
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 cerebrales¹ implicadas en ciertos desórdenes afectivos, y estudios preclínicos y clínicos demuestran que los antagonistas del receptor NK1 poseen efectos ansiolíticos y antidepresivos²⁻⁵. 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 animal⁶. 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 respuesta⁴, 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 psicomotora⁷ e induce condicionamiento de preferencia de plaza (CPP)⁸. El receptor NK1 está intensamente expresado en el núcleo *accumbens*, basalis, amígdala y en el hipotálamo¹, 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 núcleo⁹.

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 recaídas¹²⁻¹⁸.

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 *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 Bozarth¹⁹. 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 capturados 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 modificaciones²⁰. 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 al²¹.

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 sobredosis²².

Sensibilización locomotora a las drogas

El procedimiento de sensibilización utilizado es una modificación del descrito por Martin et al²². 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 \pm 1,00 mm, DV - 4,20 mm; amígdala: AP - 1,46 mm, ML \pm 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 posesión 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).

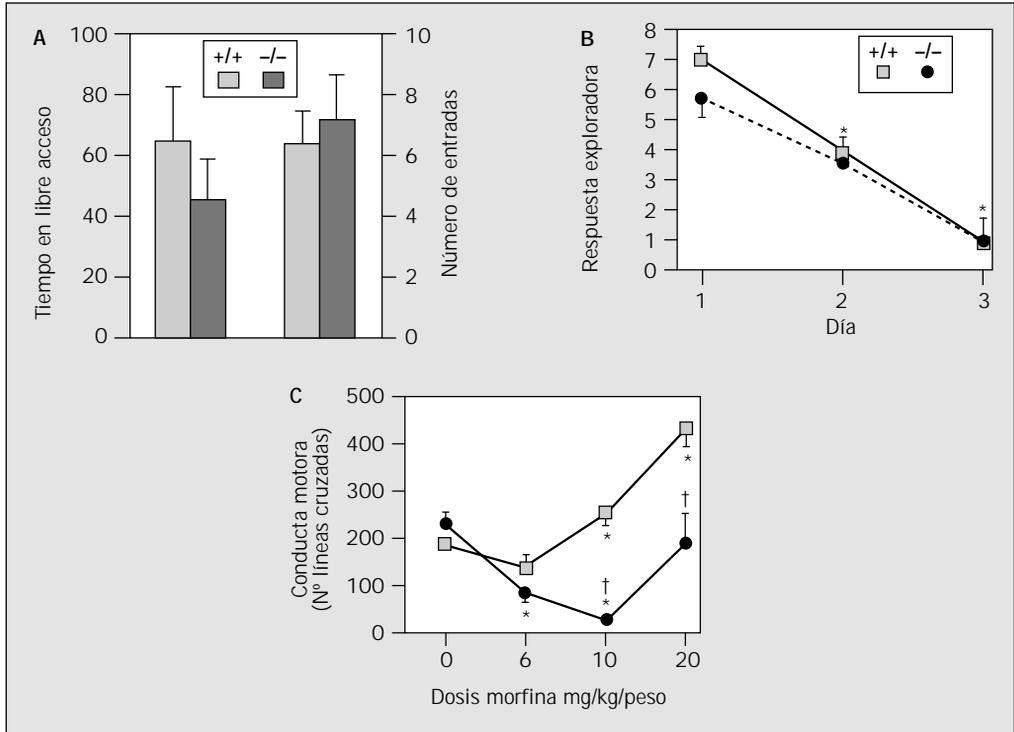


Fig. 1. Ausencia de incremento de la actividad locomotora en animales NK1^{-/-} tras la administración de morfina
A. Conducta de los ratones NK1^{-/-} en el laberinto de cruz elevado. El tiempo transcurrido en los brazos abiertos y el número de visitas al brazo abierto fueron similares en ambos genotipos. Los datos son la media \pm 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 \pm ESM). El número de líneas cruzadas por el animal silvestre fueron: día 1, $116,2 \pm 20,9$; día 2, $89,7 \pm 13,9$; día 3, 80 ± 26 ; y para el NK1^{-/-} fueron: día 1, $111,6 \pm 10,4$; día 2, $113 \pm 7,2$; 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 \pm 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 reforzantes¹⁹, 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 re-

gistrar 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).

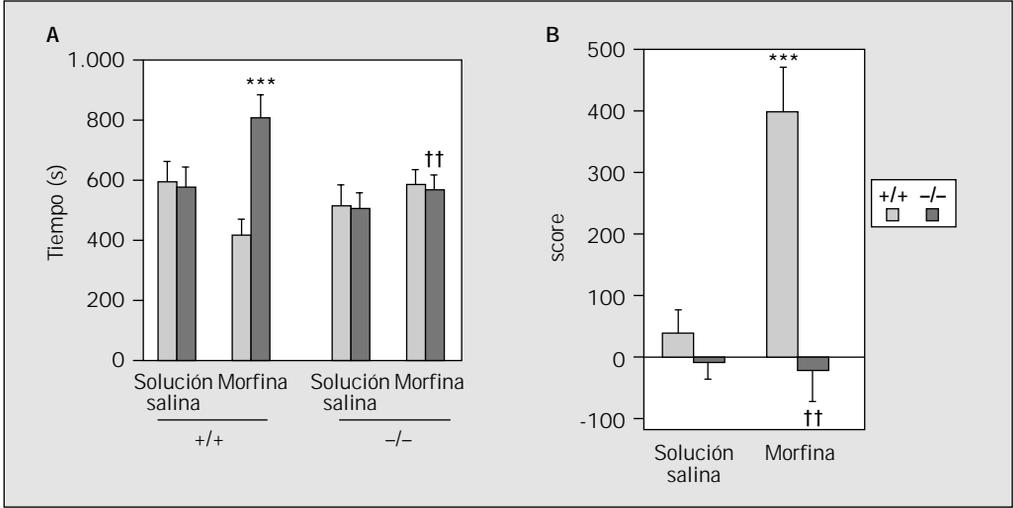


Fig. 2. Ausencia de preferencia de condicionamiento de plaza inducido por morfina (3 mg/kg, s.c.), en animales NK1-/- comparado con silvestres. A) Tiempo transcurrido en el compartimento asociado a la droga durante el precondicionamiento (barras blancas) y en la fase de test (barras negras). Los valores representan la media \pm 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.

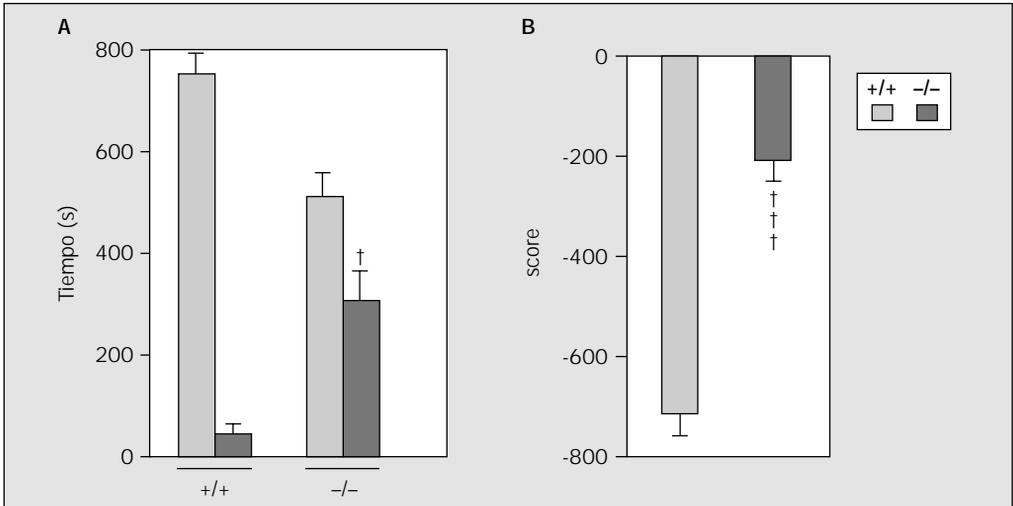


Fig. 3. Efecto de la administración de naloxona (1 mg/kg) sobre el ensayo de aversión de plaza condicionada en animales mutantes y silvestres. A) Representa el tiempo de permanencia en el compartimento asociado al síndrome de abstinencia durante la fase de precondicionamiento (barra gris) y durante la fase de test (barra negra). Cada barra representa la media \pm 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)

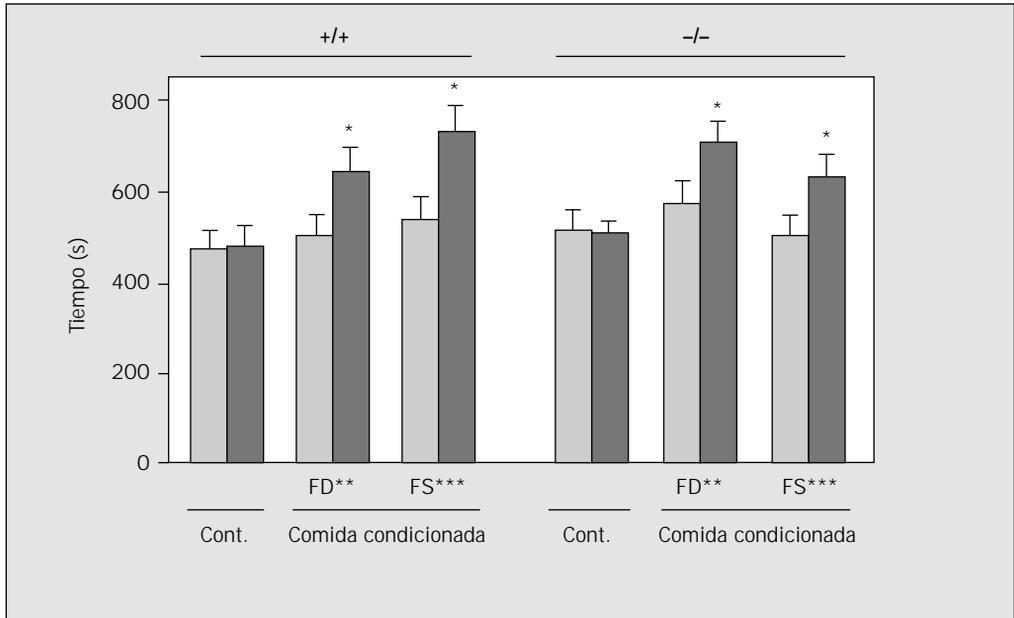


Fig. 4. Efecto del condicionamiento inducido por comida sobre el ensayo de preferencia de plaza condicionada en animales NK1^{-/-}. Representa el tiempo de permanencia en el compartimento asociado a la comida durante la fase de precondicionamiento (barra gris) y durante la fase de test (barra negra) en animales condicionados a comida. Grupo FD animals privados 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 privados 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 sistemas 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 ratas²³.

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 comida²⁴ (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 $^3\text{H-DAMGO}$ a membranas cerebrales se estudió el número y la afinidad de los receptores opioides μ , no encontrándose diferencias significativas entre ambos genotipos (NK1^{+/+}: B_{max} : $0,16 \pm 0,037$ pmol/ μg de proteína, Kd: $6,12 \pm 1,73$ nM; NK1^{-/-}: $0,12 \pm 0,01$ pmol/ μg de proteína, Kd: $4,4 \pm 0,5$ 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 opiácea²⁵, 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 $\Delta\text{Fos-B}$, en el núcleo *accumbens*²⁶. El estudio semicuantitativo por inmunofluorescencia y posterior análisis en microscopía confocal de $\Delta\text{Fos-B}$ 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).

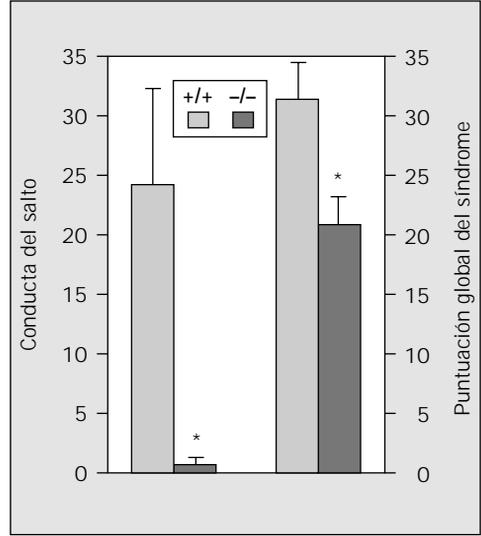


Fig. 5. Medida de la intensidad del síndrome de abstinencia a opiáceos tras la administración de naloxona a ratones dependientes de morfina. El síndrome de abstinencia se precipitó una única vez en cada animal mediante la administración de naloxona (1 mg/kg, i.p), una hora después de la última inyección 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.

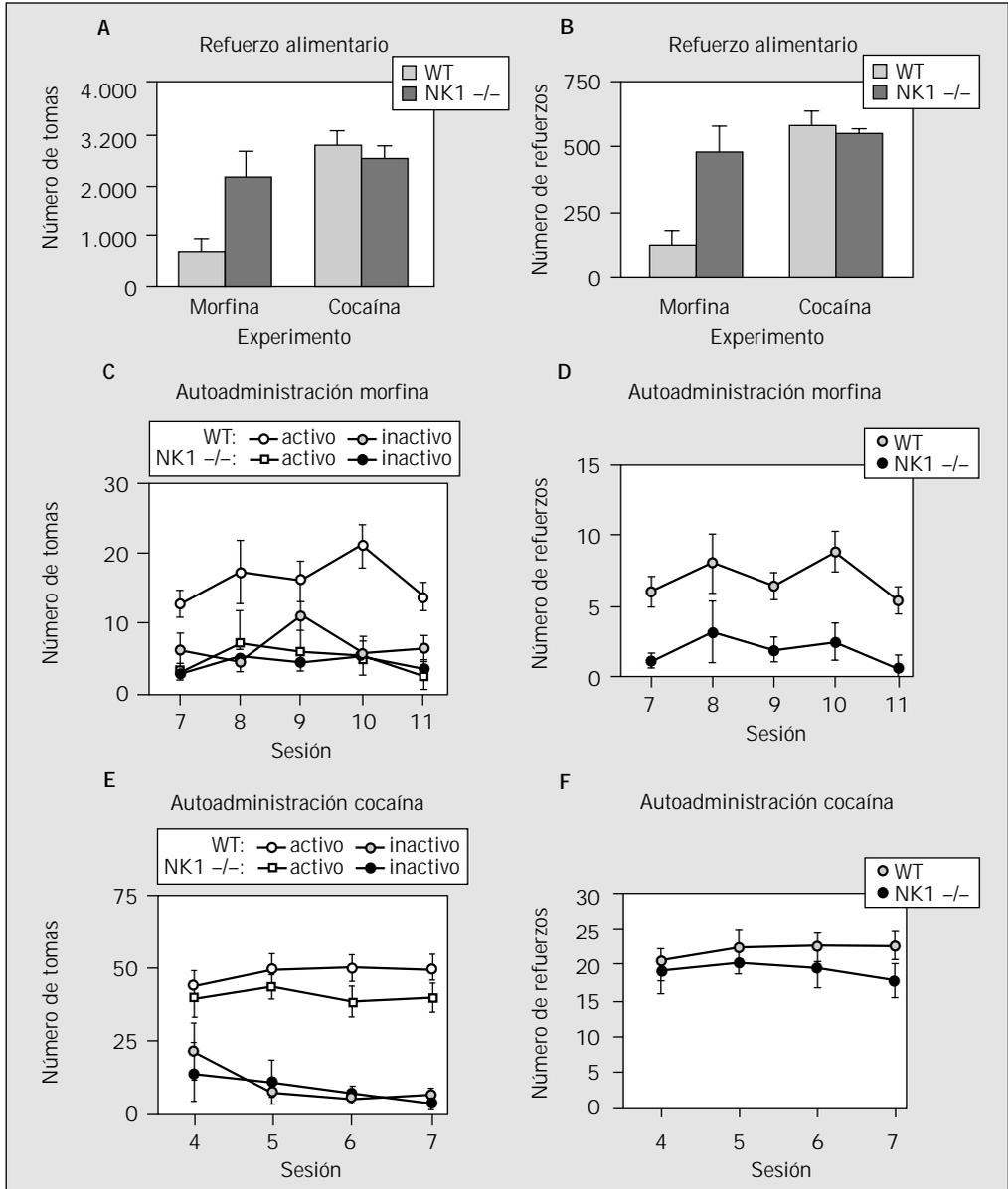


Fig. 6. Autoadministración de morfina y cocaína en ratones NK1^{-/-}. A y B) Aprendizaje operante: En los experimentos de morfina los ratones mutantes emitieron más presiones de palanca ($p < 0,05$; A) y obtuvieron más recompensa ($p < 0,01$, B) que los controles silvestres. Estas diferencias no se observaron 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 ($p < 0,005$).

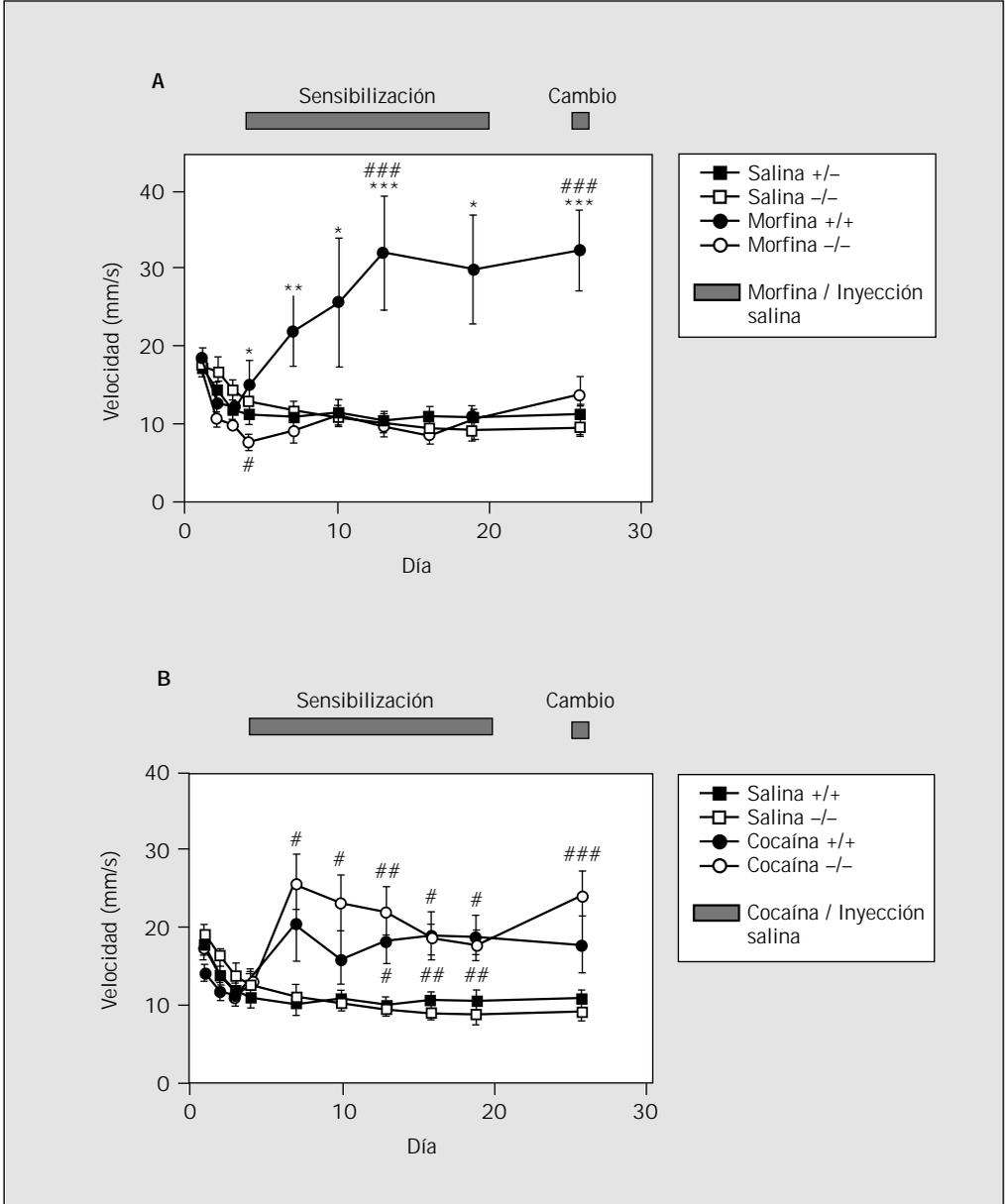


Fig. 7. Sensibilización motora de morfina y cocaína en ratones knockout. A) Respuesta locomotora a morfina. Media \pm SEM de la velocidad de movimiento por los animales NK1^{-/-} y los animales silvestres durante el periodo de habituación a las cajas de actividad (días 1-3), administración de morfina 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 \pm SEM de la velocidad de movimiento por los animales NK1^{-/-} y los animales silvestres durante el periodo 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. salino; # $p < 0,05$ vs. salino; ## $p < 0,01$ vs. NK1^{-/-}; ### $p < 0,001$ vs. salino (Tukey post hoc comparisons).

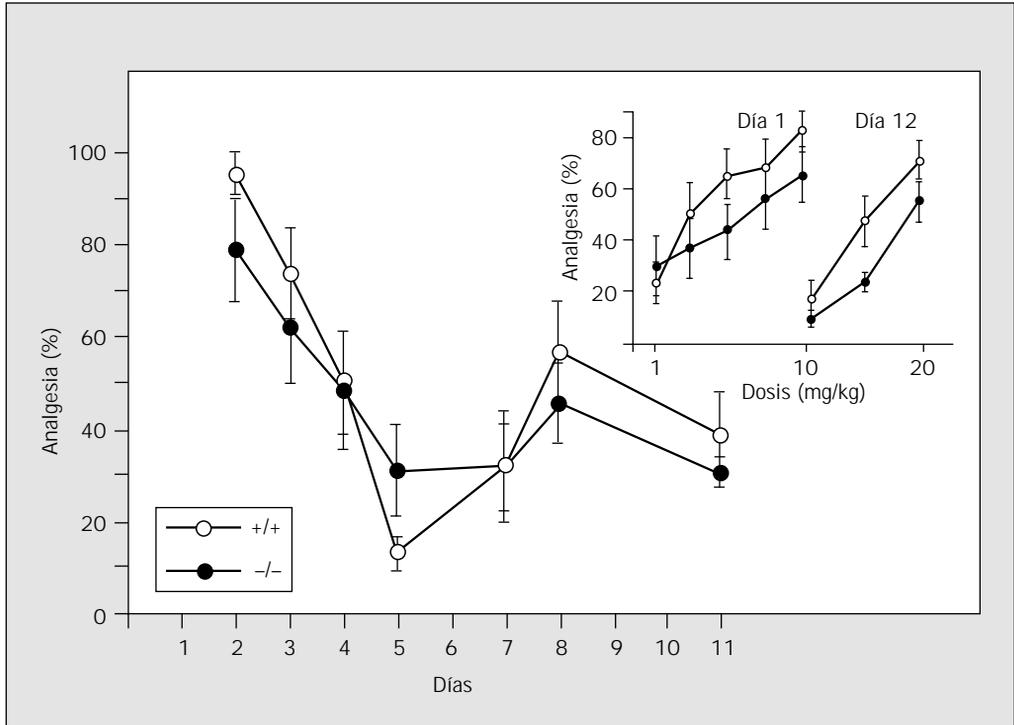


Fig. 8. Desarrollo de tolerancia a morfina. Los animales recibieron dos inyecciones diarias a intervalos de 12 h de 10 mg/kg de morfina, i.p. Treinta min después de la primera inyección se determinaron sus umbrales nociceptivos térmicos mediante el test de inmersión de cola. De cada dosis administrada se calculó 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 si 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 recompensante²⁸⁻³⁰.

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

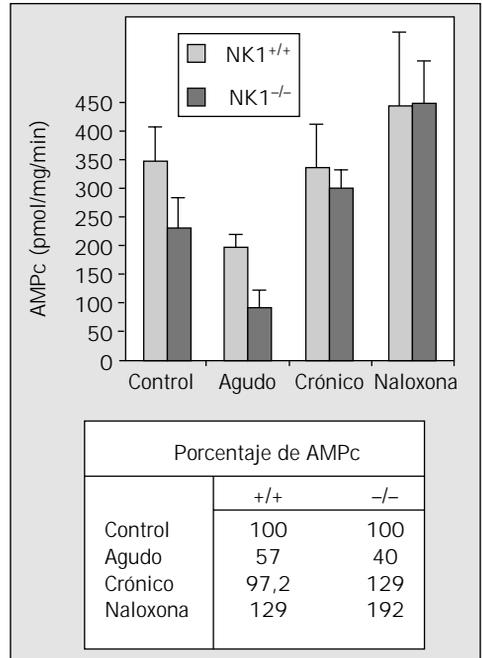


Fig. 9. Actividad adenilato ciclasa tras diferentes tratamientos de morfina en animales NK1^{-/-} y silvestres. Las barras representan niveles de AMPc para cada grupo experimental. No se encontraron diferencias significativas.

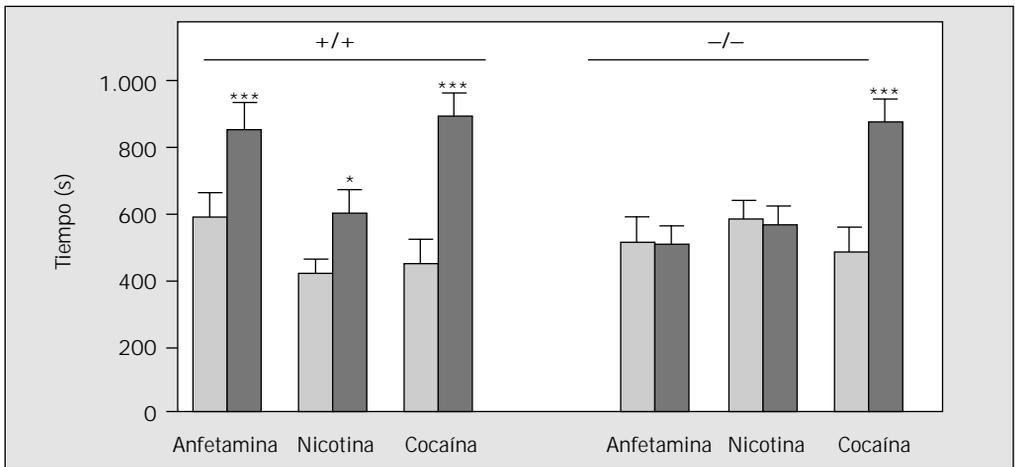


Fig. 10. Ausencia de preferencia de condicionamiento de plaza inducido por anfetamina (1 mg/kg, s.c.), y nicotina (0,5 mg/kg) y presencia en el caso de cocaína (5 mg/kg) en animales NK1^{-/-} comparado con silvestres. Tiempo transcurrido en el compartimento asociado a la droga durante el precondicionamiento (barras grises) y en la fase de test (barras negras). Los valores representan la media \pm ESM, *** $p < 0,001$, , versus grupo salino del mismo genotipo. Los datos fueron analizados con el test de Dunnett¹, $n = 12$ para el grupo de morfina, $n = 10$ para el grupo de salino.

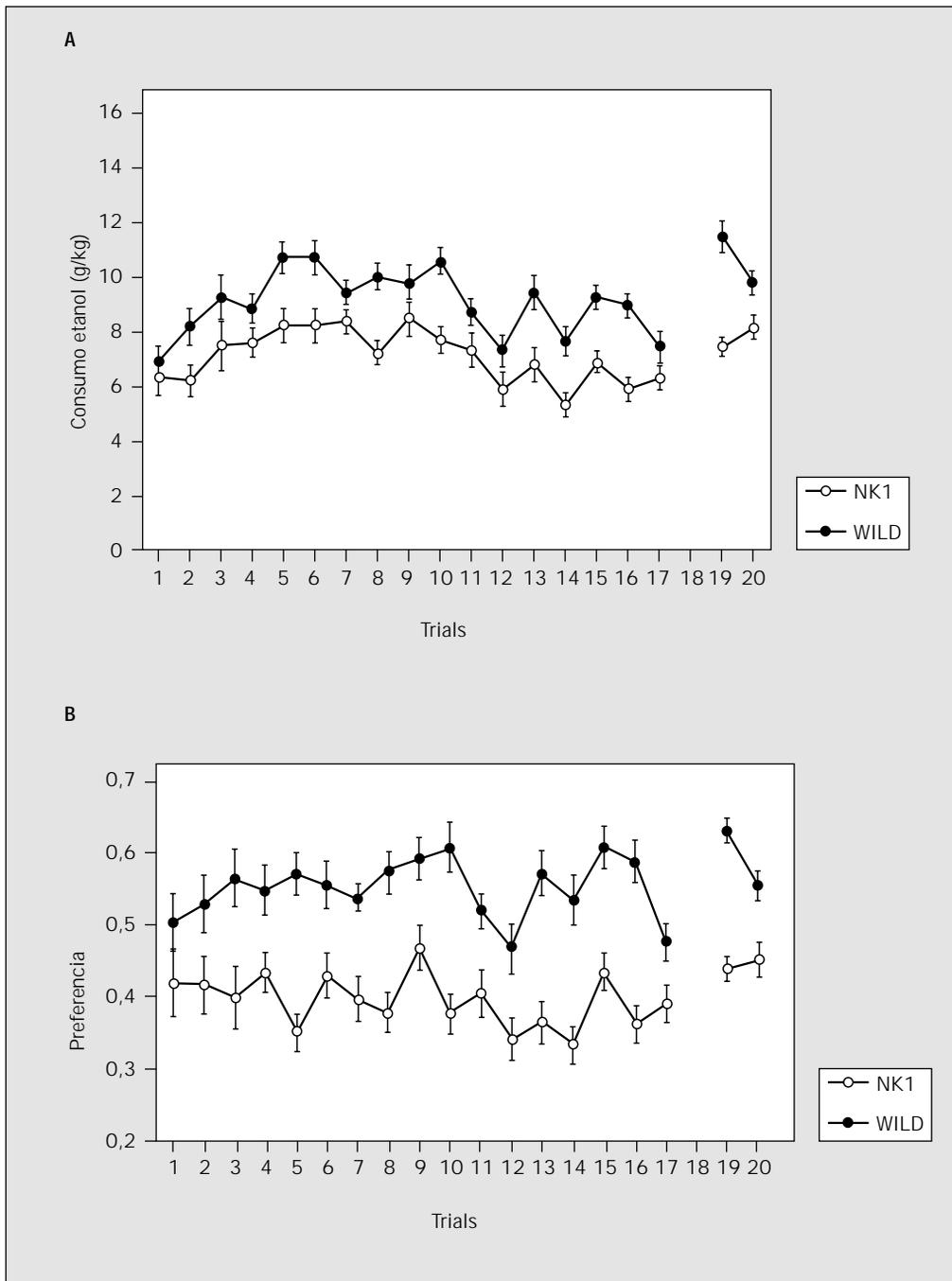


Fig. 11. Consumo de etanol en animales NK1^{-/-}. A) Los animales mutantes consumen menos etanol desde el día 4 y presentan un patrón de reinstauración anómalo. B) Los animales mutantes muestran menos preferencia por el etanol durante todo el período de ingesta y también durante la restauración.

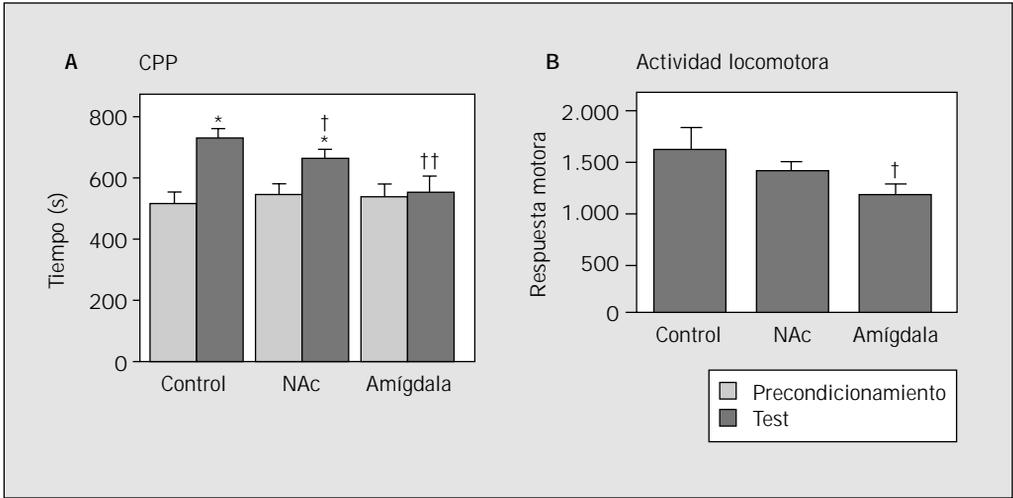


Fig. 12. Efecto de la administración de morfina (3 mg/kg) sobre el ensayo de preferencia de plaza en animales silvestres tras la inyección bilateral del conjugado neurotóxico SP-SAP. A) Representa el tiempo de permanencia en el compartimento asociado a la droga durante la fase de precondicionamiento (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 amígdala, 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 quinolinico del área prefrontal de la corteza prefrontal eliminó el CPP para cocaína sin alterar la respuesta de morfina y anfetamina³³. Aunque estas dos áreas presentan baja inmunoreactividad 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 recaídas 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 an-

siedad 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 recaídas 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 (NK₁) 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 (NK₁) receptors attenuates 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 depression 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, Hyman 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 expression 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 environmental 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 expression 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 transmission in the induction and expression of behavioural sensitization: a critical review of preclinical studies. *Psychopharmacology (Berl)* 2000; 151: 99-120.
18. Wolf ME. The role of excitatory amino acids in behavioural sensitization to psychomotor 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. Loss 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. Martin 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. Expression 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 adaptive motor control. *Science* 1994; 265: 1826-1831.
31. Bechara A, van der Kooy D. The tegmental pedunculo-pontine 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 pedunculo-pontine nucleus lesions do not block cocaine reward. *Pharmacol Biochem Behav* 1995; 52: 77-83.
33. Tzschenke TM, Schmidt WJ. Discrete quinolinic acid lesions of rat prelimbic medial prefrontal cor-

tex affect cocaine- and MK801 but not morphine and amphetamine-induced reward and psychomotor 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 esa. 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 Δ Fos-B en los animales. Sabéis que el grupo de Nestler describe una correlación, teóricamente, entre la expresión de Δ Fos-B y las propiedades reforzantes tanto de psicostimulantes como de opiáceos. ¿Cómo explicas esta ausencia de refuerzo con morfina pero esta permanencia del refuerzo inducido por cocaína si Δ Fos-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 opiáceos, 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 opiáceas, 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.