issues. Prog Neurobiol 1998; 56: 613-672.
28. Valjent E, Maldonado R. A behavioural model to reveal place preference to delta 9-tetrahidrocannabinol in mice. Psychopharmacology (Berl) 2000; 147: 436-438.

DISCUSIÓN

R. MALDONADO: Estoy totalmente de acuerdo con la existencia de falsos negativos, pero creo que falsos positivos también pueden existir. Ahora se están intentando poner a punto modelos de búsqueda de sensación, con lo cual lo único que utilizan es el estímulo condicionado, la luz, ruido, lo que sea. Y se consigue también un comportamiento instrumental perfectamente constante para simplemente una búsqueda de sensación que coincide con los mismos estímulos condicionados que utilizamos para la búsqueda de la droga. Por tanto, estos resultados muestran la posibilidad de falsos positivos.

X. CODONY: La validez predictiva se basa en los resultados positivos obtenidos con las drogas de abuso conocidas. Por tanto, entra dentro de lo posible que nuevas moléculas den resultados positivos en los modelos animales y no tengan capacidad adictiva en humanos. Sin embargo, la obtención de resultados positivos en diferentes modelos animales lo hacen bastante menos probable.

Evaluación experimental del potencial de abuso en humanos

P.N. Roset, M. Farré, S. Poudevida, S. Abanades y J. Camí*

Unitat de Farmacologia, Institut Municipal d'Investigació Mèdica y Hospital del Mar (IMAS-IMIM-HMAR). Universitat Autònoma de Barcelona y *Universitat Pompeu Fabra, Barcelona.

Introducción

La evaluación clínica del potencial de abuso de las drogas, y, por extensión, de todos los psicofármacos, se inició en EE.UU. en 1928 en el Hospital Penitenciario de Lexington (Kentucky), donde se ingresaban los convictos federales que eran dependientes de opioides para su tratamiento. En este lugar se creó en 1935 una pequeña unidad de investigación clínica que sería el germen del Addiction Research Center (ARC), creado en 1948. Las exigencias éticas sobre la investigación en prisioneros obligaron a cerrar la investigación en Lexington y el traslado en 1978 del ARC a Baltimore, como centro intramural de investigación clínica del National Institute on Drug Abuse (NIDA). En la actualidad el NIDA forma parte de los National Institutes of Health (NIH), e incluye en su centro de Baltimore tanto investigación básica como clínica. La evolución de la unidad de Lexington fue paralela a la expansión de la psicofarmacología y las neurociencias, que siguió un desarrollo exponencial en la segunda mitad del siglo XX, y fue impulsada principalmente por el College on Problems on Drug Dependence (CPDD), una sociedad científica americana dedicada al estudio de la adicción. Con el apoyo de instituciones gubernamentales y de la industria farmacéutica, se estableció una red de centros de investigación académicos vinculados al CPDD, dedicados a evaluar de forma sistemática el potencial de abuso de drogas y fármacos, que contribuyeron a generar gran parte del conocimiento científico actual sobre este campo. En su evolución histórica se pueden definir tres etapas, que se han sucedido de forma solapada: el desarrollo de la metodología experimental, su implantación en la evaluación de nuevos medicamentos, y el estudio de los mecanismos neuropsicofarmacológicos de la adicción[1,2].

Los estudios del ARC de Lexington formaban parte de un proyecto conjunto del gobierno y la industria farmacéutica para la evaluación del potencial adictivo de los opioides, dirigido a obtener un analgésico sustituto de la morfina pero con menor potencial de abuso. Nathan B. Eddy fue una figura fundamental en el desarrollo de este programa. La evaluación experimental, concebida por Clifton K. Himmelsbach, se realizaba en prisioneros adictos a opioides y se basaba en la inducción de dependencia fisiológica, midiendo objetivamente la aparición del síndrome de abstinencia tras la retirada del fármaco, o la capacidad para suprimir o evitar su aparición con fármacos distintos al inductor. Posteriormente, bajo el liderazgo de Harry Isbell en el ARC, y en colaboración con el grupo de investigación de Henry K. Beecher en Harvard (Boston), se evidenció que el desarrollo de dependencia y la aparición del síndrome de abstinencia no eran condiciones suficientes para entender la adicción. En cambio, se puso de manifiesto que a pesar de la disparidad farmacológica entre ellos, todos los fármacos con potencial de abuso inducían cambios en el estado de ánimo, el humor, los sentimientos, la sensibilidad o la percepción que provocaban una sensación placentera positiva. Se definió esta característica común como euforia inducida por fármacos, entendida como una sensación placentera, agradable, de estar a gusto y de buen humor, y se consideró que la conducta verbal de los sujetos, manifestando estos efectos subjetivos, podía ser considerada un buen índice de la capacidad reforzadora positiva de los fármacos. Así, a mediados del siglo XX se formuló una nueva hipótesis de la adicción, que consideraba que las drogas producían efectos subjetivos transitorios, que los efectos de cada clase de drogas eran característicos, lo que permitía distinguirlas y reconocerlas, y que el principal efecto común era la euforia. Este modelo se basaba en la psicología conductista, y formulaba la adicción en función de las características reforzadoras positivas y negativas de los fármacos. El modelo experimental basado en la inducción de dependencia

fue reemplazado por la aplicación de las técnicas de autoadministración en animales, a las que siguieron los paradigmas de discriminación y condicionamiento de plaza. En humanos también se desarrollaron los diseños y métodos centrados en los efectos percibidos por los sujetos, tanto por reconocimiento implícito, en los estudios de autoadministración, preferencia y discriminación, como por reconocimiento explícito, registrando los efectos subjetivos, y se crearon los primeros cuestionarios de efectos subjetivos. Al mismo tiempo, se establecieron las bases metodológicas para el estudio experimental de estos efectos en humanos, que incluían la aleatorización, el enmascaramiento, el uso de controles positivos (fármaco patrón), neutros (placebo) y negativos (fármaco sin potencial de abuso), la selección adecuada y dirigida de sujetos (voluntarios sanos o sujetos con experiencia previa de consumo), la exploración de un intervalo amplio de dosis y de distintas vías y formas de administración, y la validación de las pruebas y métodos de medida para garantizar su sensibilidad, fiabilidad y linealidad[1-4].

El desarrollo de la psicofarmacología en las décadas de 1950 y 1960 amplió enormemente la disponibilidad de nuevos medicamentos y grupos farmacológicos, lo que conllevó la aparición de problemas de abuso y dependencia relacionados con éstos. Algunos de estos fármacos fueron evaluados con los nuevos métodos experimentales, lo que permitió contrastar su validez y fiabilidad para fármacos distintos de los opioides. Sin embargo, el hecho decisivo en esta etapa ocurrió en 1970, cuando se estableció en EE.UU. la Comprehensive Drug Abuse Prevention and Control Act, o Controlled Substance Act (CSA), ley federal que adjudicó el control sobre la fabricación, comercialización y distribución de fármacos con potencial de abuso al Departamento de Justicia, creando la Drug Enforcement Administration (DEA), la agencia gubernamental sobre drogas. La DEA asumía en este aspecto la máxima autoridad federal, por lo que la Food and Drug Administration (FDA), la agencia encargada de la regulación administrativa de medicamentos, quedó supeditada a las decisiones de ésta para los fármacos sujetos a control: opioides, estimulantes, depresores, cannabis, alucinógenos, anabolizantes, y sus derivados o análogos. Afortunadamente, la CSA también estableció que la clasificación y regulación de estos fármacos por parte de la DEA debía fundamentarse en pruebas científicas fiables, y quedó regulado federalmente que para ello la FDA debía aportar información acerca de las medidas de efectos subjetivos relativas a la euforia, la toxicidad específica del fármaco y su capacidad para alterar el rendimiento psicomotor, el desarrollo de tolerancia, y la inducción de dependencia física, comparándolo con un fármaco patrón de conocido potencial de abuso. Este nuevo marco legal repercutió positivamente en el CPDD y el NIDA, que ya constituían el referente científico de la evaluación experimental del potencial de abuso, y, además, motivó una rápida implantación de la evaluación del potencial de abuso en los programas de desarrollo de nuevos medicamentos de la industria farmacéutica. Así, la Guía de Recomendaciones (Guidelines) para el desarrollo clínico de fármacos ansiolíticos, publicada a finales de la década de 1970, declaraba que no se podían exigir estudios o medidas específicos para determinar el potencial de abuso en humanos dado el incipiente desarrollo de la metodología en este campo, y sólo recomendaba registrar los fenómenos de tolerancia (aumento de la dosis), rebote o recaída, y abstinencia al retirar la medicación[5]. Sin embargo, la Guía de Recomendaciones para el desarrollo clínico de los fármacos hipnóticos, publicada el mismo año que la anterior, ya recomendaba explícitamente realizar estudios de potencial de abuso en humanos, seleccionando sujetos con experiencia en el consumo de sedantes, incluyendo un barbitúrico como fármaco comparador, y midiendo los efectos subjetivos o la capacidad reforzante del fármaco[6].

La obligación de aportar los datos necesarios para la evaluación de la DEA antes de la comercialización de los nuevos medicamentos con efectos sobre el sistema nervioso central creó la necesidad de concertar un marco de referencia para la evaluación del potencial de abuso entre todos los actores implicados. En esta época se dedicó mucho esfuerzo al análisis y valoración de los métodos experimentales, para demostrar su fiabilidad (reproducibilidad y robustez) y su validez (de constructo y predictiva), y se definió el procedimiento experimental básico de la evaluación clínica del potencial de abuso mediante estudios de autoadministración, preferencia, discriminación y medida de efectos subjetivos[7,8]. El trabajo conjunto en esta dirección quedó plasmado en 1988 en la iniciativa del CPDD, que desde 1983 había iniciado sus actividades en la evaluación del potencial de abuso en humanos, de celebrar una conferencia de consenso sobre el tema, en la que participaron el propio CPDD, la FDA, la DEA, el NIDA, y la industria farmacéutica, para sentar las bases metodológicas para la evaluación clínica del potencial de abuso, con el fin de poder evaluar los productos con un siste-

ma homogéneo que sirviese de referente para todos ellos[9]. El resultado de esta reafirmación de la necesidad de los estudios del potencial de abuso fue la redacción de unas recomendaciones específicas de la FDA para este tipo de estudios, aunque de hecho nunca llegaron a publicarse[10]. Otro aspecto importante que logró ser progresivamente aceptado fue la realización de estudios en humanos con el máximo respeto por los postulados éticos[11].

En Europa se reprodujo la iniciativa en la Conferencia de Barcelona de 1991, con la finalidad de impulsar la implantación y extender la aceptación de la evaluación clínica del potencial de abuso en el desarrollo de nuevos medicamentos, para lo que se proponía un mayor apoyo gubernamental a las unidades de investigación clínica, mayor exigencia administrativa en la regulación de los fármacos en investigación, y la difusión de los conocimientos metodológicos y técnicos necesarios[12]. Sin embargo, en Europa la investigación se ha centrado más en los aspectos psicológicos y sociales, en la epidemiología y historia natural del proceso, o en las intervenciones terapéuticas de la adicción a sustancias, pero no se ha consolidado la evaluación experimental del potencial de abuso en humanos, y no hay apenas centros dedicados a la evaluación de medicamentos en desarrollo[13].

El avance posterior de la disciplina se ha dirigido mayoritariamente al estudio de los mecanismos de la adicción. Las modernas técnicas de neuroimagen han permitido localizar anatómicamente y describir funcionalmente los circuitos cerebrales que parecen implicados en la conducta de autoadministración, y a su vez han corroborado la validez de la medida de los efectos subjetivos, que se asocian a la activación de los centros relacionados con la conducta adictiva[14-16]. Por otro lado, se están identificando las características genéticas que influyen en el desarrollo de la predisposición al consumo de drogas, tanto por los cambios farmacocinéticos como farmacodinámicos[17,18].

Otra vez, la actividad de los grupos implicados en la investigación del potencial de abuso de fármacos en EE.UU. ha seguido impulsando tanto su avance metodológico como su aceptación administrativa en el desarrollo de fármacos nuevos, y una buena muestra de ello es la nueva conferencia conjunta entre el CPDD, la FDA, la DEA y el NIDA celebrada en octubre de 2002, cuyas ponencias aparecerán publicadas próximamente en un número especial de la revista oficial del CPDD, *Drug and Alcohol Dependence*. Parece que en Europa habrá otra vez eco de la iniciativa americana: se ha propuesto que en el I Congreso Europeo de Trastornos Adictivos, a celebrar a finales de mayo de 2003, se funde el Colegio Europeo de Ciencias de la Adicción, que reúna los distintos grupos y asociaciones de trabajo en el tema para impulsar su progreso científico y su trascendencia social. Por otro lado, en un futuro próximo se irá completando la aplicación de los acuerdos del International Committee on Harmonization (ICH), que uniformizará los requisitos administrativos y científicos de la investigación de nuevos medicamentos, y probablemente conlleve la regulación definitiva de la evaluación clínica del potencial de abuso en la Unión Europea[19]. Una de las primeras consecuencias, que ya aparece en algunas de las guías de recomendaciones de la agencia europea del medicamento (EMEA), será la necesidad de registrar los efectos subjetivos inducidos por el fármaco en todos los estudios clínicos, desde la fase I a la fase III[20]. También puede concebirse la necesidad de este tipo de estudios bajo el requerimiento de la vigente ley de farmacovigilancia (Real Decreto 711/2002)[21], que adopta la directiva ICH correspondiente, en la que se considera efecto adverso grave sin riesgo vital directo, y objeto de vigilancia postautorización, el desarrollo de dependencia, abuso o mal uso del medicamento.

Evaluación de los efectos subjetivos inducidos por psicofármacos

La medida de los efectos subjetivos puede realizarse en situaciones no experimentales, como los estudios de observación en el medio real de consumo o las encuestas retrospectivas a consumidores, que permiten analizar los aspectos sociales del consumo y la influencia del entorno en la experiencia subjetiva. Sin embargo, para la evaluación del potencial de abuso se recomienda limitar al máximo las variables no controladas con el fin de aumentar la fiabilidad de los resultados. Para ello se recomienda la realización de experimentos con las máximas garantías metodológicas y bioéticas, siguiendo un diseño de ensayos clínicos aleatorios y controlados (véase más adelante) y el uso de cuestionarios y escalas específicos.

En 1961 Fraser publicó la utilización del Single Dose Questionnaire (SDQ) en el que, además de las variables registradas por el observador, por primera vez se incluían los efectos subjetivos manifestados por el sujeto: se le preguntaba si sentía el efecto del fármaco; se le pedía que identificara la sustancia a la que más se parecieran los efectos percibidos de entre una lista de sustan-

cias patrón con conocido potencial de abuso; se le preguntaba cómo se sentía en algunas escalas de adjetivos de respuesta binaria (activación, sedación, relajación, etc.); y se le pedía que puntuara cuánto le gustaba el fármaco en una escala de 0 a 4. Este cuestionario contiene, pues, cuatro estrategias distintas de medida de efectos: el reconocimiento de los efectos, que indica si el sujeto es capaz de discriminar la aparición de los efectos de la sustancia ante placebo; la clasificación de los efectos, en función del fármaco patrón al que más se parecían; una lista de adjetivos de estados de ánimo; y la medida de cuánto gusta el fármaco *(liking).* Esta última se ha demostrado como una de las más sensibles a los efectos relacionados con el potencial de abuso, puesto que refleja la valoración global de los efectos y la actitud del sujeto ante éstos, aunque presenta el inconveniente de ser muy dependiente de la experiencia previa del sujeto y de sus expectativas ante los efectos de la sustancia. También el apartado de clasificación de la sustancia requiere sujetos con experiencia de consumo para poder reconocer y discriminar los efectos percibidos. Otra limitación de este cuestionario es que la respuesta binaria a la percepción de efectos y a la lista de adjetivos no da información sobre la intensidad de los efectos, sólo se distingue si se perciben o no, y no permite estudiar con detalle ni el curso temporal de los efectos ni la relación dosis-respuesta[22-24].

Tanto la escala de cuánto gusta el fármaco *(liking)* como las escalas basadas en la lista de adjetivos fueron adaptadas posteriormente al formato de escalas analógicas visuales (EAV), que permiten registrar de forma cuantitativa las respuestas en una escala continua, generalmente presentada como una línea horizontal de 10 cm de largo asociada a un ítem. Las posibilidades de este tipo de cuestionarios son infinitas, puesto que se pueden diseñar de forma específica para cada estudio, incluyendo tanto los efectos inespecíficos (algún efecto, buenos efectos, malos efectos, le gusta) como otros efectos específicos (ansiedad, sedación, estimulación, embriaguez, cambios perceptivos, de ánimo). Tienen la ventaja de que se pueden responder de forma rápida, aunque presentan más variabilidad que otros cuestionarios[23-25].

En 1963, Hill et al publicaron el Addiction Research Center Inventory (ARCI). Este cuestionario se desarrolló en el ARC con el objetivo específico de medir los efectos subjetivos de las sustancias con potencial de abuso, y fue validado administrando experimentalmente distintas sustancias a sujetos con antecedentes de abuso o dependencia. Se creó a partir de las respuestas verbales de sujetos adictos tras la administración experimental de distintas clases de sustancias. El proceso de reducción de todas las respuestas literales condujo a la obtención de 550 ítems que evaluaban un amplio abanico de efectos fisiológicos, cognitivos y subjetivos. Cada ítem se formulaba como una frase que el sujeto debía calificar como verdadera o falsa, y los resultados se agruparon en varias subescalas mediante un análisis factorial dirigido a discriminar distintos patrones de efecto farmacológico o clases farmacológicas. La versión reducida de 49 ítems ha sido la más ampliamente utilizada, y permite medir los efectos de 5 subescalas: MBG *(morphine-benzedrine group)*, indicativa de euforia inducida por sustancias con alto potencial de abuso; PCAG *(pentobarbital-chlorpromazine-alcohol group)* medida de sedación; LSD (lisérgida) medida de los efectos disfóricos y físicos de los alucinógenos, pero no evalúa los cambios perceptivos ni los de las alucinaciones; BG *(benzedrine group)*, que mide los efectos sobre la eficiencia intelectual; y A (anfetamina), compuesta de ítems de MBG y BG, que mide los efectos psicoestimulantes de las anfetaminas. Las escalas tienen un recorrido entre 11 y 16 puntos. El perfil conjunto de la respuesta a cada escala permite clasificar y comparar la nueva sustancia con la de referencia. La escala MBG mide específicamente la euforia inducida por sustancias, y se considera el mejor indicador del potencial de abuso, aunque al ser derivada de estudios con opioides y anfetaminas se ha mostrado menos sensible a los efectos agradables de los sedantes como los barbitúricos o las benzodiacepinas. Con todo, el ARCI sigue siendo el instrumento de medida más ampliamente aceptado para la evaluación de los efectos subjetivos en los estudios de evaluación del potencial de abuso, ha sido traducido a varios idiomas, y ha sido traducido y validado en español[26-28].

La estimación del valor monetario en la calle *(street value)* por parte de los sujetos una vez experimentados los efectos de la sustancia ha sido utilizada en algunos trabajos. Se asume que la sustancia que reciba una mayor valoración económica debería tener mayores propiedades reforzadoras, lo que permite comparar distintas dosis o fármacos en un mismo estudio. Sin embargo, los resultados que ofrece son difíciles de comparar entre estudios[29].

El cuestionario Profile of Mood States (POMS) fue diseñado para medir el estado de ánimo y el humor, aunque también ha sido utilizado para medir los efectos de las sustancias con potencial

de abuso. La versión más utilizada en este tipo de estudios consiste en una lista de 72 adjetivos, a los que el sujeto debe responder en una escala de Likert de 5 puntos (0-4). Los resultados se obtienen en 10 escalas representativas de distintos estados de ánimo o humor: ansiedad, depresión, hostilidad, vigor, fatiga, confusión, amigabilidad, activación y humor positivo. Se ha mostrado sensible a los efectos psicoactivos de estimulantes y sedantes, y permite estudiar simultáneamente los efectos placenteros y los aversivos, pero no tiene ninguna escala específica para la medida de la euforia[30].

En la mayoría de estudios se incluyen varios instrumentos de medida de los efectos subjetivos, puesto que la demostración de la concordancia entre los distintos cuestionarios es la principal evidencia de la fiabilidad de los resultados, y se utilizan la escala MBG del ARCI y la escala de cuánto le gusta como índices de la euforia inducida por la sustancia[23,24,31].

Además, para completar la descripción detallada de las sensaciones percibidas por los sujetos se añaden cuestionarios de listas de adjetivos, como el POMS o las EAV. En especial, para estudiar los cambios perceptivos y cognitivos inducidos por los fármacos alucinógenos se han construido algunos cuestionarios específicos: el cuestionario LSD-25, desarrollado para medir los efectos de la lisérgida[32]; el Hallucinogen Rating Scale (HRS), diseñado para estudiar los efectos de alucinógenos como la dimetiltriptamina[33]; y el Abnormer Psychicher Züstande (APZ, OAV-ASC), diseñado para estudiar los estados modificados de la consciencia[34]. Recientemente se ha desarrollado un cuestionario capaz de medir los efectos subjetivos de distintas sustancias con potencial de abuso y que incluye tanto las escalas de euforia y activación como los cambios perceptivos, emocionales y cognitivos (valoración de los efectos subjetivos de sustancias con potencial de abuso, VESSPA)[35]. El cuestionario consta de 36 ítems, formulados como una frase que se puntúa en una escala de Likert de 5 puntos, y proporciona 6 escalas de efectos: sedación, somatización ansiosa, cambios de percepción, placer y contacto social, actividad y energía, y sintomatología psicótica. Los resultados del cuestionario se han validado mediante entrevistas retrospectivas para los efectos del alcohol, cannabis, cocaína, LSD y MDMA, y se ha demostrado sensible para la medida de los efectos subjetivos en condiciones de laboratorio[36].

El análisis de los resultados de los estudios publicados ha demostrado la buena correlación entre los efectos subjetivos y las medidas conductuales, como la autoadministración, la preferencia o la discriminación, y también entre los distintos cuestionarios. Las sustancias que inducen conducta de autoadministración, preferencia o que son discriminadas positivamente comparadas con patrones de alto potencial de abuso, también son las que inducen mayores puntuaciones en las escalas relacionadas con el potencial de abuso, que coinciden entre los cuestionarios en el MBG y BG del ARCI, la escala de cuánto le gusta *(liking)* del SDQ o las EAV, las puntuaciones de activación, humor positivo y amigabilidad del POMS, o el valor monetario en la calle[24,25,31,37].

Evaluación clínica del potencial de abuso

Históricamente, el conocimiento del potencial de abuso o dependencia de un fármaco provenía de las evidencias epidemiológicas que indicaban la aparición de dependencia/abstinencia o que fuera objeto de abuso por determinados colectivos. Para evitarlo es necesario realizar estudios en animales y en humanos que intenten predecir lo que ocurrirá si el fármaco está disponible y que permitirán tomar medidas de tipo regulador para evitar el abuso o la dependencia.

La evaluación del potencial de abuso en humanos es necesaria para validar los resultados preclínicos en varios aspectos: extrapolación entre especies; ensayo de la medicación en su forma galénica y dosis comerciales; comparación de la relación dosis-respuesta para los efectos euforizantes, terapéuticos y tóxicos; estudiar los factores personales que modifican la capacidad reforzante del fármaco, como el precondicionamiento debido a la experiencia previa, la dependencia o el deseo de fármaco *(craving)*, o el condicionamiento contextual durante la intoxicación, y estudiar las posibles interacciones con otras sustancias. Además, sólo la medida de los efectos subjetivos puede aportar información acerca de la velocidad de inicio, curso temporal, máximo y duración de éstos en función de la dosis administrada y la vía de administración; la relación entre las dosis o concentraciones terapéuticas y aquellas que inducen efectos con potencial de abuso; cómo se establece el balance entre los efectos positivos y los negativos y su relación temporal, y qué modificación del estado de ánimo, el humor, los sentimientos, la sensibilidad o la percepción puede explicar su efecto reforzador positivo[22,38].

El objetivo final de esta evaluación es poder predecir la probabilidad de que la sustancia pueda consumirse de forma abusiva o recreacional

fuera del contexto médico y con consecuencias perjudiciales para el individuo o la sociedad, y para ello hay que distinguir dos aproximaciones complementarias. La primera considera el riesgo de la inducción al consumo en un sujeto sin experiencia previa, lo que correspondería al caso de las primeras experiencias de consumo de drogas o a la inducción de dependencia yatrógena en un paciente tras una indicación terapéutica del fármaco. La segunda considera la probabilidad de que se consuma por parte de los sujetos que buscan la experiencia de alteración de conciencia o estado de ánimo inducida por las sustancias psicoactivas. En la medida de los efectos subjetivos, especialmente la euforia, esta distinción es importante, puesto que la valoración de los efectos por parte del sujeto depende de este precondicionamiento. La mayoría de los estudios realizados con el primer supuesto se dirigen a la investigación de factores sobre la susceptibilidad individual al abuso y dependencia. Por el contrario, la mayoría de los estudios de evaluación del potencial de abuso en humanos utilizados en la detección de nuevos medicamentos adoptan el segundo supuesto[1].

Los principales tipos de estudios de potencial de abuso y dependencia en humanos se resumen en la tabla I. Como elemento común en la evaluación del potencial de abuso, los estudios consisten en experimentos realizados en una unidad o laboratorio especializado en ensayos clínicos. Su diseño requiere la asignación aleatoria de los fármacos y la existencia de una o varias condiciones control, y la administración enmascarada de los tratamientos (doble ciego).

Las condiciones control incluyen al menos placebo y una sustancia patrón positiva de conocido potencial de abuso. A veces también se incluyen patrones negativos (fármaco sin potencial de abuso). El fármaco patrón se adapta al estudio, en el caso de estimulantes se utiliza la dextroanfetamina, para opioides agonistas la morfina o la hidromorfona, para hipnóticos el pentobarbital, el triazolam o el flunitrazepam y para ansiolíticos el diazepam o el alprazolam. El fármaco en investigación se ensaya administrando una dosis única, pero se explora un amplio intervalo de diferentes dosis, al menos dos o más, para poder analizar la relación dosis-respuesta. Según el tipo de voluntarios las dosis deberán ser elevadas, especialmente en abusadores o ex adictos, ya que presentan una elevada tolerancia a los efectos farmacológicos[22].

La administración de los fármacos enmascarada con un método de doble ciego evita al máximo la influencia del precondicionamiento de los sujetos e investigadores y su influencia directa en las evaluaciones. En algunos estudios el enmascaramiento a doble ciego incluye no sólo la administración sino la información sobre los fármacos ensayados y los mismos objetivos del estudio. Así se manipula la información para disminuir las expectativas de los participantes. Normalmente se utilizan diseños cruzados, en los que cada sujeto recibe todas las condiciones de tratamiento separadas por un tiempo de blanqueo conveniente y en un orden balanceado entre individuos, para reducir el impacto de la variabilidad intersujetos[22].

La selección de los sujetos se rige por unos criterios muy detallados, adecuados a los objetivos del estudio, y generalmente requiere experiencia previa de consumo, en ocasiones específicamente de la sustancia evaluada. También se reclutan sujetos con dependencia actual, por ejemplo alcohólicos o pacientes incluidos en un programa de mantenimiento con metadona, en estudios directamente relacionados con abuso en estas poblaciones. Muchos de los estudios emplean ex adictos (opioides, cocaína) que aún consumen de forma irregular estas y otras sustancias.

En referencia a los aspectos éticos, los estudios se desarrollan siguiendo las recomendaciones de la Declaración de Helsinki, las normativas pertinentes de Buena Práctica Clínica y la legislación de cada país. Uno de los aspectos más controvertidos de la evaluación del potencial de abuso es la necesidad de administrar sustancias con potencial adictivo a humanos y las posibles consecuencias futuras de la participación. Se han publicado distintos estudios que han evaluado, en los sujetos que habían participado en experimentos en los que se administraron drogas, el uso de sustancias tras su participación. Los grupos comprendían desde ex adictos a personas que nunca habían tomado drogas *(naïf)* y que habían recibido opioides, cocaína y alcohol. Los resultados han demostrado que el hecho de participar en las investigaciones no ha incrementado el uso posterior de drogas. Incluso en alguno de ellos parece que se ha disminuido el consumo[39-41].

Los efectos se evalúan de forma repetida a lo largo de la sesión experimental (4-8 h), con medidas previas a la administración (basales) y posteriores, ajustadas al perfil farmacológico de la sustancia. Los efectos subjetivos se obtienen a través de las medidas de conducta verbal recogidas mediante cuestionarios específicos, como los comentados anteriormente. Los más utilizados son el ARCI, versión reducida de 49 ítems, EAV y

escala de clasificación de la sustancia (identificación de grupo farmacológico). En ocasiones los investigadores también evalúan los efectos que observan en los participantes con versiones heteroadministradas de cuestionarios como el SDQ. Además se registran los efectos sobre variables fisiológicas (presión arterial, frecuencia cardíaca, diámetro pupilar, temperatura corporal, electrocardiografía) y sobre el rendimiento psicomotor (p. ej., tiempo de reacción, sustitución de dígitos por símbolos [DSST], cálculo, pruebas de memoria, simulación de conducción de vehículos). Más recientemente algunos de los estudios han incluido registro de electroencefalografía computarizada o de imagen cerebral (p. ej., tomografía de emisión de positrones [PET]). Todas estas evaluaciones permiten verificar la exposición al fármaco a dosis activas, cuantificar la sensibilidad de los sujetos a los efectos, comprobar la relación entre la euforia y los efectos tóxicos, y establecer la equivalencia de potencia y de dosis de los fármacos ensayados[23-25,31,42,43].

A continuación se resumen las principales características metodológicas de los diferentes tipos de estudio (tabla I).

TABLA I
TIPOS DE ESTUDIO PARA EVALUAR EL POTENCIAL DE ABUSO Y DEPENDENCIA EN HUMANOS

Potencial de abuso
Estudios de comparación de efectos subjetivos, fisiológicos y sobre el rendimiento psicomotor
Estudios de autoadministración
Estudios de preferencia
Estudios de discriminación
Potencial de dependencia
Estudios de inducción de dependencia (física)
Estudios de sustitución en sujetos dependientes
Estudios de supresión de la abstinencia

Los estudios de comparación de efectos subjetivos (y fisiológicos) son los más comúnmente utilizados, y en ellos se comparan los efectos de una o varias dosis de un patrón, un fármaco test y placebo. Los sujetos participan en varias sesiones experimentales, y en cada una de ellas reciben de forma doble ciego y aleatoria una de las sustancias en estudio. Se evalúan los efectos subjetivos, fisiológicos y sobre el rendimiento psicomotor. Se han utilizado para la evaluación de opioides y analgésicos[44-47], psicoestimulantes[48-51], ansiolíticos e hipnóticos[52-54].

Los estudios de autoadministración son muy similares a los realizados en animales. Se administra al sujeto una dosis del fármaco en estudio o placebo y se permite que pueda tomar de forma voluntaria dosis adicionales de la sustancia que prefiera en esa u otras sesiones. En ocasiones se requiere la realización de una tarea (p. ej., apretar un botón o una tecla) para conseguir la sustancia o se puede elegir entre recibir la sustancia o ganar cierta cantidad de dinero. Se han utilizado para estudiar las propiedades reforzadoras del etanol, cocaína, psicoestimulantes y opioides[55].

Los estudios de preferencia *(drug preference o drug choice)* son un subtipo de los de autoadministración. En ellos los sujetos participan en al menos seis o siete sesiones experimentales. En las cuatro primeras reciben en dos ocasiones un control (placebo o fármaco conocido) y en otras dos el fármaco test. La administración de las dos opciones se acompaña al final de la sesión de una identificación mediante un código (p. ej., letra A o B), así se consigue que el participante asocie los efectos a la letra. En las dos o tres sesiones restantes se deja al participante que escoja mediante la letra lo que quiere tomar en esa sesión. Se considera que las sustancias reforzadoras tienen mayor probabilidad de ser escogidas. En ocasiones se permite que el sujeto tome varias dosis, ajustando así la dosis a su "preferencia o necesidad". En ocasiones se presentan tres alternativas para sobrepasar las limitaciones de una elección limitada a dos componentes. Se han utilizado para estimulantes y sedantes[56].

Los estudios de discriminación se basan en el hecho de que los fármacos producen estados mentales que pueden ser reconocidos (propiedades interoceptivas). Este reconocimiento permite que los sujetos clasifiquen las sustancias por sus propiedades. Los sujetos participan en muchas sesiones experimentales en diferentes fases. En las primeras seis sesiones (fase de entrenamiento) se entrena a los sujetos para que puedan reconocer las sustancias. Así se administran tres tratamientos en dos ocasiones: placebo, un fármaco control positivo para unos efectos (p. ej., un psicoestimulante, como la anfetamina) y un fármaco control positivo para otros efectos (p. ej., un sedante, como el triazolam). Al final de cada sesión se comunica a los sujetos que han recibido una sustancia mediante un código (p. ej., una letra: A, B o C). En las seis sesiones siguientes (fase de adquisición de la discrimina-

ción) se administran de nuevo las sustancias y el sujeto debe demostrar que sabe reconocerlas. Para demostrarlo se requiere una respuesta determinada (escribir la letra) y si acierta se premia la respuesta. Una vez que el sujeto demuestra que sabe discriminar pasa a las sesiones de test (fase de prueba o test). En éstas se administran de forma aleatoria las sustancias objeto de la discriminación (A, B, C) y la/s sustancia/s test, es decir, aquellas que queremos que se clasifiquen por su parecido a los efectos producidos por A, B o C. Las sustancias test similares a A, B o C serán clasificadas según ese código por el sujeto al final de cada sesión. Además de la medida de discriminación, se incluyen las evaluaciones generales antes descritas. Se han utilizado para opioides, estimulantes (cafeína, derivados anfetamínicos, cafeína), sedantes (benzodiacepinas, barbitúricos), nicotina, cannabis y cocaína. Son especialmente complejos, requieren mucho tiempo y su coste es elevado[57].

En cuanto a los tres tipos de estudios para evaluar el potencial de dependencia, se requiere la existencia de una dependencia física, y por ello son poco utilizados. Los estudios de inducción directa de dependencia precisan la administración de una sustancia durante un tiempo prolongado con el objetivo de producir una dependencia física. Permiten conocer la aparición de tolerancia si se requieren cada vez dosis más elevadas y la existencia de un síndrome de abstinencia al dejar de administrar de forma brusca el tratamiento. Son los estudios típicos de las épocas iniciales del ARC en Lexington, en los que se podía inducir dependencia a la morfina en 21 días. No se realizan en la actualidad por las objeciones bioéticas que supone la producción de una adicción premeditada. Los estudios de sustitución en pacientes dependientes se realizan en sujetos que presentan dependencia y que están estabilizados mediante tratamiento farmacológico específico. En Lexington los sujetos provenían de los estudios de inducción directa de dependencia antes comentados. En la actualidad se reclutan por ejemplo pacientes en mantenimiento con opioides agonistas (metadona). Los experimentos se basan en la sustitución de una dosis del agonista que están tomando por el fármaco que se quiere estudiar. Se observan los efectos subjetivos y la aparición o no de la sintomatología de abstinencia. Un fármaco que evite la sintomatología física de abstinencia podrá ser un candidato para el tratamiento de ese trastorno. Una variación de los anteriores son los llamados estudios de supresión de abstinencia. En ellos se deja que en pacientes dependientes se inicie la abstinencia física y se les administra entonces la sustancia en estudio para ver si puede suprimir los síntomas físicos de la retirada[58].

Conclusiones

La evaluación clínica del potencial de abuso es necesaria para el desarrollo de nuevos medicamentos en la toma de decisiones de comercialización y de control de la prescripción, y contribuye al uso adecuado de los fármacos y a la vigilancia dirigida de su consumo. Actualmente la metodología experimental para la evaluación del potencial de abuso en humanos está consolidada en sus aspectos básicos, y permite conocer los efectos subjetivos inducidos por los fármacos, su capacidad reforzadora positiva, y su toxicidad sobre el sistema vegetativo y sobre el rendimiento psicomotor. Los instrumentos para la medida de los efectos subjetivos se han mostrado sensibles, fiables y válidos, y pueden ser utilizados en todas las fases de la investigación clínica y adaptarse a los distintos diseños experimentales. Estos procedimientos se han integrado de forma necesaria en los planes de investigación de nuevos fármacos de la industria farmacéutica en la Unión Europea, lo que proporcionará un nuevo impulso al desarrollo de esta disciplina en nuestro ámbito.

Agradecimientos

Financiado con ayudas de la Generalitat de Catalunya (2001SGR00407) y Fondo de Investigación Sanitaria (97/1198, 98/0181, 00/0777, 01/1336, PI020824).

BIBLIOGRAFÍA

1. Jaffe JH, Jaffe FK. Historical perspectives on the use of subjective effects measures in assessing the abuse potential of drugs. En: Fischman MW, Mello NK, eds. Testing for abuse liability of drugs in humans. NIDA Res Mon 92. Washington, DC: US Government Printing Office, 1989; 43-72.
2. Jasinski DS. History of abuse liability testing in humans. En: Camí J, Bigelow GE, Griffiths RR, Drummond DC, eds. Clinical testing of drug abuse liability. Br J Addiction 1991; 86: 1559-1562.
3. Beecher HK. Experimental pharmacology and measurement of the subjective response. Science 1952; 116: 157-162.
4. Lasagna L, von Felsinger JM, Beecher HK. Drug-induced mood changes in man. 1. Observations on healthy subjects, chronically ill patients, and “postaddicts”. JAMA 1955; 157: 1006-1020.

5. USFDA-CDER. Guidelines for the clinical evaluation of antianxiety drugs. Rockville, MD: U.S. Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research; 1977 (Consultado en: http://www.fda.gov/cder/guidance/index.htm, 02/2003).
6. USFDA-CDER. Guidelines for the clinical evaluation of hypnotic drugs. Rockville, MD: US Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research; 1977 (Consultado en: http://www.fda.gov/cder/guidance/index.htm, 02/2003).
7. Johanson CE, Wolverton WL, Schuster CR. Evaluating laboratory models of drug dependence. En: Meltzer HY, ed. Psychopharmacology: the third generation of progress. Nueva York: Raven Press, 1987.
8. Bozarth MA. An overview of assessing drug reinforcement. En: Bozarth ME, ed. Methods of assessing the reinforcing properties of abused drugs. Nueva York: Springer-Verlag, 1987; 653-658[a].
9. Fischman MW, Mello NK. Testing for abuse liability of drugs in humans. NIDA Res Mon 92. Washington, DC: US Government Printing Office, 1989 (Consultado en: http://165.112.78.61/pdf/monographs/download92.html, 02/2003).
10. USFDA-Drug Abuse Advisory Committee. Draft guidelines for the abuse liability assessment. Presentado por GE Bigelow, Annual Scientific Meeting of the College on Problems of Drug Dependence. Richmond, VI; 1990.
11. Fischman MW, Johanson CE. Ethical and practical issues involved in behavioral pharmacology research that administers drugs of abuse to human volunteers. Behav Pharmacol 1998; 9: 479-498.
12. Varios autores. The Barcelona Conference. Barcelona meeting on clinical testing of drug abuse liability: consensus statement and recommendations. En: Camí J, Bigelow GE, Griffiths RR, Drummond DC, eds. Clinical testing of drug abuse liability. Br J Addiction 1991; 86: 1527-1528.
13. Altman J, Everitt BJ, Glautier S, Markou A, Nutt D, Oretti R et al. The biological, social and clinical bases of drug addiction: commentary and debate. Psychopharmacology (Berl) 1996; 125: 285-345.
14. Nutt DJ. Addiction: brain mechanisms and their treatment implications. Lancet 1996; 347: 31-36.
15. Volkow ND, Wang GJ, Fowler JS, Logan J, Gatley SJ, Gifford A et al. Prediction of reinforcing responses to psychostimulants in human brain dopamine D2 receptor levels. Am J Psychiatry 1999; 156: 1440-1443.
16. Volkow ND, Wang GJ, Fowler JS, Thanos P, Logan J, Gatley SJ et al. Brain DA D2 receptors predict reinforcing effects of stimulants in humans: replication study. Synapse 2002; 46: 79-82.
17. Howard LA, Sellers EM, Tyndale RF. The role of pharmacogenetically-variable cytochrome P450 enzymes in drug abuse and dependence. Pharmacogenomics 2002; 3: 185-199.
18. Lee NM, Smith AP. Opioid receptor polymorphisms and opioid abuse. Pharmacogenomics 2002; 3: 219-227.
19. García-Alonso F. Regulation and abuse liability testing of medicines in Europe beyond 1992. En: Camí J, Bigelow GE, Griffiths RR, Drummond DC, eds. Clinical testing of drug abuse liability. Br J Addiction 1991; 86: 1533-1536.
20. CPMP-EMEA. Note for guidance on clinical investigation of drugs used in weight control. London: CPMP-EMEA; 1996.
21. Real Decreto 711/2002, de 19 de julio, por el que se regula la farmacovigilancia de medicamentos de uso humano. BOE n.º 173, 20/07/2002: 26876-26882.
22. Henningfield JE, Johnson RE, Jasinski DR. Clinical procedures for the assessment of abuse potential. En: Bozarth ME, ed. Methods of assessing the reinforcing properties of abused drugs. Nueva York: Springer-Verlag, 1987; 573-590[a].
23. Jasinski DR, Henningfield JE. Human abuse liability assessment by measurement of subjective and physiological effects. En: Fischman MW, Mello NK, eds. Testing for abuse liability of drugs in humans. NIDA Res Mon 92. Washington, DC: US Government Printing Office, 1989; 73-100.
24. Fischman MW, Foltin RW. Utility of subjective-effects measurements in assessing abuse liability of drugs in humans. En: Camí J, Bigelow GE, Griffiths RR, Drummond DC, eds. Clinical testing of drug abuse liability. Br J Addiction 1991; 86: 1563-1570.
25. De Wit H, Griffiths RR. Testing the abuse liability of anxiolytic and hypnotic drugs in humans. Drug Alcohol Depend 1991; 28: 83-111.
26. Haertzen CA, Hickey JE. Addiction Research Center Inventory (ARCI): Measurement of euphoria and other drug effects. En: Bozarth ME, ed. Methods of assessing the reinforcing properties of abused drugs. Nueva York: Springer-Verlag, 1987; 489-524[a].
27. Lamas X, Farré M, Llorente M, Camí J. Spanish version of the 49-item short form of the Addiction Research Center Inventory (ARCI). Drug Alcohol Depend 1994; 35: 203-209.
28. Arasteh K, Poudevida S, Farré M, Roset PN, Camí J. Response patterns of the Spanish version of the 49-item short form of the Addiction Research Center Inventory after the use of sedatives, stimulants and opiods. Drug Alcohol Depend 1999; 55: 117-125.
29. Griffiths RR, McLeod DR, Bigelow GE, Liebson I, Roache JD, Nowowieski P. Comparison of diazepam and oxazepam: preference, liking, and extent of abuse. J Pharmacol Exp Ther 1984; 229: 501-508.
30. Johanson CE, Uhlenhuth EH. Drug preference and mood in humans: diazepam. Psychopharmacology (Berl) 1980; 71: 269-273.
31. Preston KL, Walsh SL. Evaluating abuse liability: methods and predictive value. En: Karch SB, ed. Drug abuse handbook. Boca Raton: CRC Press, 1998.

[a]Consultado en: http://www.addictionscience.net/Assessing_Drug_Reinforcement.htm, 02/2003)

32. Linton HB, Langs RJ. Subjective reactions to lysergic acid diethylamide (LSD-25). Arch Gen Psychiatry 1962; 6: 36-52.
33. Strassman QJ, Qualls CR, Berg LM. Dose-response study of N,N-dimethyltryptamine in humans. II. Subjective effects and preliminary results of a new rating scale. Arch Gen Psychiatry 1994; 51: 98-108.
34. Dittrich A, von Arx S, Staub S. International Study on Altered States of Consciousness (ISAC): summary of the results. German J Psychology 1985; 9: 319-339.
35. Poudevida S, Farré M, Roset PN, Camí J. Construcción de un cuestionario para la Valoración de los Efectos Subjetivos de Sustancias con Potencial de Abuso (VESSPA): Evaluación del éxtasis. Adicciones 2003; 15: 115-126.
36. Poudevida S, Farré M, Roset PN, Camí J. Development and validation of a new questionnaire for evaluation of the subjective effects induced by substances with abuse potential (VESSPA-SEE): Evaluation of ecstasy. Trastornos Adictivos 2003; 5: 186-187.
37. Fischman MW. Relationship between self-reported drug effects and their reinforcing effects: studies with stimulant drugs. En: Fischman MW, Mello NK, eds. Testing for abuse liability of drugs in humans. NIDA Res Mon 92. Washington, DC: US Government Printing Office, 1989; 211-230.
38. Vocci FJ. The necessity and utility of abuse liablility evaluations in human subjects. En: Camí J, Bigelow GE, Griffiths RR, Drummond DC, eds. Clinical testing of drug abuse liability. Br J Addiction 1991; 86: 1537-1542.
39. Fischman MW, Johanson CE. Ethical and practical issues involved in behavioral pharmacology research that administerers drugs of abuse to human volunteers. Behav Pharmacol 1998; 9: 479-498.
40. Kaufman MJ, Levin JM, Kukes TJ, Villafuerte RA, Hennen J, Lukas SE et al. Illicit cocaine use patterns in intravenous-naive cocaine users following investigational intravenous cocaine administration. Drug Alcohol Depend 2000; 58: 35-42.
41. Kirulis K, Zacny JP. Participation of non-drug abusers in opioid studies and subsequent reported drug use. En: Harris LD, ed. Problems of drug dependence 1998. NIDA Res Mon 179. Washington: National Institute Health Publications, 1999; 309.
42. Kleber HD. Drug abuse liability testing: human subject issues. En: Fischman MW, Mello NK, eds. Testing for abuse liability of drugs in humans. NIDA Res Mon 92. Washington, DC: US Government Printing Office, 1989; 341-356.
43. Roache JD. Performance and physiological measures in abuse liability evaluation. En: Camí J, Bigelow GE, Griffiths RR, Drummond DC, eds. Clinical testing of drug abuse liability. Br J Addiction 1991; 86: 1595-1600.
44. Weinhold LL, Bigelow GE, Preston K, Farré M, Liebson IA. Buprenorphine alone and in combination with naloxone in nondependent humans. Drug Alcohol Depend 1992; 30: 263-274.
45. Lamas X, Farré M, Camí J. Acute effects of tramadol in methadone-maintained volunteers. Drugs 1994; 47(Supl. 1): 39-43.
46. Lamas X, Farré M, Camí J. Acute effects of pentazocine, naloxone and morphine in opioid-dependent volunteers. J Pharmacol Exp Ther 1994; 268: 1485-1492.
47. Lamas X, Farré M, Moreno V, Camí J. Effects of morphine in nondependent humans: A meta-analysis. Drug Alcohol Depend 1994; 36: 147-152.
48. Farré M, de la Torre R, Llorente M, Lamas X, Ugena B, Segura J et al. Alcohol and cocaine interactions in humans. J Pharmacol Exp Ther 1993; 266: 1364-1373.
49. Farré M, de la Torre R, González ML, Terán MT, Roset PN, Menoyo E et al. Cocaine and alcohol interactions in humans: neuroendocrine effects and cocaethylene metabolism. J Pharmacol Exp Ther 1997; 283: 164-176.
50. Camí J, Farré M, Mas M, Roset PN, Poudevida S, Mas A et al. Human pharmacology of 3,4-Methylenedioxymethamphetamine ("Ecstasy"): Psychomotor performance and subjective effects. J Clin Psychopharmacol 2000; 20: 455-466.
51. Hernández-López C, Farré M, Roset PN, Menoyo E, Pizarro N, Ortuño J et al. 3,4-Methylenedioxymethamphetamine (MDMA, Ecstasy) and Alcohol Interactions in Humans: Psychomotor Performance, Subjective Effects, and Pharmacokinetics. J Pharmacology Exp Ther 2002; 300: 236-244.
52. Farré M, Terán MT, Camí J. A comparison of the acute behavioral effects of flunitrazepam and triazolam in healthy volunteers. Psychopharmacology (Berl) 1996; 125: 1-12.
53. Farré M, Terán MT, Roset PN, Torrens M, Mas M, Camí J. Abuse liability of flunitrazepam among methadone-maintained patients. Psychopharmacology (Berl) 1998; 140: 486-495.
54. Roset P, Farré M, de la Torre R, Mas M, Menoyo E, Hernández C et al. Modulation of rate of onset and intensity of drug effects reduces abuse potential in healthy males. Drug Alcohol Depend 2001; 64: 285-298.
55. Henningfield JE, Cohen C, Heishman SJ. Drug self-administration methods in abuse liability evaluation. Br J Addict 1991; 86: 1571-1577.
56. De Wit H. Preference procedures for testing the abuse liability of drugs in humans. Br J Addict 1991; 86: 1579-1586.
57. Preston KL. Drug discrimination methods in human drug abuse liability evaluation. Br J Addict 1991; 86: 1587-1594.
58. Preston KL. Drug abstinence effects: opioids. Br J Addict 1991; 86: 1641-1646.

Repercusiones asistenciales de la adicción: perspectiva de una unidad de hospitalización psiquiátrica

M.A. Oliveras Valenzuela, L. García Fernández y A.G. Alcántara Lapaz

Departamento de Medicina y Psiquiatría, Campus de San Juan, Servicio de Psiquiatría, Hospital Universitario San Juan de Alicante.

Introducción

Por patología dual se entiende la coexistencia de una drogodependencia y un trastorno mental definido de forma simultánea en un mismo paciente. El término comenzó a utilizarse en la década de 1970 al detectar un grupo de pacientes que padecían ambos trastornos. Estudios epidemiológicos recientes apuntan que la comorbilidad ha ido incrementándose progresivamente desde principios de la última década para pasar a convertirse en la regla y no en la excepción[1]. Se calcula que hasta el 60% de pacientes que acuden de forma regular a los servicios de salud mental presentan abuso de tóxicos[2], hecho que ensombrece considerablemente el pronóstico de ambas entidades.

Los trastornos por consumo de sustancias *per se* constituyen un importante problema de salud pública y un factor de mal pronóstico cuando se asocian a patología psiquiátrica. Parece que la motivación para el consumo de cualquier sustancia psicoactiva está relacionada con los efectos agudos o crónicos de estos productos sobre el estado de ánimo, la función cognitiva y la conducta, y que en algunos individuos, ya sean o no enfermos mentales, las alteraciones subjetivas que acompañan la intoxicación son experimentadas como fenómenos muy placenteros, hecho que conduce al consumo repetido[3].

El concepto sindrómico de la psiquiatría y la heterogeneidad en cuanto a etiología, forma de presentación, respuesta al tratamiento y pronóstico de las enfermedades mentales, junto con la alta tasa de consumo de tóxicos en pacientes psiquiátricos, la conocida utilización de drogas para mitigar o atenuar síntomas psicológicos, y la frecuente negación del consumo de tóxicos que llega hasta el 50% en algunas series[4], entorpecen aún más el diagnóstico etiológico.

Si a lo anterior añadimos que tanto la intoxicación como la abstinencia a drogas pueden evolucionar con síntomas psiquiátricos, y que los efectos de algunos tóxicos a largo plazo son indistinguibles de determinados trastornos psiquiátricos endógenos, resulta indudable plantearse si la enfermedad mental es consecuencia del abuso de tóxicos o si por el contrario el consumo de sustancias psicoactivas en población psiquiátrica es una manifestación más de la enfermedad mental. A este respecto se han postulado diversas hipótesis etiológicas:

1. El abuso de sustancias psicoactivas es el factor causal de la enfermedad mental, tal como apuntan Andreasson y cols[5], al concluir que entre los consumidores habituales de cannabis el riesgo de desarrollar esquizofrenia es seis veces mayor que en el grupo de los no consumidores, y Rosenthal y Pliner[6], cuando sugiere que el uso de sustancias psicoactivas puede precipitar la manifestación de la esquizofrenia en pacientes con una vulnerabilidad subyacente.

2. El abuso de sustancias es una manifestación más de la enfermedad mental.

3. Existe una alteración en el ámbito neuroquímico que puede aumentar la vulnerabilidad tanto a la enfermedad mental como al abuso de sustancias según sistemas de refuerzo y recompensa.

4. El hecho de consumir ejerce un efecto socializador proporcionando a los individuos más aislados y socialmente limitados una identidad y un grupo social[7]. Además, se ha identificado un grupo de pacientes para los que es aceptable tener un problema de drogas, pero no un problema psiquiátrico[8].

5. Modelo de la automedicación que sugiere que el enfermo mental usa las drogas para aliviar sus síntomas.

6. Modelo de la independencia que sugiere que ambos trastornos coinciden porque afectan al mismo grupo poblacional.

Se ha producido una escisión en el abordaje de este tipo de pacientes secundaria a la estructura de los dispositivos asistenciales destinados a ello que tratan de forma independiente a pacientes psiquiátricos, en unidades de salud mental y psiquiatría, y a usuarios de tóxicos que acuden a unidades especializadas en conductas adictivas. La práctica clínica ha demostrado que pacientes psiquiátricos afectados, además, por una drogadicción son difícilmente manejables por la psiquiatría tradicional en solitario, y menos aún por los dispositivos de asistencia a drogodependientes. Las unidades de hospitalización psiquiátrica están preparadas para la identificación del consumo, información, estabilización de la situación de crisis y derivación a un centro especializado, pero teniendo en cuenta la alta tasa de reingresos por descompensación de la patología de base en enfermos mentales causada por el abuso de tóxicos y viceversa parece justificado analizar si en nuestro medio existen protocolos específicos eficaces para manejar pacientes afectados por patología dual[9].

Las actuales clasificaciones internacionales, DSM-IV-TR y CIE-10, dedican un apartado a los trastornos relacionados con sustancias (Anexos 1 y 2).

Objetivos

Pretendemos describir el patrón de consumo de tóxicos de la población psiquiátrica que ingresa a cargo de psiquiatría, las características psicopatológicas y comportamentales que motivan el internamiento de usuarios de drogas legales o ilegales en la unidad, y, en definitiva, la prevalencia de patología dual en una Unidad de Hospitalización Psiquiátrica.

Metodología

Diseño

Estudio observacional transversal.

Ámbito

Unidad de Hospitalización de Psiquiatría del Hospital Universitario de San Juan, durante septiembre, octubre, noviembre y diciembre de 2002.

Población

La muestra del estudio la componen 206 pacientes de ambos sexos, 118 varones y 88 mujeres, de edades comprendidas entre 15 y 76 años, que han sido hospitalizados en nuestra Unidad durante los últimos 4 meses del año 2002.

Criterios de inclusión

- Todo paciente que ingresa a cargo de la Unidad de Psiquiatría.

Criterios de exclusión

- Paciente valorado en urgencias que no ha requerido ingreso en planta.
- Paciente valorado en observación que no ha requerido ingreso en planta.
- Pacientes valorados en *interconsulta* que no han requerido traslado a planta.
- Pacientes hospitalizadas a cargo de la Unidad de Trastornos Alimentarios.
- Pacientes que solicitan *alta voluntaria* y cuyo ingreso en la Unidad ha sido inferior a 24 h.
- Sin colaboración del paciente.
- Sin disponibilidad de la historia clínica.

Variables

- Variables sociodemográficas: *edad y sexo.*
- Variables relativas al ingreso: *fecha de ingreso, fecha de alta, duración del ingreso medida en días y reingresos,* que hace referencia al número total de ingresos de un paciente determinado durante los cuatro meses en los que se recogieron los datos.
- Variables relativas a la enfermedad: *motivo del ingreso* donde se ha distinguido si el paciente ingresa por alteraciones comportamentales, heteroagresividad o problemática familiar, social y/o legal, o si ingresa por descompensación psicótica, ansiosa o afectiva de su patología de base*, diagnóstico CIE-10* y *antecedentes familiares*.
- Variables relativas al consumo de tóxicos: *inicio del consumo*, indicando si el consumo fue previo al diagnóstico de la enfermedad mental o si por el contrario el consumo se inició después de haber sido diagnosticado el trastorno psiquiátrico, *tipo de sustancia que el paciente consume* (tabaco, alcohol, opioides, cannabinoides, hipnóticos, cocaína, estimulantes, alucinógenos u otros psicotropos), y *determinación de drogas de abuso en orina*, donde se especifica si la información se obtuvo directamente de la entrevista al paciente o a los familiares, a través de la determinación de tóxicos en orina o ambos.
- Variable relativa a la *derivación* del paciente: indicando el dispositivo asistencial donde el paciente es remitido tras el alta (unidad de salud mental, unidad de conductas adictivas, centro de media o larga estancia, médico de atención primaria u otros).

Determinación de drogas de abuso en orina

Disponemos de un test que permite detectar consumo de opiáceos, cocaína, anfetaminas y benzodiacepinas.

Recogida de datos

Se ha diseñado un cuaderno de recogida de datos para cada paciente que incluye las variables comentadas en el apartado anterior y los resultados de las pruebas de detección de drogas de abuso en orina. Se ha diseñado también una base de datos de SPSS específica para este estudio, para coordinar y vincular adecuadamente los datos de cada paciente procedentes del cuaderno de recogida de datos.

Procedimientos estadísticos/análisis de los resultados

Se ha utilizado el paquete estadístico SPSS 11 para Windows. Se ha realizado un análisis descriptivo de la población a estudio. Para comparación de medias hemos usado la T de Student en muestras de distribución normal y la U de Man Whitney en datos de distribución no paramétrica. Se han comparado proporciones mediante el test de ji^2 de Pearson. Todos los valores de p serán estimados por dos colas y se considerarán significativos cuando sean inferiores a 0,05.

Descripción de resultados

Durante los últimos 4 meses del año 2002 ha habido un total de 206 ingresos. De éstos 88 corresponden a mujeres (42,7%) y 118 a varones (57,3%). El intervalo de edad ha oscilado entre 15 y 76 años, siendo la edad media de 37,8 años (DE: 12,9) (figs. 1 y 2).

En cuanto a la distribución por patologías, y basándonos en el diagnóstico principal que recibió el paciente al alta, hemos obtenido los resultados que se reflejan en la figura 3. El 15,6% de los ingresos se pueden considerar consecuencia directa o indirecta del consumo de tóxicos.

El 68,7% de la población de estudio consume alguna sustancia psicotropa frente al 31,3% que se mantiene abstinente (tabla I). La politoxicomanía es frecuente, del total de consumidores de tóxicos legales y/o ilegales el 63% consume más de una sustancia, siendo el alcohol la droga preferente seguida del cannabis.

La tabla I muestra la tasa de consumo de tóxicos de las distintas entidades diagnósticas. En esta tabla no se ha incluido a pacientes diagnosticados de trastornos ansiosos, depresivos, pacientes diagnosticados de retraso mental o deterioro cognitivo, ya que al ser un grupo pequeño los resultados obtenidos no se pueden considerar estadísticamente significativos. No obstante, nos parece interesante señalar que el 25% de pacientes diagnosticados de trastorno depresivo moderado-grave declaraban consumo perjudicial de alcohol (tabla II).

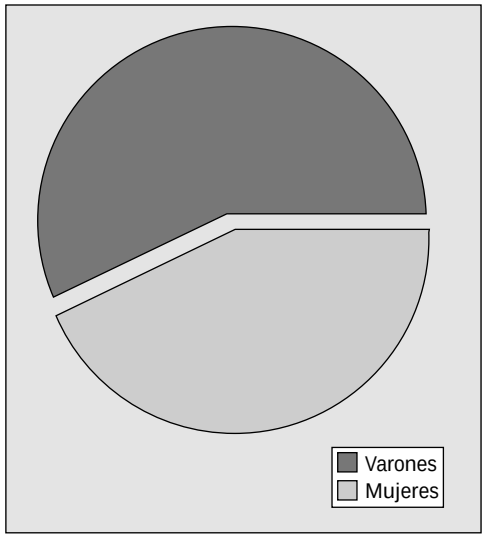


Fig. 1. Distribución por sexos.

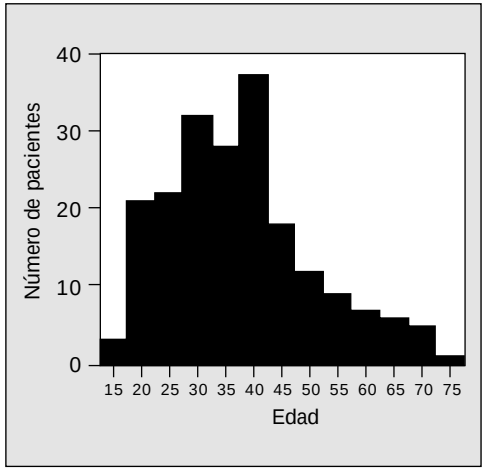


Fig. 2. Distribución según edad.

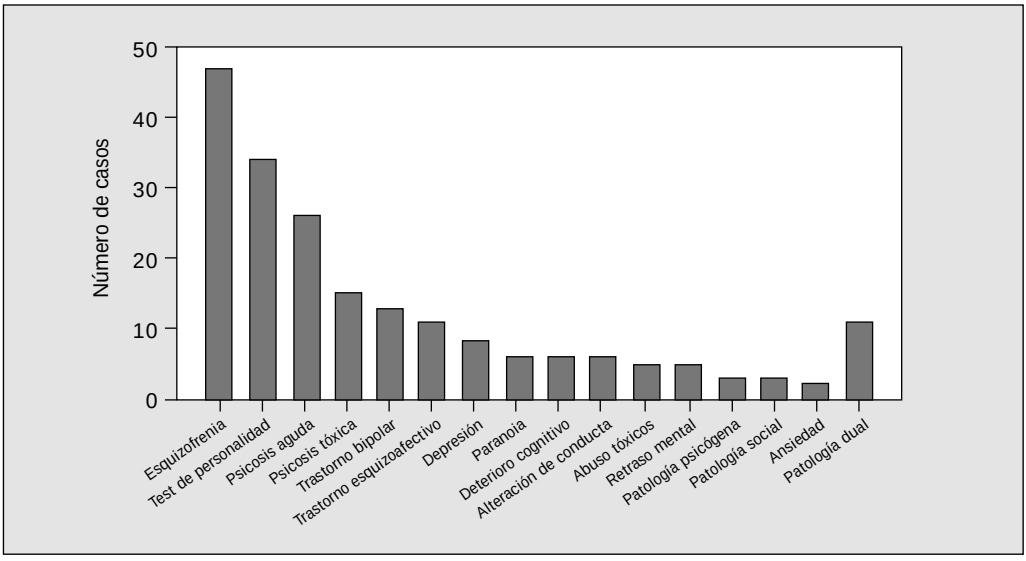


Fig. 3. Distribución por entidades clínicas.

TABLA I
DESCRIPCIÓN DE SUSTANCIAS DE CONSUMO

Tabaco: 60,8%
Alcohol: 35,4%
Cannabinoides: 23%
Cocaína: 16,5%
Estimulantes y alucinógenos: 14,4%
Programa de metadona: 3%
Heroína u otros opioides: 2,5%

Al relacionar el diagnóstico con la duración del ingreso hemos observado que los ingresos más cortos son aquellos de patologías que se atribuyen exclusivamente al consumo de tóxicos, con una estancia media de 2,7 días. Tan sólo un paciente catalogado de psicosis tóxica y trastorno de la personalidad reingresó en tres ocasiones durante la duración del estudio. Sólo un paciente diagnosticado de abuso de alcohol y trastorno facticio requirió dos ingresos en UHP durante el periodo de estudio. Para un mismo grupo diagnóstico la duración del ingreso también es más corta en pacientes consumidores de tóxicos (fig. 4).

Al valorar la duración del ingreso en función del tipo de tóxico consumido, observamos que para la muestra en general los ingresos son más cortos en pacientes que consumen sustancias psicoactivas. Esta relación es constante para todas las drogas estudiadas, siendo la diferencia estadísticamente significativa para el grupo de drogas en general ($p < 0,027$), alcohol ($p < 0,005$) y cocaína ($p < 0,013$) (fig. 5).

El grupo de patología dual propiamente dicha (pacientes diagnosticados de un trastorno mental y un trastorno por abuso de sustancias) está compuesto por 13 pacientes diagnosticados de dependencia o abuso de alcohol, de los cuales tres pertenecen al grupo de trastornos de la personalidad clúster B, tres están diagnosticados de esquizofrenia paranoide, dos se han catalogado como trastorno psicótico agudo polimorfo sin síntomas de esquizofrenia, uno como trastorno por ideas delirantes persistentes y uno como trastorno facticio; y 3 pacientes diagnosticados de consumo perjudicial de cocaína y trastorno de la personalidad. No obstante, los datos del estudio apuntan a que la prevalencia real de patología dual es muy superior a la que indicamos en nuestros informes de alta.

El 49% de nuestra población refiere consumo de tóxicos previo al diagnóstico del trastorno mental. En el 51% restante el consumo fue posterior al diagnóstico psiquiátrico. Cuando subclasificamos en función de entidades diagnósticas específicas aparecen resultados interesantes: *a)* el 90% de los pacientes diagnosticados de trastorno

TABLA II
TASA DE CONSUMO DE TÓXICOS EN LAS DISTINTAS ENTIDADES CLÍNICAS

	Nicotina (%)	*Alcohol (%)*	*Marihuana (%)*	*Cocaína (%)*	*Psicoestimulantes (%)*
Esquizofrenia	59,5	27,6	14,8	8,5	6,4
Trastorno esquizoafectivo	72,7	36,4	10	30	20
Trastorno bipolar	46,1	15,3	15,3	7,7	7,7
Trastorno por ideas delirantes persistentes	50	50	50	12,1	0
Trastorno de la personalidad	45,4	17,6	18,1	11,7	2,9
Trastorno psicótico agudo y trastorno esquizofreniforme	84,6	30,7	32,4	19,2	34,6
Trastorno psicótico inducido por tóxicos y trastornos por abuso y dependencia	100	80	55	65	40

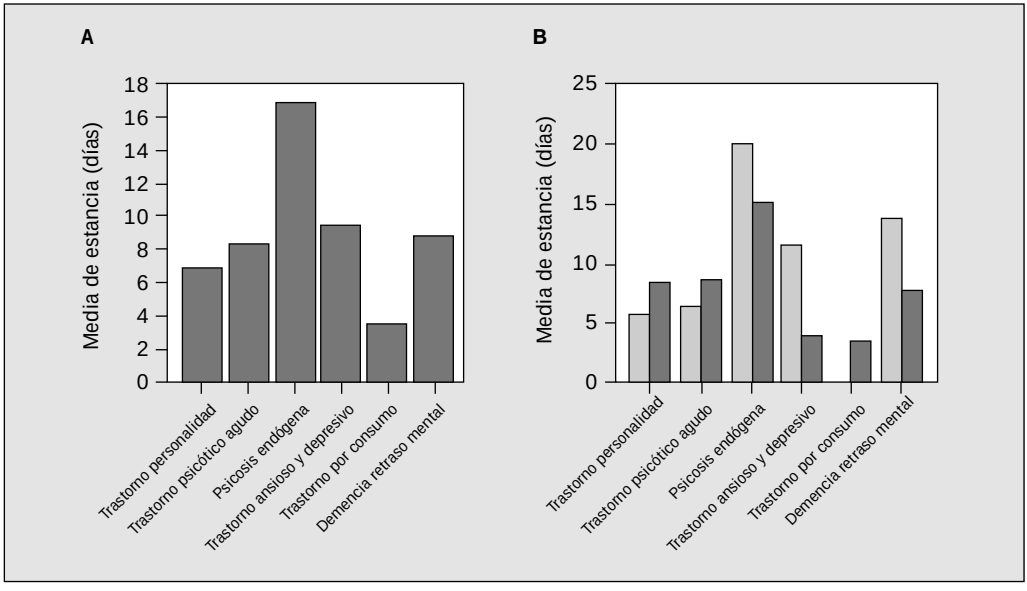


Fig. 4. A) Estancias según patología. B) Duración del ingreso según consumo de tóxicos.

psicótico agudo, trastorno esquizofreniforme y trastorno psicótico agudo inducido por tóxicos presenta un consumo de tóxicos previo al diagnóstico psiquiátrico frente al resto de la muestra en la que el consumo de sustancias psicoactivas sólo precede a la enfermedad mental en el 37% de los casos ($p < 0,001$), y *b)* en el 75% de los pacientes diagnosticados de esquizofrenia, trastor-

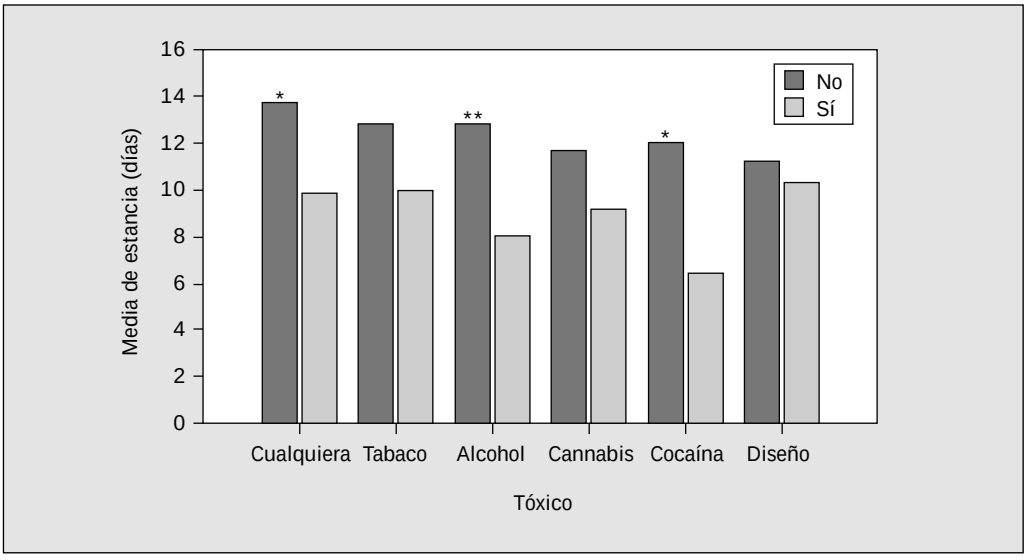


*Fig. 5. Estancia según tóxico. *p < 0,05; **p < 0,005.*

no esquizoafectivo, trastorno bipolar y trastorno por ideas delirantes persistentes el consumo de tóxicos fue posterior al inicio de la enfermedad mental, y se ha considerado un síntoma más del cuadro clínico; en el resto de la población a estudio el inicio del consumo fue posterior al diagnóstico en el 36% de los casos (p < 0,001).

Con respecto a si el ingreso fue motivado por alteraciones comportamentales o por sintomatología psiquiátrica (descompensación psicótica, afectiva o ansiosa de la enfermedad de base), no hemos obtenido diferencias relevantes. En el grupo de las psicosis inducidas por tóxicos y del abuso de tóxicos el 50% ingresa por alteraciones de conducta y el 50% restante por síntomas psicóticos, afectivos o ansiosos. Es decir, que en función de la forma de presentación clínica no es posible realizar un diagnóstico transversal para diferenciar trastornos debidos a sustancias psicoactivas de psicosis endógenas.

En cuanto a la distribución por sexos, el 79% de los varones consumen tóxicos frente al 56% de mujeres, siendo la diferencia de porcentajes estadísticamente significativa (p < 0,001). Esta relación se mantiene constante para tabaco (p < 0,05), alcohol (p < 0,037) y cannabis (p < 0,019), presentando los varones mayores tasas de consumo. En lo referente a cocaína y psicoestimulantes no se han detectado diferencias de consumo significativas en relación con el sexo. Todos los pacientes del estudio consumidores de heroína o en programa sustitutivo con metadona resultaron ser varones (tabla III).

En cuanto a la distribución del consumo de tóxicos en función de la edad la tabla III muestra tasas de consumo mayores en población más joven de forma significativa para todas las drogas, excepto para el alcohol, en las que no existen diferencias estadísticamente significativas entre el grupo de consumidores y el de no consumidores (tabla IV).

No hemos encontrado relación entre la derivación de los pacientes al alta y el diagnóstico.

Dificultades y limitaciones del estudio

Esta muestra es de extracción clínica, lo que puede suponer un sesgo a la hora de extrapolar los resultados a población normal o a población ambulatoria.

No se ha solicitado determinación de drogas de abuso en orina a todo paciente de forma protocolarizada el día del ingreso, de forma que los resultados pueden infravalorar el consumo real de tóxicos. Hemos considerado que el paciente ha consumido por evidencias clínicas, información directa de paciente o familia y resultados positivos en la determinación analítica. En algunas de las historias clínicas existen discrepancias entre las fuentes.

TABLA III
DISTRIBUCIÓN DEL CONSUMO DE TÓXICOS EN FUNCIÓN DEL SEXO

	Varones (%)	*Mujeres (%)*	*p*
Tabaco	68	48	0,050
Alcohol	41	26	0,037
Cannabis	29	15	0,019
Cocaína	17	14	NS
Psicoestimulantes	16	11	NS

TABLA IV
RELACIÓN ENTRE EL CONSUMO DE TÓXICOS Y LA EDAD DE LA MUESTRA

	N	*Edad* ($\bar{X}$)	*DE*	*p*
Consumo de tóxicos en general				
Consumidores	138	34	10,3	0,001
No consumidores	63	44	15	
Consumo de tabaco				
Consumidores	120	33	9,8	0,001
No consumidores	80	44	14,6	0,001
Consumo de alcohol				
Consumidores	71	37	11	NS
No consumidores	130	38	13	
Consumo de cannabis				
Consumidores	47	28,9	8,1	0,001
No consumidores	153	40	12	
Consumo de cocaína				
Consumidores	32	31	9,5	0,001
No consumidores	168	39	13	
Consumo de alucinógenos y psicoestimulantes				
Consumidores	29	27	7,8	0,001
No consumidores	172	39	12	

TABLA V
DATOS QUE ORIENTAN HACIA UN TRASTORNO MENTAL
O HACIA UN TRASTORNO INDUCIDO

Datos a favor de un trastorno mental	*Datos a favor de un trastorno inducido*
El comienzo precede al consumo	Posterior al consumo
Persistencia del trastorno tras la abstinencia	Remisión total de la sintomatología
Existencia de antecedentes familiares	Rápida respuesta al tratamiento
Mayor duración del ingreso	Presencia de efectos adversos
	Frecuente alteración de la conciencia

No se ha considerado la cafeína como un tóxico y no se ha cuantificado su consumo. Tampoco se ha indagado acerca del autoconsumo de psicofármacos, o de la interacción de las drogas con los diferentes tratamientos farmacológicos.

Somos conscientes, además, de estar incurriendo en *el perjuicio de Berkson*, puesto que

existe una predisposición a ingresar a pacientes con más de una enfermedad, hecho que se acentúa en hospitales de tercer nivel o en unidades especializadas como la nuestra, por lo que nuestros casos son autoseleccionados. Podemos cometer *la falacia de Neyman*, puesto que en estudios observacionales como el que presentamos inciden factores que promueven una supervivencia más larga para los casos de incidencia.

Discusión

La patología dual no es sólo un *importante problema de salud pública*, como indican los planes de salud mental más recientes, es, además, un problema real con el que los clínicos nos enfrentamos casi a diario. La investigación está todavía muy alejada de la práctica clínica, la ausencia de marcadores biológicos que se puedan aplicar (sólo disponemos de pruebas toxicológicas en orina y aliento), junto con la falta de escalas (tanto la CAGE como el MAST son escalas de cribado) o instrumentos que permitan discernir en cada presentación clínica si predomina lo psicótico endógeno frente a lo tóxico y la dirección en que pudieran actuar ambas dimensiones con las consiguientes dificultades diagnósticas y su influencia en la actitud terapéutica y pronóstica.

La determinación de tóxicos en orina no ha demostrado ser una prueba útil en nuestro estudio, ya que no se ha obtenido una relación significativa entre resultados positivos y diagnóstico de trastorno mental y del comportamiento inducidos por tóxicos.

El 68,7% de nuestra población consume algún tipo de tóxico. Los datos sugieren que los pacientes que abusan de sustancias lo suelen hacer de dos o tres, siendo el grupo más pequeño el que lo hace de una sola[10], la tasa de politoxicomanía en el estudio es del 63%, siendo el tabaco, el alcohol y la marihuana los tóxicos más frecuentes. El 15,6% de nuestros ingresos están relacionados con las drogodependencias, el porcentaje es similar al de los trastornos de la personalidad y algo superior al que ocupan el grupo de trastornos bipolares y esquizoafectivos.

La duración del ingreso es más corta en consumidores de tóxicos.

Ser varón, joven, convivir con consumidores, tener antecedentes familiares de abuso de sustancias y un pobre ajuste social, económico y personal se considera favorecedores del abuso en población no psiquiátrica. Excepto los antecedentes familiares y el entorno el resto de factores de riesgo ha demostrado ser válido en nuestra muestra.

Llama la atención que las tasas de patología dual en pacientes hospitalizados son mayores que en aquellos que acuden a unidades de salud mental (USM). Esta diferencia es todavía más alta en pacientes seguidos en unidades de conductas adictivas (UCA), según estudios epidemiológicos recientes. Las tasas de patología dual para la esquizofrenia oscilan entre un 15 y un 60% si se considera la prevalencia a lo largo de la vida (Muesser et al, 1992), la droga de preferencia suele ser el alcohol (25-50%; Cuffel et al, 1992), cannabis (14-40%; De Quardo et al, 1994), cocaína (15-37%; Brady et al, 1991), estimulantes y alucinógenos (14-18%; Muesser et al, 1992)[11].

La comorbilidad es un factor de mal pronóstico, se ha relacionado con inicio más temprano de las psicosis, incumplimiento terapéutico, mayor frecuencia de recaídas y hospitalización, mayor frecuencia de aparición de distonías tardías, heteroagresividad, autólisis, desempleo, vagabundeo y problemática familiar, social y legal.

Existe una tendencia en la muestra que indica la ausencia de antecedentes familiares en pacientes diagnosticados de trastornos inducidos por sustancias piscoactivas para todas las drogas excepto para el alcohol. Para el resto de patologías se detecta una tendencia a presentar antecedentes familiares de tipo psiquiátrico sin ser la diferencia de porcentajes significativa.

Para concluir exponemos los datos que orientan hacia un trastorno mental o hacia uno inducido (tabla V), insistiendo en que la patología dual es una realidad clínica creciente que requiere de la elaboración de protocolos de detección y diagnóstico específicos que posibiliten un tratamiento farmacológico, psicológico, motivacional, psicosocial y de prevención de recaídas, y que tanto psiquiatras como especialistas en drogodependencias deberían elaborar guías de actuación conjuntamente[12].

BIBLIOGRAFÍA

1. Brems C, Jonhson ME, Wells RS, Burns R, Kletti N. Rate and sequelae of the coexistence of substance use and other psychiatric disorders. Int J Circumpolar Health 2002; 61(3): 224-244.
2. Katz G, Shufman E, Knobler HY, Joffe M, Bar-hamburger R, Durst R. Drugs abuse among inpatients requiring psychiatric hospitalization. Harefuah 2000; 138(12): 1015-1018.
3. Guía clínica para el tratamiento de los trastornos por consumo de sustancias. Ars Médica 2001.
4. Kosten TR, Ziedonis DM. Substance abuse and schizophrenia. Editor's introduction. Schizophr Bull 1997; 23: 181-186.

5. Andreasson S, Engstrom A, Allebeck P, Rydenberg U. Cannabis and schizophrenia: a longitudinal study of Swedish conscripts. Lancet 1987; II: 1483-1486.
6. Rosenthal RN, Miner ChR. Diferential diagnosis of substance abuse induced psychosis and schizophrenia in patients with substance use disorder. Schizophr Bull 1997; 23: 187-194.
7. Dixon L, Haas G, Weiden P, Sweeney J, Frances A. Acute effects of drug abuse in schizophrenic patients: clinical observations and patients self reports. Schizophr Bull 1990; 16: 69-79.
8. Brooner RK, King VL, Kidorf M, Schmidt CW, Bigelow GE. Psychiatric and substance abuse comorbility among treatmentseeking opioid abusers. Arch Gen Psychiatry 1997; 54: 71-80.
9. Gastó C. Valoración crítica de la investigación actual en psiquiatría. UpDate Psiquiatría. Barcelona: Masson, 2002.
10. Dalman A, Bergman B, Brismar B. Psychotic disorders among inpatients with abuse of cannabis, amphetamine and opiates. Do dopaminergic stimulators facilitate psychotic illness?. Eur Psychiatry 1999; 14(7): 366-371.
11. Ziedonis D, Nickoau C. Abuso de sustancias en pacientes con esquizofrenia. En: Esquizofrenia y patologías comórbidas. Barcelona: Masson, 2003.
12. Casas M, Roncero C, Duro P, Pinet C, Ribalta E. Abordaje de la dependencia de opiáceos y atención primaria. Psiquiatría y Atención Primaria 2001; 2: 4-12.

ANEXO 1

F10-F19 Trastornos mentales y del comportamiento debido al consumo de sustancias psicotropas según CIE-10: alcohol, opioides, cannabinoides, hipnóticos, cocaína, estimulantes, alucinógenos, tabaco, disolventes y otros psicotropos

0 Intoxicación aguda
1 Consumo perjudicial
2 Síndrome de dependencia
3 Síndrome de abstinencia
4 Síndrome de abstinencia con *delirium*
5 Trastorno psicótico
6 Síndrome amnésico
7 Trastorno psicótico residual y de comienzo tardío inducido por alcohol o por sustancias psicotropas
8 Otros trastornos mentales o del comportamiento
9 Trastornos mentales o del comportamiento sin especificación

ANEXO 2

Criterios para la dependencia de sustancias según DSM IV-TR

Un patrón desadaptativo de consumo de la sustancia que conlleva un deterioro o malestar clínicamente significativos, expresado por tres o más de los ítems siguientes en algún momento de un periodo continuado de 12 meses:

1. Tolerancia, definida por cualquiera de los siguientes ítems:

a) Una necesidad de cantidades marcadamente crecientes de la sustancia para conseguir la intoxicación o el efecto deseado

b) El efecto de las mismas cantidades de sustancias disminuye claramente con el consumo continuado

2. Abstinencia definida por cualquiera de los siguientes ítems:

a) Síntomas del síndrome de abstinencia característicos de la sustancia
b) Se toma la misma sustancia para aliviar o evitar los síntomas de abstinencia

3. La sustancia se toma con frecuencia o durante un periodo más largo que inicialmente
4. Existe un deseo persistente o esfuerzos infructuosos de controlar o interrumpir el consumo de la sustancia
5. Se emplea mucho tiempo en actividades relacionadas con la obtención de la sustancia, en el consumo de la sustancia o en la recuperación de los efectos de la sustancia
6. Reducción de importantes actividades sociales, laborales o recreativas debido al consumo de la sustancia
7. Se continúa tomando la sustancia a pesar de tener conciencia de problemas psicológicos o físicos recidivantes o persistentes que parecen causados o exacerbados por el consumo de la sustancia

DISCUSIÓN

M. MIQUEL: Me ha sorprendido mucho que la comorbilidad con alcohol sea muy baja, un 30%. Esperaba que dado que es la droga de preferencia en la población tuvierais mucha más comorbilidad con esquizofrenia o con depresiones.

M.A. OLIVERAS: Puede ser debido a que la unidad de conducta adictiva de sustancias legales está en el propio hospital, y a que las redes sociales funcionan razonablemente bien. Ingresamos fundamentalmente a los alcohólicos que no pueden detener la ingesta. Se quedan en observación 2 días, cuando se les pasa la embriaguez vuelven a casa y los derivamos a su centro de salud, por tanto, no ingresan.

E. AMBROSIO: Quería hacer unos comentarios. El primero es que la adicción es un problema complejo, que lo atacamos desde distintos puntos de vista, sinceramente como podemos. En segundo lugar, yo creo que es necesario renunciar al laboratorio y hacer simples las situaciones. Desde mi punto de vista, solamente cuando en el laboratorio se simplifican las situaciones conseguimos avances importantes en el conocimiento. Y, en tercer lugar, creo que todos estamos de acuerdo en que, en definitiva, el objetivo es mejorar la situación de esas personas que se han metido en la senda de las drogas. Me parece que los estudios preclínicos son bastante importantes, a pesar de que haya esa desconexión con lo clínico. A mi juicio están creando una y otra vez nuevas avenidas en la investigación y aportando datos que si bien pueden ser parciales, cuando se consiga algún fármaco que pueda ayudar a la recuperación de estos pacientes, aunque sea parcialmente, va a mejorar a su vez a estas personas en otras esferas, cognitivas y emocionales.

M. CASAS: Creo que los básicos estáis haciendo un avance absolutamente necesario para entender la adicción. Sin embargo, estáis utilizando el viejo paradigma de que la sustancia es realmente la mala. Es decir, una sustancia peligrosa que cuando toca a un individuo sano lo convierte en enfermo. Eso es el paradigma antiguo, antes se decía que era un individuo al que le faltaba moral, le faltaba voluntad, tocaba las drogas y se convertía en un vicioso. Vosotros decís lo mismo sin hablar de vicio, normalmente decís que hay unas sustancias que tienen unos mecanismos muy potentes que convierten a ese individuo en dependiente. Y para eso utilizáis la vulnerabilidad, porque, claro, si no no podríais explicar cómo una sustancia tan mala respeta al 80-90% de la población. Porque resulta que la mayoría de la gente puede consumir cocaína y no le pasa nada. Por tanto, no es la sustancia tan mala, sino que existen unos aspectos que tampoco se pueden explicar sólo por pura vulnerabilidad. Las drogas afectan a un individuo enfermo y para los estudios que hacéis con ratas buscáis ratas sanas, no ratas enfermas. Al realizar estudios en sujetos también se busca un individuo lo más sano posible. Pero creo que las sustancias psicotropas para que sean adictivas tienen que encontrar un cerebro enfermo, bien porque le faltan endorfinas, por alguna enfermedad genética o porque tiene

patología psiquiátrica. Es posible que el heroinómano se automedique buscando compensar una deficiencia funcional si al cerebro le faltan endorfinas. ¿Por qué en estos momentos los americanos están publicando que más del 70% de los trastornos bipolares son adictos? Probablemente se trata de individuos que utilizan la droga porque la necesitan. Seguramente para dos tercios de los adictos las drogas son necesarias, porque les compensan una deficiencia funcional genética, o quizás adquirida, como el saturnismo durante el embarazo, por ejemplo. Creo que es muy importante establecer cuáles son las bases genéticas para que ciertos individuos puedan llegar a ser adictos y ciertos individuos no. En la actualidad es un tema discutido, dado que en el manejo del dolor crónico no maligno se está implantando, yo creo que de forma bastante general, el tratamiento con opioides potentes. Ahí no podemos olvidar que los fármacos opioides son realmente fármacos adictivos, pero lo cierto es que la incidencia de la adicción es muy baja. Entonces creo que sería muy importante ser capaces de detectar, quizá en el ámbito psiquiátrico, cuáles son los verdaderos marcadores biológicos de que ciertas personas bajo las mismas condiciones lleguen a hacerse adictas a un fármaco y un gran porcentaje de ellas no. Permitiría optimizar y mejorar mucho también la calidad y la relación beneficio-riesgo de estos tratamientos.

M. MIQUEL: ¿De verdad creéis que tenemos un modelo animal que exactamente modele el trastorno adictivo? Porque, al menos para el alcohol, no existe, es decir, no hay ratas alcohólicas, hay ratas con un uso del alcohol, hay ratas con un abuso del alcohol, pero no hay un solo modelo de conducta compulsiva inducida por alcohol. Entonces, estamos hablando de adicción y estamos definiendo la adicción como la definen los clínicos, pero damos un salto epistemológico grande y lo aceptamos. Creo que deberíamos reflexionar seriamente sobre lo que estamos viendo en el laboratorio animal.

R. MALDONADO: Yo creo que lo que podemos medir en el animal son una serie de efectos farmacológicos de las drogas con la limitación que esto tiene, y una serie de características particulares de un fenómeno adictivo, como por ejemplo el *craving*. Pero evidentemente buscar un único modelo para todo el conjunto del proceso adictivo, ni lo hay, ni creo que jamás lo habrá. Ahora bien, medir respuestas precisas que ocurren en un fenómeno adictivo esto sí lo podemos hacer. Y yo creo que, considerando las posibles relaciones entre patología psiquiátrica y fenómeno adictivo, en un futuro habrá modelos de depresión, modelos de psicosis, en los cuales el trastorno se pueda asociar con vulnerabilidad al consumo de una droga. Pero son puntos muy precisos, no podemos coger todo el proceso, jamás lo tendremos.

P.N. ROSET: Una de las teorías de White es la de que todos estos cambios en la valoración emocional de los reforzadores pueden verse como un trastorno del aprendizaje. Una de las pruebas empíricas de que esto puede ser así es que uno de los tratamientos que aún siguen siendo más eficaces es la psicoterapia. Hablar con un individuo, reeducar a un individuo y hacer que él consiga lo que decíamos antes de las técnicas de *coping*, quizás esto no le cure de nada, pero le permite hacer su vida llevadera. Quizás los mecanismos neurobiológicos indican cómo, pero no por qué. Y la psicoterapia puede entender un poco más el porqué y, en todo caso, los mecanismos farmacológicos que podían desarrollarse son los que pueden ayudar a la psicoterapia a fijar este nuevo aprendizaje, a conseguir que este nuevo aprendizaje de su relación, con el entorno y con las drogas, cambie un poco. Con notable frecuencia coexisten en las conductas más deterioradas de adicción a los fármacos, analfabetismo, trastornos psiquiátricos, marginalidad y desempleo, con lo cual el individuo lo que necesita no sólo es un fármaco, es un fármaco que le ayude, que le abra la mente y permita que la psicoterapia le influya tanto como le han influido sus experiencias personales, y estas experiencias personales con el contacto con las drogas le hayan alterado completamente su capacidad de adaptarse a una vida. Si intentamos adaptar una persona a este tipo de conducta tenemos que facilitarle aprender esta conducta, porque tiene estos mecanismos de aprendizaje alterados, quizás para eso entender cuáles son los mecanismos nos permite sintetizar fármacos que coadyuven a la psicoterapia a fijar estos nuevos conocimientos.

E. AMBROSIO: Hay que recurrir al laboratorio, mimetizar en parte algunos componentes de ese proceso tan complejo que es la adicción humana para lograr avances en el conocimiento. Porque veo difícil que en humanos se pueda investigar sobre mecanismos y si se logran avances en el conocimiento va a ser en el laboratorio. De hecho, llevamos unos 50 años investigando en el ámbito experimental y se conoce muchísimo. Las hipótesis que estamos manejando aquí precisamente se derivan de la investigación preclínica. A pesar de contar con

modelos simples en depresión, creo que se han diseñado fármacos que ayudan a mejorar la calidad de vida de muchas personas. Igualmente ocurre con el modelo en la esquizofrenia de la inhibición prepulso, donde se tienen presentes dos o tres manifestaciones de algo tan complejo como puede ser una psicosis. Y también se han diseñado fármacos que ayudan enormemente a mejorar las personas en su calidad de vida y a lo mejor ese fármaco incide sólo en dos o tres aspectos de la esquizofrenia, pero luego por razones de generalización, o por cosas que yo desde luego desconozco, aumenta enormemente el beneficio que tiene esa persona simplemente por haber dado ese fármaco, que se ha elaborado según una serie de mecanismos que se han descubierto en un modelo simplísimo, que no tiene nada que ver con la esquizofrenia o con la depresión.

M. Casas: Yo volvería a insistir en que no explicamos verdaderamente la adicción con modelos simples o con psicoterapia. Es decir, yo creo que tenéis que buscar los mecanismos, pero hay que empezar a trabajar también en cuál es el sustrato biológico, no solamente genético, sino cuáles son las enfermedades que hacen que determinados individuos necesiten las drogas. Aparte de que hay individuos que, quizás, sí por vulnerabilidad tocan la droga y quedan enganchados, pero en la mayoría tienes la sensación de que son enfermos orgánicos de unas enfermedades todavía desconocidas o enfermos psiquiátricos, y que mejoran con las drogas, no por vicio, sino porque lo necesitan.

M.A. Oliveras: Lo que pedimos es una forma de actuar conjunta, porque nosotros podemos detener la ingesta en un momento y derivarlo o motivarlo de alguna manera a que empiecen un tratamiento completo. Es curioso que muchos de los chiquillos pastilleros que se han curado es porque han tenido la suerte de que tienen procesos legales, de que están pendientes de un juicio y de ingresar en prisión. Cuando la familia ha apoyado, han ido al psiquiatra, se le ha diagnosticado un trastorno previo, muchas veces déficit de atención por hiperactividad, o trastorno de control de impulsos, se les ha tratado, y al año y medio o dos años, hasta que tiene lugar el juicio, se han deshabituado.

Monografías Dr. Antonio Esteve publicadas

1. El hospital de día y su repercusión en terapéutica (1985).
2. Problemas que se plantean en el tratamiento de infecciones graves por *S. aureus* (1986).
3. Contribución del biólogo a la farmacología en España (1987).
4. Un glosario para farmacólogos (1987).
5. Aspectos biológicos de los síndromes depresivos (1988).
6. Bases del tratamiento de las intoxicaciones agudas (1988).
7. Investigación básica y medicina clínica (1988).
8. Tratamiento de datos en farmacología (1989).
9. Perspectivas terapéuticas en la esclerosis múltiple (1989).
10. Biotecnología de aplicación farmacéutica (1991).
11. Metodología del ensayo clínico (1991).
12. Periodismo científico. Un simposio internacional (1991).
13. El ensayo clínico como tarea cooperativa (1992).
14. Terapéutica y calidad de vida (1993).
15. Investigación sobre cáncer en España: de la biología molecular a la clínica (1994).
16. El tratamiento del dolor: del laboratorio a la clínica (1994).
17. Farmacología de los canales iónicos (1995).
18. Bases de datos en farmacología y terapéutica (1996).
19. Fármacos y conducción de vehículos (1996).
20. Traducción y lenguaje en medicina (1997).
21. Medicina y medios de comunicación. Traducción al español de una serie publicada en la revista *The Lancet* (1997).
22. Problemas y controversias en torno al ensayo clínico (1998).
23. Glosario de investigación clínica y epidemiológica (1998).
24. Transducción de señales como diana farmacológica (1999).
25. Investigación médico-farmacéutica en atención primaria. Una visión a través de las publicaciones de la REAP (1999).
26. Modelos experimentales de patología infecciosa (2000).
27. Diccionario de farmacología y temas afines (2000).
28. Educación sanitaria: información al paciente sobre los medicamentos (2000).
29. Aspectos conceptuales del ensayo clínico. Una revisión a través de artículos publicados en *Medicina Clínica* (1990-1999) (2000).
30. Ensayos clínicos en intervenciones no farmacológicas (2001).

*Para solicitar alguno de los números publicados, diríjanse por escrito a la Fundación Dr. Antonio Esteve (véanse los datos de contacto en la segunda página de esta monografía).