Mecanismos moleculares implicados en la dependencia opiácea

Rafael Maldonado

Departamento de Neurofarmacología. Facultad de Ciencias de la Salud y de la Vida. Universitat Pompeu Fabra. Barcelona.

Introducción

La morfina y sus derivados constituyen un grupo de fármacos conocidos con la denominación de opiáceos. Estos compuestos poseen propiedades farmacológicas de un gran interés terapéutico y han sido ampliamente utilizados en clínica para el tratamiento de diferentes cuadros dolorosos. Así, los opiáceos son los fármacos analgésicos más eficaces de entre todos los existentes. Sin embargo, la administración repetida de estos compuestos produce una serie de modificaciones en el organismo que originan el desarrollo de fenómenos de dependencia y de tolerancia a la mayor parte de sus respuestas farmacológicas. Estos procesos se desarrollan como consecuencia de los cambios adaptativos celulares y moleculares que se producen en el sistema nervioso central en respuesta a la presencia repetida del opiáceo, y que persisten durante un largo período de tiempo incluso después de la interrupción del tratamiento.

Se han realizado múltiples estudios para investigar los mecanismos neurobiológicos implicados en los fenómenos adaptativos que originan los procesos de dependencia a los opiáceos. Una primera hipótesis sugirió la existencia de una disminución en el número y/o afinidad de los receptores opioides en respuesta a la presencia continua del fármaco en la hendidura sináptica. Este fenómeno ha sido claramente observado en cultivos celulares que poseen dichos receptores tras la administración de agonistas opioides[1,2]. Sin embargo, dicho proceso se observó raramente en los estudios realizados in vivo[2-5]. Además, en las escasas ocasiones en las que se obtuvo esta subsensibilización in vivo resultó difícil relacionarla con el desarrollo de la tolerancia y la dependencia, ya que éstas estuvieron limitadas a algunas estructuras cerebrales y tan sólo tras ciertas condiciones particulares de tratamiento opiáceo[6-8].

Otra hipótesis para explicar la implicación del sistema opioide endógeno en los fenómenos de dependencia está basada en los efectos de la administración crónica de opiáceos sobre la biosíntesis de péptidos opioides. Según esta teoría, durante el desarrollo de la tolerancia y la dependencia opiácea se generarían ciertos fragmentos peptídicos a partir de los propios precursores de los péptidos opioides endógenos o bien a partir de otros precursores que poseerían propiedades opuestas a los opioides. Estos fragmentos peptídicos disminuirían las respuestas farmacológicas de los opiáceos, participando así en la expresión de la abstinencia[9-11].

Mecanismos de transducción del sistema opioide

Los cambios producidos en el propio receptor opioide o sobre la síntesis y degradación de los péptidos opioides endógenos no parecen tener una gran relevancia en los procesos de tolerancia y dependencia. En efecto, los fenómenos adaptativos que se producen en el sistema opioide endógeno durante el desarrollo de la dependencia opiácea tienen lugar principalmente en los sistemas de segundo mensajero acoplados al receptor opioide, incluyendo entre otros las proteínas G y diversas enzimas transmembranarias e intracelulares[12]. Así, la activación de los receptores opioides a través de su interacción con una proteína G produce la inhibición de una enzima transmembranaria, la adenilciclasa, responsable de catalizar la síntesis de AMPc. La inhibición de esta enzima es el punto de partida de toda una cascada de acontecimientos intracelulares que incluyen la inhibición de enzimas proteincinasas y la fosforilación de múltiples proteínas citoplasmáticas y nucleares que son el sustrato de dichas cinasas. El efecto inhibitorio crónico producido por la presencia continuada del opiáceo induce una hipertrofia compensatoria que afecta a la mayor parte de estos mensajeros intracelulares ligados a los receptores opioides[12,13].

Las primeras observaciones acerca de una activación del sistema AMPc durante la absti-

nencia opiácea fueron realizadas a partir de estudios sobre cultivos de células híbridas de neuroblastoma/glioma NG 108-15[14]. Un incremento en las concentraciones de AMPc[15], así como en la actividad proteincinasa[16] también se observó en el cerebro durante la abstinencia a opiáceos. Estudios posteriores han evaluado las estructuras cerebrales que se encuentran específicamente implicadas en estos cambios adaptativos. La dependencia opiácea produce una hipertrofia del sistema ligado al AMPc principalmente en el *locus coeruleus*, donde se observan modificaciones compensatorias en las proteínas G[17] y en las actividades adenilciclasa y proteincinasa[18]. Algunas de estas modificaciones también pudieron ser observadas en otras estructuras, como el núcleo *accumbens*[19] y el estriado[20]. En el *locus coeruleus* también se encontraron modificaciones compensatorias en diferentes proteínas que resultan fosforiladas por las proteincinasas, incluyendo proteínas citoplasmáticas, proteínas del citosqueleto que controlan la talla y la forma de las neuronas, y factores de transcripción que regulan la expresión genómica de la célula[12]. Diversos estudios han referido que estos cambios en los sistemas de mensajeros son en parte responsables de la aparición de los fenómenos de tolerancia y dependencia opiácea[12].

Gracias a los avances en las técnicas de biología molecular, recientemente ha sido posible el desarrollo de una serie de líneas de ratones transgénicos con deficiencias en los genes que codifican determinados receptores o mensajeros intracelulares. La utilización de dichos animales ha permitido realizar importantes avances en el estudio del sustrato biológico de la dependencia opiácea. Así, mediante el empleo de técnicas de recombinación homóloga se han conseguido ratones en los que se han suprimido los genes responsables de la expresión de ciertos receptores opioides (receptores μ y κ), monoaminérgicos (receptores dopaminérgicos D_2) o de factores de transcripción relacionados con las respuestas intracelulares de los opiáceos (CREB: *cAMP-responsive element-binding protein*).

Ratones deficientes para el receptor μ

El empleo de ratones transgénicos con deficiencias en el gen que codifica el receptor opioide μ ha permitido clarificar su papel en la dependencia opiácea[20]. Así, las respuestas analgésicas inducidas por la administración aguda de morfina resultaron completamente abolidas en esta línea de ratones transgénicos. La morfina tampoco tuvo propiedades reforzantes tras su administración repetida en estos animales. Estos efectos reforzantes de los opiáceos se encuentran íntimamente ligados a su capacidad para inducir el componente psíquico de la dependencia[21]. Por otra parte, el tratamiento crónico con morfina no desarrolló ninguna manifestación comportamental (signos somáticos y vegetativos de la abstinencia) ni bioquímica (elevación de la actividad adenilciclasa en el estriado) de dependencia opiácea en ratones con deficiencias en dichos receptores. Así pues, estos receptores opioides μ resultan imprescindibles no sólo para el desarrollo de la dependencia morfínica sino también para la expresión de las principales respuestas farmacológicas inducidas por este opiáceo.

Ratones deficientes para el receptor κ

Por otra parte, recientemente ha sido posible desarrollar ratones transgénicos deficientes en el gen que codifica el receptor opioide κ[22]. Las respuestas analgésicas inducidas por la administración aguda de morfina, así como las repuestas reforzantes inducidas tras su administración repetida, no se vieron modificadas en los ratones deficientes en dichos receptores. Sin embargo, la expresión de los signos somáticos de la dependencia opiácea resultaron moderamente reducidos en estos animales. Dicho resultado sugiere que los receptores κ opioides desempeñan un papel modulador en la expresión de la dependencia opiácea. Además, las respuestas analgésicas, locomotoras y motivacionales inducidas por el agonista κ selectivo U-50488H resultaron completamente abolidas en los animales deficientes en los receptores κ[22].

Ratones deficientes para el factor CREB

La participación de los factores de transcripción ha sido estudiada mediante el empleo de ratones transgénicos deficientes en el factor CREB. La eliminación del gen que codifica el factor de transcripción CREB[23] no modificó las respuestas farmacológicas inducidas por la administración aguda de morfina, en particular la actividad analgésica. Sin embargo, los efectos producidos por la administración crónica de opiáceos se vieron claramente alterados[24]. Así, el desarrollo de la tolerancia a la actividad analgésica de la morfina está disminuido, y también se observó una redución en la expresión

de los signos somáticos y vegetativos de la abstinencia opiácea. No obstante, ciertas manifestaciones bioquímicas asociadas a la abstinencia no se vieron modificadas por la supresión de CREB. Así, durante la abstinencia se observa un incremento en la expresión de los genes precoces, c-*fos* y c-*jun*, en ciertas estructuras cerebrales como el *locus coeruleus* y en el sistema límbico. La expresión de estos genes precoces y el incremento en la actividad de la enzima adenilciclasa producido durante la abstinencia opiácea no se vieron modificados en los animales con deficiencia de CREB. El factor de transcripción CREB desempeña, pues, un papel importante en las manifestaciones comportamentales de la abstinencia, aunque no parece participar en los efectos analgésicos producidos por la administración aguda de morfina. Los resultados bioquímicos en la actividad adenilciclasa sugieren que el mecanismo por el que CREB participa en los procesos de dependencia parece ser independiente de los mensajeros ligados al AMPc. Los sistemas intracelulares que participan en dicho mecanismo no han sido aún identificados y su conocimiento ayudará sin duda a esclarecer el sustrato biológico de estos procesos de dependencia.

Otros sistemas implicados

Otros sistemas de neurotransmisión diferentes del sistema opioide endógeno se encuentran también implicados en los cambios adaptativos responsables del desarrollo de la dependencia opiácea. Estos sistemas van a controlar a través de un mecanismo heterólogo la respuesta del organismo durante el proceso de dependencia. Así, se han descrito diversos cambios durante el desarrollo de la dependencia, sobre todo en los sistemas dopaminérgico, noradrenérgico, serotonérgico, colinérgico, GABAérgico y peptidérgico. La participación de ciertos mecanismos heterólogos, en particular del sistema dopaminérgico, también ha podido ser evaluada gracias al empleo de ratones transgénicos. Así, los efectos producidos por el tratamiento agudo y crónico con morfina fueron investigados en ratones deficientes en los receptores dopaminérgicos D_2[25], que han sido recientemente generados mediante la técnica de recombinación homóloga[26]. La supresión de los receptores dopaminérgicos D_2 no modifica las respuestas analgésicas y motoras inducidas por la administración aguda de morfina, ni el desarrollo de la dependencia física tras el tratamiento crónico con opiáceos. Sin embargo, los efectos reforzantes producidos por la morfina resultaron completamente abolidos en estos animales. Las propiedades reforzantes de un estímulo natural, la comida, no se vieron modificadas en los ratones con deficiencia en receptores dopaminérgicos D_2. Así pues, los receptores dopaminérgicos D_2 están selectivamente implicados en las propiedades reforzantes de los opiáceos y no parecen desempeñar un papel importante en otras respuestas agudas o crónicas inducidas por estos fármacos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Law PY, Hom DS, Loh HH. Down-regulation of opiate receptor in neuroblastome x glioma NG 10815 hybrid cells. J Biol Chem 1984; 259: 4.096-4.104.
2. Law PY, Hom DS, Loh HH. Loss of opiate receptor activity in neuroblastoma x glioma NG 108-15 hybrid cells after chronic opiate treatment: a multiple-step process. Mol Pharmacol 1982; 22: 1-4.
3. Chang KJ, Eckel RW, Blanchard SG. Opioid peptides induced reduction of enkephalin receptors in cultured neuroblastome cells. Nature 1982; 296: 446-448.
4. Puttfarken PS, Cox BM. Morphine-induced desensitization and down-regulation at mu-receptor in 7315C pituitary tumor cells. Life Sci 1989; 45: 1.937-1.942.
5. Zadina JE, Kastin AJ, Kersh D. TYR-MIF and hemorphin can act as opiate agonist as well as antagonist in the guinea pig ileum. Life Sci 1992; 51: 869-885.
6. Werling LL, McMahon PN, Cox BM. Selective changes in mu-opioid receptor properties induced by chronic morphine exposure. Proc Natl Acad Sci USA 1989; 86: 6.393-6.397.
7. Morris BJ, Herz A. Control of opiates receptor number in vivo: simultaneous kappa-receptor down-regulation and mu-receptor up-regulation following chronic agonist/anatgonist treatment. Neuroscience 1989; 29: 433-442.
8. Rothman RB. A review of the role of anti-opioid peptides in morphine tolerance and dependence. Synapse 1992; 12: 129-138.
9. Hammonds RG, Nicholas P, Li CH. Beta-endorphin (1-27) is an antagonist of beta-endorphin analgesia. Proc Natl Acad Sci USA 1984; 81: 1.389-1.393.
10. Nicolas P, Hammonds RG, Li CH. Beta-endorphin analgesia is inhibited by synthetic analogs of beta-endorphin. Proc Natl Acad Sci USA 1984; 81: 3.074-3.077.
11. Bronstein DM, Przewlocki R, Akil H. Effects of morphine treatment on pro-opio-melanocortin systems in rat brain. Brain Res 1990; 519: 102-111.
12. Nestler EJ. Molecular mechanisms of drug addiction. J Neurosci 1992; 12: 2.439-2.450.

13. Collier HOJ. Cellular site of opiate dependendence. Nature 1980; 283: 625-630.
14. Sharma SK, Klee WA, Nirenberg M. Dual regulation of adenylate cyclase accounts for narcotic dependence and tolerance. Proc Natl Acad Sci USA 1975; 72: 3.092-3.096.
15. Collier HOJ, Francis DL. Morphine abstinence is associated with increased brain cyclic AMP. Nature 1975; 255: 159-162.
16. Clark AG, Jovic R, Ornellas MR. Brain microsomal protein kinase in the chronically morphinized rat. Biochem Pharmacol 1972; 21: 1.989-1.990.
17. Nestler EJ, Erdos JJ, Terwilliger R, Duman RS, Tallman JF. Regulation of G-proteins by chronic morphine in the rat locus coeruleus. Brain Res 1989; 476: 230-239.
18. Nestler EJ, Tallman JF. Chronic morphine treatment increases cyclic AMP-dependent protein kinase activity in the rat locus coeruleus. Mol Pharmacol 1988; 33: 127-132.
19. Tewilliger RZ, Beitner-Johnson D, Severino KA, Crain SM, Nestler EJ. A general role for adaptations in G proteins and the cyclic AMP system in mediating the chronic actions of morphine and cocaine on neuronal function. Brain Res 1991; 548: 100-110.
20. Matthes HWD, 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 μ-opioid-receptor gene. Nature 1996; 383: 819-823.
21. Koob GF, LeMoal M. Drug abuse: hedonic homeostatic dysregulation. Science 1997; 278: 52-58.
22. Simonin F, Valverde O, Smadja C, Slowe S, Kitchen I, Dierich A et al. Disruption of the kappa-opioid receptor gene in mice enhances the sensitivity to chemical visceral pain, impairs pharmacological actions of the selective kappa-agonist U-50,488H and attenuates morphine withdrawal. EMBO J 1998; 17: 886-897.
23. Hummler E, Cole TJ, Blendy JA, Ganss R, Aguzzi A, Schmid W et al. Targeted mutation of the CREB gene: compensation within the CREB/ATF family of transcription factors. Proc Natl Acad Sci USA 1994; 91: 5.647-5.651.
24. Maldonado R, Blendy JA, Tzavara E, Gass P, Roques BP, Hanoune J et al. A mutation in the CREB gene strongly reduces the withdrawal syndrome in morphine dependent mice. Science 1996; 273: 657-659.
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. Baik JH, Picetti R, Saiardi A, Thiriet G, Dierich A, Depaulis A et al. Parkinsonian-like locomotor impairment in mice lacking dopamine D2 receptors. Nature 1995; 377: 424-428.

DISCUSIÓN

A. Muñoz: ¿Por qué esperabais que fuese tan importante CREB en la expresión de *c-jun* y *c-fos*, cuando no parece ser el principal factor que influye en la expresión de estos dos genes?

R. Maldonado: Si bien está claro que no es importante en la expresión de c-*jun,* sí que podríamos esperar una cierta participación en la de c-*fos.* La idea inicial parte de varios estudios que sugieren la existencia de una correlación entre la actividad del *locus coeruleus* y la expresión comportamental de la abstinencia. Nosotros utilizábamos este marcador de c-*fos* para comprobar cuál era la actividad del *locus coeruleus* durante el proceso de la abstinencia. La administración de clonidina, producto que reduce la sintomatología de la abstinencia, produce también una disminución de la actividad de las neuronas noradrenérgicas en el *locus coeruleus.* Nosotros esperábamos que posiblemente, si había esta disminución de la expresión de la abstinencia, también podría haber una disminución en la expresión de c-*fos.*

A. Muñoz: ¿Sabéis si los animales CREB –/– tienen alterados los niveles de actividad, de cantidad de proteína o de fosforilación del CBP o de las CREM?

R. Maldonado: CREM está regulado al alza, pero en el caso de CBP lo desconozco.

F. Mayor: Puesto que está descrito que en animales que carecen de CREB se ven alterados toda una serie de procesos de memoria a largo plazo, incluso de memoria de contexto, ¿no se puede pensar que esto modifique algunos de los comportamientos que vosotros analizáis?

R. Maldonado: En los resultados que hemos presentado no, porque se trata de estudios de dependencia física, donde no participa la memoria. Pero en experimentos muy recientes, que esperamos se publiquen en breve, se ha observado la preferencia de plaza con animales deficientes en αδ-CREB. Ni en los animales con deficiencias ni en los animales de genotipo normal se observó ningún tipo de modificación de las propiedades reforzantes inducidas por morfina, cocaína ni por comida,

como estímulo natural. En primer lugar, se concluye que en estas condiciones CREB no desempeñarían un papel relevante en las propiedades reforzantes inducidas por dichos estímulos. Y, en segundo lugar, el déficit de memoria inducido en estos animales no sería lo suficientemente importante para que el animal sea incapaz de relacionar estos estímulos con el compartimiento asociado. Cabe añadir que los déficit de memoria se analizaron en estudios de memoria espacial y que aparecieron sólo en ciertas condiciones experimentales particulares, por lo que no se trata de un déficit generalizado. En los últimos estudios realizados con el doble mutante, es decir, un alelo carece de $\alpha\delta$ y el otro alelo carece de $\alpha\beta\delta$, no se observan diferencias relevantes en cuanto a la memoria. Por tanto, actualmente se cuestiona la importancia que en un principio se propuso de CREB para estos procesos de memoria. Si bien posiblemente participa, parece ser que su trascendencia es menor de la que se sugirió al principio.

F. Mayor: En vuestro modelo experimental, ¿se sabe si los distintos agonistas opiáceos promueven diferentes patrones de desensibilización?

R. Maldonado: Nosotros no hemos trabajado sobre este tema, pero el grupo de Erik Nestler sí que ha realizado estudios de este tipo, y parece que existe una implicación de la proteína GRK y de la arrestina en los procesos de dependencia. A pesar de todo, no se dispone todavía de estudios concluyentes al respecto.

V. Ceña: Es sabido que al final, el efecto gratificante de la morfina se basa en la activación de una serie de circuitos eléctricos. ¿Se ha estudiado si se modifica significativamente la transmisión sináptica en el síndrome de abstinencia, en experimentos con rodajas de hipocampo donde está mantenida la estructura entre las neuronas?

R. Maldonado: Se dispone de los datos derivados de experimentos in vivo que reflejan la existencia de un incremento del *firing* en el *locus coeruleus* como consecuencia de la abstinencia. Sin embargo, dicho incremento no aparecía en los primeros estudios sobre abstinencia realizados con rodajas del *locus coeruleus*. Fue posteriormente cuando el grupo de Aghajanian* comprobó la existencia de cierto aumento del *firing* en rodajas del *locus coeruleus*, aunque constataron que era inferior al observado mediante estudios in vivo. Por esta razón, se cree que existen unas aferencias excitadoras que participan también en este proceso de activación del *locus coeruleus* durante la abstinencia y se sugiere particularmente la participación del núcleo paragigantocelularis a través de sus proyecciones glutamatérgicas hacia el *locus coeruleus*. Por tanto, nos hallamos ante un mecanismo intrínseco al *locus coeruleus* representado por los fenómenos adaptativos que se producen en la organización intracelular y, por otra parte, ante un fenómeno extrínseco al *locus coeruleus* derivado del incremento de la liberación de glutamato proveniente del núcleo paragigantocelularis.

V. Ceña: Puesto que parecen estar implicados en la propagación del impulso y en la transmisión sináptica, ¿se podría sugerir que la diana final de todos los procesos bioquímicos que conducen al síndrome de abstinencia fuera precisamente la modificación de la actividad de canales iónicos?

R. Maldonado: No me atrevería a hablar de diana final, pero, evidentemente, se trataría de una de las dianas más importantes. Para explicar la dependencia creo que no nos podemos basar en un sistema exclusivo. Además de la participación del sistema homólogo opioide, también se producen modificaciones heterólogas, como en la dopamina, noradrenalina, péptidos antiopioides, etc. El resultado de los cambios en toda esta serie de sistemas va a dar lugar en su conjunto al proceso de la abstinencia, con la participación de determinados canales iónicos en algunos de ellos.

V. Ceña: Lógicamente me refería a los canales iónicos como un todo.

J.M. Baeyens: Nosotros tenemos datos publicados acerca de que el bloqueo de los canales de calcio dependientes de voltaje tipo L inhibe la abstinencia, mientras que la estimulación de canales de potasio sensibles al ATP inhibe la abstinencia.

R. Trullás: En los mutantes de CREB, ¿habéis estudiado otros factores de transcripción además de c-*fos* y c-*jun*? En segundo lugar, y también en estos animales, ¿se observan alteraciones motoras que pudiesen explicar los déficit en aprendizaje espacial en otros modelos?

R. Maldonado: Hemos estudiado animales deficientes en CREM y, al igual que otros autores, no hemos observado modificación alguna en la gravedad de la abstinencia. Respecto a tu

*Kogan JH, Nestler EJ, Aghajanian GK. Elevated basal firing rates and enhanced responses to 8-Br-cAMP in *locus coeruleus* in brain slices from opiate-dependent rats. *Eur J Pharmacol* 1992; 211: 47-53.

segunda pregunta, se observa una ligera disminución de la actividad locomotora horizontal, aunque difícilmente esto puede interferir en el resultado de la abstinencia, puesto que observamos cambios en todos los parámetros y no sólo en el *jumping*. En cuanto al déficit de memoria espacial, y tratándose de una deficiencia motora tan mínima, tampoco creo que desempeñe un papel importante en el déficit de memoria espacial.

A.M. PLANAS: La abstinencia como síndrome tiene muchos componentes. ¿Hasta qué punto esta serie de parámetros que analizáis son suficientemente representativos del síndrome de abstinencia como para afirmar que no existe en estos animales?

R. MALDONADO: Simplemente constatamos que la expresión somática de la abstinencia está disminuida, sin que esto signifique una abolición de la misma. Por estudios realizados previamente perfectamente estandarizados y aceptados en la actualidad, sabemos que en el ratón existen una serie de signos que están claramente relacionados con la intensidad de la abstinencia, como son el *jumping* y la pérdida de peso. Por nuestros estudios, podemos afirmar que ambos se encuentran disminuidos de una manera notable en estos animales.

J.M. BAEYENS: Con referencia a los ratones con deficiencia de receptores μ_1 naturales, algunos autores han demostrado que en dichos animales algunos agonistas μ producen analgesia. Mi primera pregunta sería, ¿vuestros ratones presentan deficiencias en μ_1 y μ_2? Y, en segundo lugar, ¿observáis los mismos resultados con otros agonistas μ?

R. MALDONADO: Mi opinión es que en los animales que presentan deficiencias de una manera natural existe una disminución en la población de receptores μ sin alcanzarse una abolición total de receptores. Nosotros hemos realizado bastantes estudios con nuestros animales *knock-out* deficientes en receptores μ utilizando diferentes agonistas μ. Hay dos tipos de construcciones: unos *knock-out* que proceden del exón 1, con los que hemos trabajado, y otros *knock-out* del exón 2 que han sido utilizados por otros autores. Todos los grupos estamos de acuerdo en que la morfina no tiene ningún tipo de acción analgésica en animales *knock-out* procedan del exón 1 o del exón 2. Sin embargo, con heroína, morfina-6-glucurónido y 6-acetilmorfina los resultados son algo contradictorios en función de los modelos experimentales utilizados.