
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 mamíferos¹. 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 central². 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 de-

encadenamiento 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 abstinencia⁵. En segundo lugar, la administración sistémica y local del agonista de los adrenorceptores α_2 , clonidina, suprime la hiperactividad celular del *locus coeruleus*⁷, la liberación de noradrenalina en las áreas terminales⁸ y varios signos⁹ de la abstinencia a opiáceos. En tercer lugar, la destrucción del *locus coeruleus* atenúa la aparición de los signos físicos de abstinencia¹⁰, mientras que este núcleo es el área más sensible para inducir el síndrome de abstinencia cuando se aplica localmente en el cerebro un antagonista opiáceo¹¹.

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 signos¹³. Además, la lesión de las proyecciones noradrenérgicas del *locus coeruleus* no modifican la conducta de aversión de plaza inducida por la abstinencia a opiáceos¹⁴. 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

opiáceos¹⁵. 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 desenrañar las adaptaciones que subyacen a la activación de las neuronas del *locus coeruleus*. Podemos clasificar estos mecanismos en intrínsecos y extrínsecos, según su origen¹⁶. 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 G¹⁷. 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 adenililciclase 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 controvertida¹⁹ 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 AMPc¹⁶. Así, se han descrito incrementos en los niveles de expresión de la adenililciclase 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 opiáceos²⁰. 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 síndrome²¹.

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 lateral²³ 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 opiáceos²⁵⁻²⁸. 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 opiáceos³¹, 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 rata³². 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 CREB³³. Por otra parte, estudios en ratones *knockout* han demostrado que la deficiencia del factor CREB atenúa el desarrollo conductual de dependencia y abstinencia a opiáceos³⁴.

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 opiáceos³⁵. 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 proceso³⁵. Además, el evento bioquímico que depende directamente de esta regulación es la adenililciclase tipo VIII, mientras que otros cambios bioquímicos que suceden durante la dependencia (como la sobreexpresión de la adenililciclase 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 ac-

tivador de la adenililciclase 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-CREB³⁵.

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 opiáceos³⁶ (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 guanililciclase³⁸ 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 nerviosas⁴²⁻⁴⁴. En experimentos electrofisiológicos realizados en ro-

dajas de cerebro de rata⁴⁵, 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 gas⁴⁵. Otros autores han encontrado resultados discordantes⁴⁰, 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 núcleo⁴⁶. Mediante análogos nucleotídicos inhibidores y activadores se ha comprobado que la acción del NO se ejerce a través de la activación de la enzima guanilciclasa 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 postsináptico⁴⁶. 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 sodio⁴⁵. 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 sectionar 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 excitatorios⁴⁶.

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 abstinentes 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 selectivos⁵⁴⁻⁵⁶ 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 central⁵⁸, y de hecho la actividad NO sintasa se encuentra incrementada en el cerebro tras la administración de morfina⁵⁹. 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 opiáceos⁴⁷. 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 crónicos⁴⁷. Similarmente, un papel para el NO neuronal en la abstinencia a opiáceos ha sido propuesto con técnicas voltamétricas⁶⁰ y de microdialisis⁴⁸ 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 guanilciclasa suprime el síndrome conductual y la respuesta del *locus coeruleus* durante la abstinencia a opiáceos⁶².

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 siguientes⁶³⁻⁶⁶:

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 adenilciclasa 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 antiopioideos, 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 opiáceos⁶⁷⁻⁶⁹. 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 IRK¹⁶. Además, algunos autores sostienen que la desensibilización de receptores opioides μ en el *locus coeruleus* es de naturaleza homóloga⁷¹, 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 agonistas⁷². 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 GTP γ S) se encuentra reducida en el *locus coeruleus* tras el tratamiento crónico con opiáceos^{75,76}. Por otra parte, el sistema de los fosfoinosítoles no parece ejercer un papel relevante⁷⁷. 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 opioides⁷⁸. 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 disminuida⁷⁵ o no cambia⁷⁹. 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 bulbo-coeruleares tras el tratamiento crónico con morfina⁸¹.

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 G⁷⁷. 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 potasio⁸³. 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 opiáceos⁸⁵. 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 NO⁸⁶. 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 interactúan⁸⁷⁻⁹². 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 intracelular⁹⁵. 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 G⁹⁵⁻⁹⁷. 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 NO¹⁰⁰, e incluso hay referencias en las que la inhibición de la NO sintasa acentúa el desarrollo de tolerancia⁹⁷. El modelo sugiere que los eventos dependientes del NO pueden ser muy relevantes en el desencadenamiento de los mecanismos de tolerancia a opiáceos⁹⁴.

Highfield y Grant¹⁰¹ 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 rodajas¹⁰³, 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 inhibidores¹⁰⁴. 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-tiocitruilina y la N-propil-L-arginina) permiten asegurar que la formación de NO se produce por una enzima de tipo neuronal¹⁰⁵. 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 reacción¹⁰⁶. 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, Jouvét 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, Bell-chambers CE. Where is the locus in opioid withdrawal? *Trends Pharmacol 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-induced 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 of addiction. *Science* 1997; 278: 58-63.
17. Williams JT, Egan TM, North RA. Enkephalin opens potassium channels on mammalian central neurons. *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 Coeruleus 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 expression of opiate withdrawal. *Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol* 1995; 352: 565-575.
22. Aghajanian GK, Kogan H, Moghaddam B. Opiate withdrawal increases glutamate and aspartate efflux in the locus coeruleus: an in vivo microdialysis 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 suppress 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) expression 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. Vulliamoz 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. Nitroergic 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 morphine 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-Schmiedeberg 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. Suppression 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 downregulation contributes to opioid tolerance in vivo. *Pharmacol Biochem Behav* 2001; 69: 233-237.
71. Harris GC, Williams JT. Transient homologous mu-opioid receptor desensitization in rat locus coeruleus neurons. *J Neurosci* 1991; 11: 2574-2581.
72. Koovor 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 locus 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 [³⁵S]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 mu 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, Zieglansberger 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, Dohman 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. *Synapse* 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. RODRIGUEZ 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. RODRIGUEZ 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 °C 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.