

---

# Papel del óxido nítrico en la abstinencia opiácea

---

Juan Carlos Leza, Beatriz Cuéllar, Ignacio Lizasoain, M.<sup>a</sup> Ángeles Moro y Pedro Lorenzo

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

## Introducción

---

En general, los tratamientos farmacológicos de larga duración inducen cambios perdurables en las funciones celulares (en los procesos de síntesis y liberación de neurotransmisores, en los receptores o canales, en los mensajeros intracelulares e incluso cambios en su genoma)<sup>1</sup>. En el caso de los opiáceos estas modificaciones ocurren tanto en neuronas opioides como en células que están bajo la influencia de éstas. La expresión de estos cambios en respuesta a la exposición crónica a opiáceos es el desarrollo de tolerancia y dependencia de sus efectos.

Los opiáceos son fármacos ampliamente utilizados en el tratamiento de las situaciones dolorosas de intensidad de moderada a grave, y a menudo es necesaria su administración crónica. De esta forma, el desarrollo de tolerancia a su efecto analgésico y a otros efectos es muy frecuente. Aunque aparece muy raramente en la clínica, es posible que este “nuevo ambiente” tras el uso crónico sea roto de manera brusca. Entonces aparece el síndrome de abstinencia.

Describiremos algunos términos básicos que ayudarán a entender este “nuevo ambiente” y los acontecimientos que siguen a su ruptura. Las drogas de abuso se definen clásicamente como sustancias que pueden producir dependencia física, psicológica o ambas, y su administración crónica es definida como adicción<sup>2</sup>.

*Tolerancia* representa la reducción de los efectos de la droga tras la administración repetida de ésta a dosis iguales, o la necesidad de incrementar las dosis para que aparezcan los mismos efectos. *Dependencia* se define como un estado que se manifiesta por alteraciones físicas o psicológicas tras el cese de la droga. Por último, *drogadicción* se define como un constructo biológico, psicológico y conductual cuyo dato fundamental es el uso compulsivo de la sustancia, a pesar de que las consecuen-

cias adversas son muy evidentes incluso para el propio sujeto<sup>3</sup>. Los mecanismos bioquímicos o moleculares de estas tres fases son todavía objeto de intensa investigación. El propósito de este artículo es presentar las evidencias que señalan un importante papel regulador de la vía aminoácidos excitadores (AAE):L-arginina:óxido nítrico (NO) en la modulación de la cascada de fenómenos que preceden al síndrome de abstinencia y concurren en él.

El síndrome de abstinencia no es una situación dramática en términos de mortalidad (excluyendo violencia o traumatismos), pero el conocimiento de los mecanismos que llevan a la dependencia y a la abstinencia es esencial para prevenir el círculo vicioso *abuso-abstinencia-recaída*. Las fuertes respuestas psicológicas y conductuales tras la abstinencia contribuyen a la recaída, y evitar la abstinencia es seguramente una de las principales causas por las que los adictos continúan la administración crónica de la sustancia.

Obviamente, este comportamiento que se autoalimenta no es la única causa de la dependencia. Las drogas de abuso son “reforzadores” muy potentes. La capacidad reforzadora positiva de las drogas refleja su potencia para producir dependencia psicológica y numerosas evidencias sugieren que existe un circuito localizado principalmente en el área tegmental ventral y el *nucleus accumbens*, que es común para la mayoría de las drogas de abuso<sup>3,4</sup>.

Los mecanismos bioquímicos implicados en el desarrollo de la dependencia física y el síndrome de abstinencia no están absolutamente esclarecidos. Existen numerosos sistemas implicados en este fenómeno<sup>5</sup>: agentes que actúan a través de receptores opioides (opiáceos exógenos o péptidos opioides), péptidos no opioides, inhibidores de peptidasas o encefalinasas, neurotransmisores (serotonina, catecolaminas, adenosina, aminoácidos excitadores [AAE] o inhibidores), bloqueadores de los canales de calcio, agentes que modifican los sistemas de se-

gundos mensajeros (AMPC y GMPc), inmunomoduladores, etc. Uno de los sistemas implicados más recientemente es el NO. En esencia, los datos disponibles hasta el momento indican que el NO está implicado en los procesos de dependencia y abstinencia, pero todavía no está claro si se trata de una causa o de una consecuencia de otros procesos. Comenzaremos por presentar algunos aspectos básicos de la abstinencia a opiáceos, y posteriormente exploraremos las evidencias que demuestran que la vía metabólica AAE:NO está implicada en la dependencia física a opiáceos.

**El síndrome de abstinencia a opiáceos**

Como hemos comentado previamente, la definición clásica de adicción requiere por lo general la evidencia de que existe dependencia física. Experimentalmente, la única vía para identificar si una sustancia produce dependencia física es el estudio del síndrome de abstinencia<sup>6</sup>. En humanos, el síndrome de abstinencia se describe por una mezcla de ansiedad, disforia y deseo de droga, acompañado de evidentes síntomas somáticos. El síndrome de abstinencia es, por lo general, fácil de reproducir en el laboratorio, administrando un antagonista o cesando bruscamente la administración de la droga. En la mayoría de los estudios se utilizan roedores. En la tabla I se presentan los signos y síntomas de abstinencia más evidentes en varias especies animales.

Existen numerosas evidencias de que se trata de un síndrome influido por múltiples mecanismos<sup>7</sup>: a) la complejidad del curso temporal, comienzo y duración del síndrome (por lo general en dos fases: primera, estimuladora, y segunda, depresora); b) la diversidad de aproximaciones terapéuticas que han demostrado algún efecto antiabstinencia, y c) la localización de múltiples sustratos neuroanatómicos de la dependencia física.

Las áreas anatómicas que participan en el síndrome de abstinencia han sido ampliamente estudiadas mediante inyecciones intracerebrales de antagonistas opiáceos o lesionando ciertas vías nerviosas en animales morfíno-dependientes. Uno de los trabajos más relevantes fue el de Maldonado et al<sup>8</sup>, en el que inyectaron metilnaloxonio en áreas cerebrales muy concretas de ratas con dependencia a la morfina. Los núcleos más sensibles fueron el *locus coeruleus* y la sustancia gris periacueductal. Sin embargo, la expresión de la mayoría de los signos del síndrome de abstinencia tiene un sustrato anatómico múltiple. Existen también otros síntomas periféricos de tipo secretor (diarrea, salivación, lagrimeo y rinorrea) que pueden provocarse tras la administración central de un antagonista<sup>9,10</sup>, lo que indica que, además de estructuras periféricas, existe una participación importante de estructuras centrales (médula espinal) en los efectos periféricos<sup>11</sup>.

El *locus coeruleus* es un pequeño núcleo que contiene la mayor parte de los cuerpos neuronales de neuronas noradrenérgicas del

TABLA I  
SÍNTOMAS Y SIGNOS DE ABSTINENCIA OPIÁCEA EN VARIAS ESPECIES<sup>5</sup>

Ratón	Rata	Humano
Hiperactividad	Hiperactividad	Deseo de droga, ansiedad, llanto,
Salto	Salto	congestión nasal, sudor, bostezos,
Pérdida de peso	Pérdida de peso	dificultad para dormir, midriasis,
Hipotermia	Hipotermia	piloerección, temblor,
Micción	Micción	"flashes" de frío y calor, dolores
Diarrea	Diarrea	óseos y musculares, anorexia,
Sacudidas	Sacudidas	insomnio, náuseas, vómitos,
Temblor	Lagrimeo	diarreas, contracturas abdominales,
Movimientos	Ptosis	HTA, hipertermia, hiperpnea,
estereotipados	Castañeteo de dientes	pérdida de peso,
	Priapismo	eyaculaciones espontáneas
	Salivación	
	Contracturas abdominales	
	Movimientos estereotipados	
	Agresividad	
	Rinorrea	

sistema nervioso central<sup>12</sup>, además de poseer una gran densidad de receptores opioides<sup>13</sup>. Tanto las proyecciones aferentes como las eferencias de este núcleo están muy extendidas por todo el sistema nervioso central<sup>14,15</sup>.

Durante la abstinencia precipitada por naloxona en animales con dependencia de morfina se observa una activación de las neuronas del *locus coeruleus*<sup>16</sup>. Este incremento en la actividad se correlaciona directamente con los síntomas de abstinencia y coexiste con un incremento en el recambio de noradrenalina en el *locus coeruleus* y en sus áreas de proyección<sup>17,18</sup>. El primer estudio de Aghajanian<sup>16</sup> demostró también que la estimulación del autorreceptor adrenérgico  $\alpha_2$  por clonidina suprime los cambios inducidos por la abstinencia. Las primeras (y todavía útiles) aproximaciones terapéuticas no sustitutivas del tratamiento de la abstinencia incluían clonidina y otros estimulantes  $\alpha_2$ . Estas evidencias sugirieron que la hiperactividad noradrenérgica mediaba la expresión de la mayoría de los componentes del síndrome de abstinencia a morfina en áreas del sistema nervioso central invadas por el *locus coeruleus*.

Este incremento en la transmisión noradrenérgica durante el síndrome de abstinencia ocurre también en la periferia<sup>19,20</sup> y es responsable de algunos síntomas periféricos que pueden ser utilizados como índice de abstinencia (p. ej., incremento de la presión arterial)<sup>21</sup>.

### Regulación aminoacidérgica del locus coeruleus

La "tormenta noradrenérgica" que ocurre en el *locus coeruleus* durante la abstinencia opiácea puede verse influida por otros sistemas neurotransmisores. Una parte sustancial de la hiperactividad coerulear inducida por la abstinencia opiácea es mediada por un *input* aminoacidérgico al *locus coeruleus*, que se describió por estudios electrofisiológicos y neuroanatómicos<sup>22,23</sup>. Se han descrito también otras relaciones entre los sistemas noradrenérgico y aminoacidérgico en distintas áreas cerebrales que controlan la presión arterial<sup>24</sup> o la función neuroendocrina<sup>25,26</sup>.

Tras estas primeras descripciones, también se demostró que el incremento en la liberación de AAE (glutamato y aspartato) ocurría dentro del *locus coeruleus* durante el síndrome de abstinencia<sup>27</sup>. Por otra parte, el hecho de que la hiperactividad de las neuronas coeruleares fuera más pronunciada en modelos *in vivo* que

*in vitro* (rebanadas de *locus coeruleus*)<sup>28</sup> indicaba la existencia de neuronas aferentes al *locus coeruleus* que controlaban esta hiperactividad, que serían desconectadas en la preparación de rebanadas. Varios estudios demostraron que la activación de estas neuronas era controlada por una amplia red de conexiones aminoacidérgicas, principalmente desde el núcleo *paragiganto-cellularis* (PGi) y el núcleo *prepositus hypoglossi* (PHi)<sup>22,29,30</sup> y otras, posiblemente desde la lámina I de la médula espinal<sup>31</sup>. La regulación aminoacidérgica puede partir también del propio *locus coeruleus*. De hecho, Fung et al<sup>32</sup> describieron tres tipos de neuronas coeruleares en rata y ratón: las que son positivas a la inmunotinción con tirosina hidroxilasa, las que son inmunorreactivas para glutamato, y las que se tiñen con los dos antígenos.

Así mismo, la regulación aminoacidérgica del *locus coeruleus* durante el síndrome de abstinencia puede ser regulada a su vez por otros sistemas neurotransmisores: el incremento de la transmisión serotoninérgica atenúa el componente glutamatérgico del síndrome de abstinencia en el *locus coeruleus*<sup>28</sup>. Una de las cuestiones que quedan por resolver es si los AAE pueden regular también los cambios en otras áreas fuera del *locus coeruleus*.

El hecho de que la estimulación del receptor NMDA en células cerebelosas iba seguido de la liberación del factor relajante de origen endotelial (EDRF)<sup>33</sup>, identificado a posteriori como NO<sup>34</sup>, y la posterior identificación de la NO sintasa en el tejido cerebral<sup>35</sup>, llevó al establecimiento de la vía AAE:L-arginina:NO. El principal mecanismo de transducción del NO es la formación de GMPc, el cual puede modificar la liberación de neurotransmisores en otras neuronas<sup>36,37</sup> (fig. 1). Veamos, en resumen, cuál es el significado fisiopatológico de esta vía en el sistema nervioso central.

### La vía AAE/L-arginina:NO en el sistema nervioso central

El NO, que es sintetizado por la enzima NO sintasa (NOS), es un importante mensajero inter e intracelular. La NOS cataliza la oxidación del aminoácido L-arginina a NO más citrulina (equimolecular). Esta enzima fue identificada en un principio en el endotelio vascular<sup>38,39</sup>, pero también desempeña un importante papel en otros tejidos como el sistema nervioso central y periférico<sup>40</sup>. Existen dos clases de NOS, dependiendo de la sensibilidad al calcio: las constitutivas (dependientes del calcio, princi-

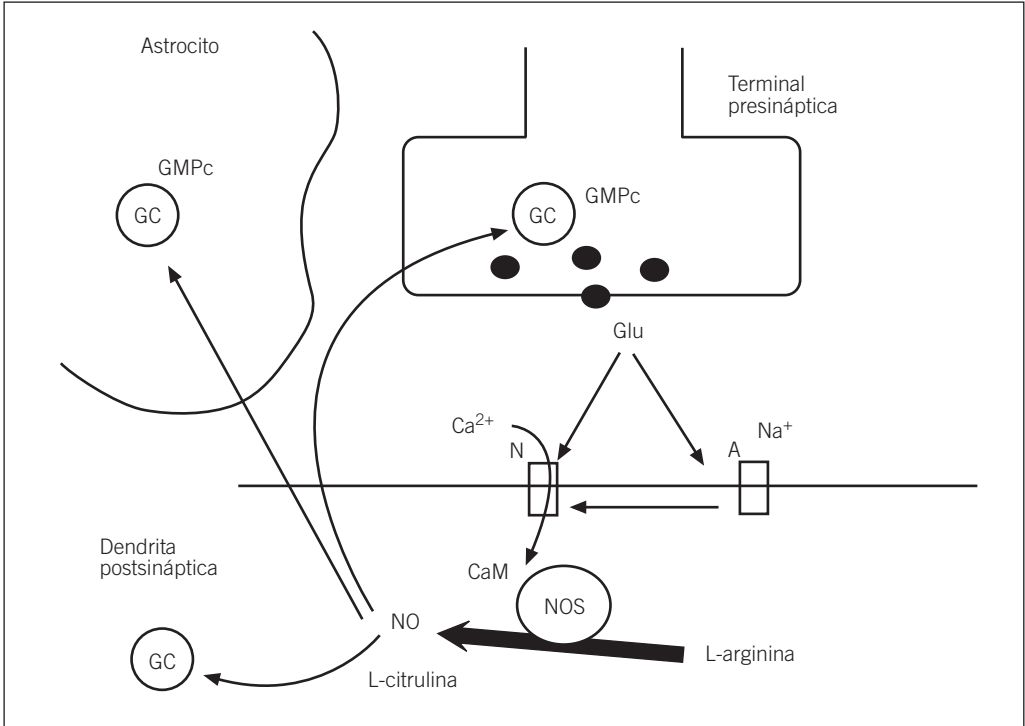


Fig. 1. El glutamato (glu) liberado de la terminal presináptica actúa sobre receptores NMDA (N) y no NMDA (A), lo que produce un aumento de la entrada de Ca<sup>2+</sup>. La calmodulina (CaM) activa la NOS, que forma NO. El NO se difunde hacia otras células. El principal mecanismo de transducción neuronal es la estimulación de la guanilato ciclasa soluble (GC), lo que aumentaría las concentraciones de GMPc. (Modificada de Garthwaite<sup>37</sup>.)

palmente en neuronas, nNOS y endotelial, eNOS), y la inducible (independiente del calcio, iNOS, descrita inicialmente en macrófagos, hepatocitos y células gliales).

En los últimos años numerosas evidencias han sugerido el papel del NO en el sistema nervioso central en muchos procesos fisiológicos y fisiopatológicos<sup>40-42</sup>. Alguno de los papeles fisiológicos propuestos para el NO en el sistema nervioso central son: desarrollo cerebral, plasticidad neuronal, formación de memoria (potenciación perdurable LTP en el hipocampo), regulación de la circulación cerebral, hiperalgesia o estrés<sup>43-47</sup>. Por otra parte, concentraciones excesivas de AAE (glutamato) y un incremento de la síntesis de NO también se ha demostrado en procesos patológicos como epilepsia, lesión hipóxico-isquémica<sup>48-51</sup> y un amplio espectro de enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer y de Parkinson o la corea de Huntington<sup>52-55</sup>. En la actualidad, todavía no se conoce con exacti-

tud si el NO u otras sustancias relacionadas son causa o consecuencia de estos procesos.

La formación de NO en varias áreas cerebrales ha sido investigada directa o indirectamente por varios métodos: a) la formación de citrulina marcada con <sup>3</sup>H o <sup>14</sup>C a partir de L-arginina marcada es quizás el método más ampliamente utilizado<sup>36,56</sup>; b) mediciones cuantitativas de la generación de NO midiendo la oxidación de la hemoglobina o la formación de NO<sub>2</sub><sup>-</sup> + NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, NO<sub>x</sub><sup>-</sup>; c) cuantificación del GMPc, el producto de la estimulación de la guanilato ciclasa soluble por NO<sup>57</sup>, y d) técnicas histoquímicas, con anticuerpos específicos mono o policlonales contra las isoformas neuronal, endotelial e inducible<sup>58</sup>. Estos estudios revelaron la presencia de NO en muchas áreas del cerebro. Los primeros estudios, en 1990, demostraron claramente que la actividad sintetizadora de NO está presente en todo el cerebro en la rata y otras especies, con áreas de alta (cerebelo y bulbo olfatorio), media (hipotálamo y mesencéfalo),

baja (estriado, corteza e hipocampo) y muy baja actividad (médula oblongada)<sup>59,60</sup>.

### Óxido nítrico y dependencia física a opiáceos

#### *La formación de NO está elevada en la dependencia y la abstinencia*

Curiosamente, los primeros datos sobre una posible implicación del NO en la abstinencia opiácea se obtuvieron al observar que la administración de inhibidores de la NOS conseguía disminuir la abstinencia. No fue hasta 1994 cuando se observó que, durante la dependencia de la morfina, se producía un aumento de las concentraciones cerebrales de los metabolitos estables del NO ( $\text{NO}_2^-$  y  $\text{NO}_3^-$ ). Posteriormente, nuestro grupo<sup>61</sup> consiguió demostrar que durante el tratamiento crónico con morfina se producía una elevación de la actividad de la NOS dependiente del calcio en el sistema nervioso central (fig. 2). Además, estudios no publicados de nuestro laboratorio indican que existe un aumento de la expresión de la nNOS

observado por técnicas inmunohistoquímicas en varias áreas cerebrales (bulbo olfatorio, *locus coeruleus*, nervios del tracto solitario, nervio prepósito hipoglosa y cerebelo). Este aumento de la NOS es paralelo al incremento del GMPc durante la dependencia opiácea<sup>62</sup>.

En cuanto a los cambios que ocurren en la abstinencia, investigaciones previas demostraron que los valores de GMPc estaban elevados en cerebelo en ratas con abstinencia a la morfina<sup>63</sup>. Posteriormente, se presentaron varias evidencias que indicaban un estado de hiperproducción de NO durante la abstinencia: tanto la concentración de  $\text{NO}_x^-$  en el tejido cerebral<sup>64</sup> como la actividad NOS<sup>65</sup> estaban aumentadas durante la abstinencia. Por último, nuestro grupo demostró, además, que este aumento de la actividad NOS dependiente del calcio durante la abstinencia se correlacionaba directamente con la gravedad de ésta<sup>66</sup> (fig. 3).

El significado de este aumento de la expresión de la NO sintasa *constitutiva* no inducida no es conocido en este momento, aunque se han identificado varias situaciones en las que puede ocurrir<sup>67</sup>.

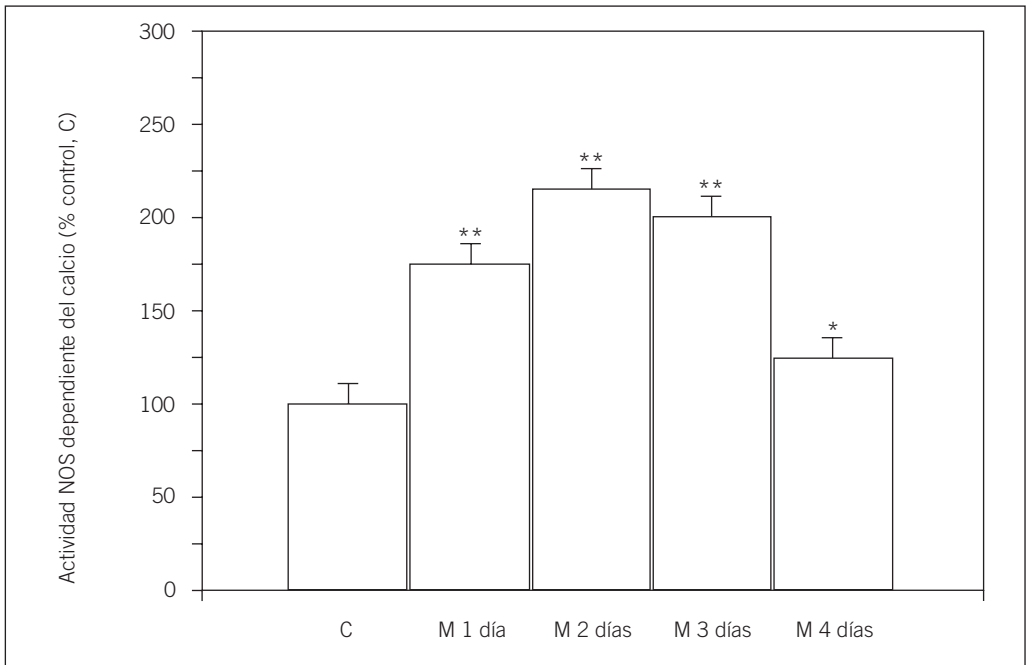


Fig. 2. Aumento de la actividad de la NOS en la dependencia de morfina por implantación s.c. de un pellet de 75 mg de morfina (M). Control: pellet placebo. (Para más detalles, véase Leza et al<sup>61</sup>); \* $p < 0,05$  y \*\* $p < 0,01$  respecto al grupo control.

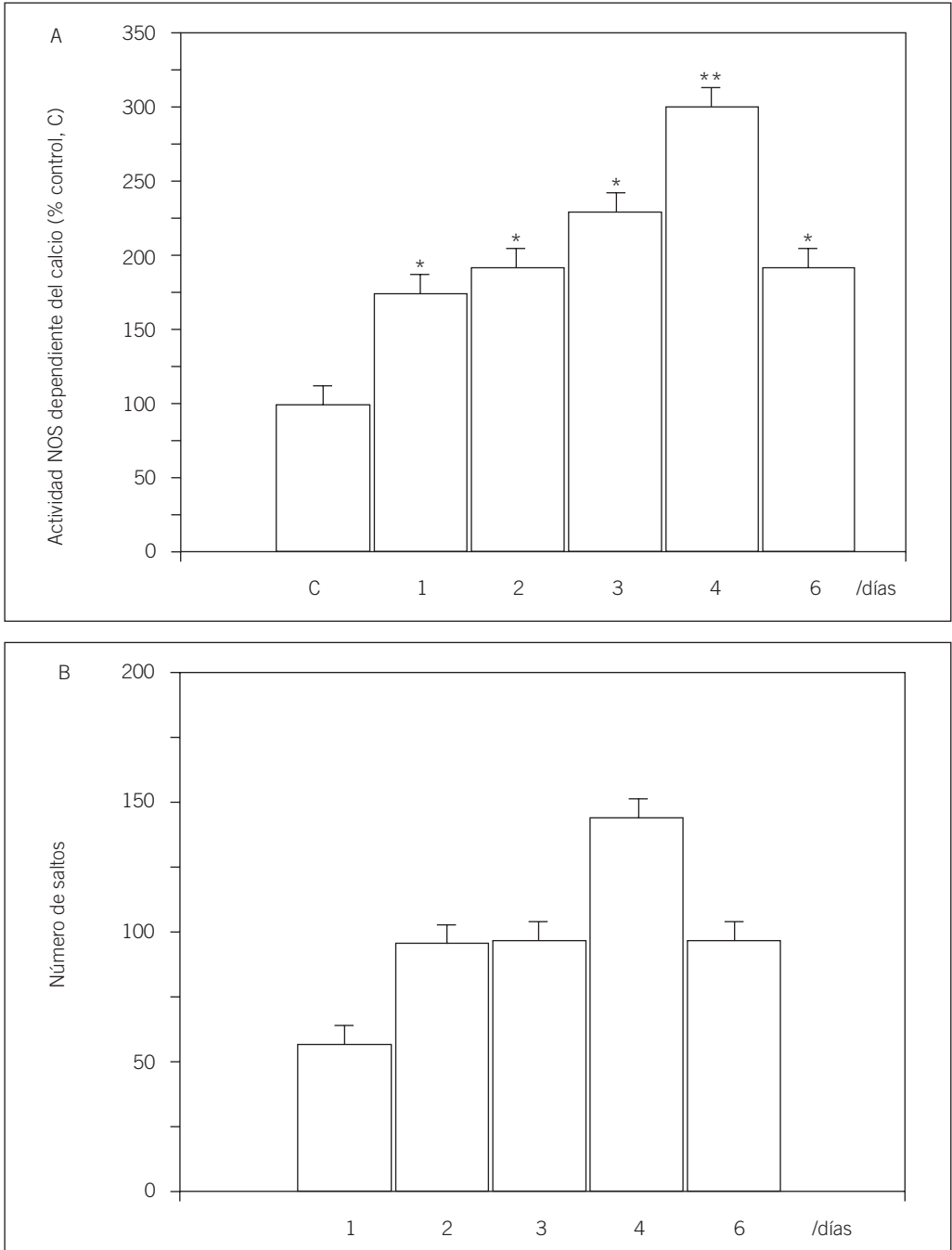


Fig. 3. Correlación directa entre el aumento de la actividad de la NOS (A) y la gravedad (número de saltos) (B) del síndrome de abstinencia inducido por naloxona tras 1-6 días de adicción en ratones. (Para más detalles, véase Leza et al<sup>66</sup>); \* $p < 0,05$  y \*\* $p < 0,01$  respecto al grupo control.

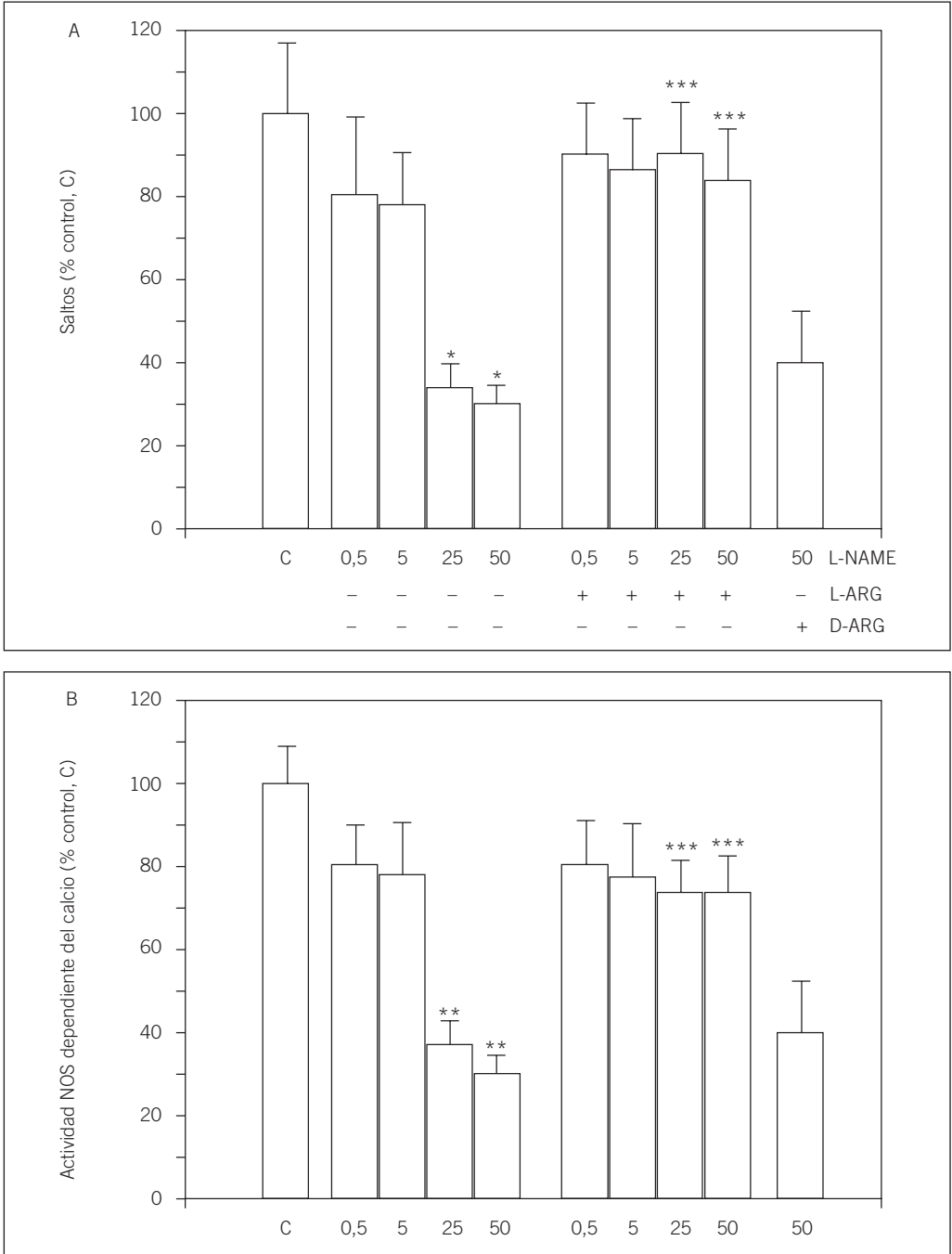


Fig. 4. L-NAME previene los síntomas de abstinencia (número de saltos) (A) y la hiperactividad de la NOS (B) en ratones con abstinencia por administración de naloxona el cuarto día de adicción. Reversión por L-arginina (L-ARG), pero no por D-arginina (D-ARG). (Para más detalles, véase Leza et al<sup>66</sup>); \* $p < 0,01$  y \*\* $p < 0,001$  respecto al grupo control; \*\*\* $p < 0,05$  respecto al grupo tratado con L-NAME.

TABLA II  
EFECTOS DE LA ADMINISTRACIÓN AGUDA Y CRÓNICA\* DE INHIBIDORES DE NO SINTASA EN LA

Referencia bibliográfica	68			76		103	69		
	NAME	NO <sub>2</sub> Arg	NMMA	NAME	NAME*	NO <sub>2</sub> Arg	NO <sub>2</sub> Arg	NO <sub>2</sub> Arg*	NAME
	7,5-400 mg/kg i.p.	3,5-100 mg/kg i.p.	3,5-100 mg/kg i.p.	100 mg/kg s.c.	12 mg 7 días microbomba	1-8 mg/kg 10 días i.p.	7,5-10 mg/kg i.p.	1-7,5 mg/kg b.i.d. 4 días	7,5-60 mg/kg i.p.
Salto	U	U	O			Dism.			
Sacudidas				Dism.	Dism.		Dism.	Dism.	Dism.
Diarrea	Dism.	Dism.	O	Dism.	Dism.				
Pérdida de peso				Dism.	Dism.		Dism.	Dism.	Dism.
Castañeteo de dientes				Dism.	Dism.			Aum.	
Movimientos estereotipados									

Dism.: disminuye; Aum.: aumenta; Dism./Aum.: dosis bajas aumentan, dosis altas disminuyen; O: no cambia; U: no dependiente de la dosis (sólo disminuye a dosis intermedias).

Métodos (animal/dependencia/abstinencia): ratón/pellet 25 mg/naloxona 4 mg/kg<sup>68</sup>; rata/pellet 75 mg/naloxona 0,5 mg/kg<sup>76</sup>; ratón/inyecciones/naloxona 1 mg/kg<sup>103</sup>; rata/pellet 75 mg/naloxona 0,5 mg/kg<sup>69</sup>; rata/pellet 75 mg/naloxona 0,5 mg/kg<sup>104</sup>; ratón/inyecciones/naloxona 2 mg/kg<sup>105</sup>; ratón/pellet 75 mg/naltrexona 50 µg/kg<sup>72</sup>; rata/pellet 75 mg/naltrexona 5 mg/kg<sup>106</sup>; rata/pellet 25 mg/naloxona 4 mg/kg<sup>76</sup>; ratón/pellet 75 mg/naloxona 1 mg/kg<sup>66</sup>.

### Los inhibidores de la NOS previenen la abstinencia

Los primeros estudios demostraron que los inhibidores de la NOS como el L-NAME (N<sup>ω</sup>-nitro-L-arginina metil éster) y NO<sub>2</sub>Arg inhibían el salto estereotipado y la diarrea cuando se inyectan antes de la administración de naloxona en ratones con dependencia a la morfina<sup>68</sup> (fig. 4). A lo largo de los últimos años se han encontrado resultados similares (tabla II) utilizando otros inhibidores de la NOS.

Uno de los primeros estudios que demostró que la inhibición de la NOS por NO<sub>2</sub>Arg atenúa varios de los signos de la abstinencia en ratas demostró también que estos efectos están claramente afectados por el régimen de dosis<sup>69</sup>. La reducción de las sacudidas y pérdida de peso tras la administración de NO<sub>2</sub>Arg y L-NAME es dependiente de la dosis cuando se administran 1 h antes de la naloxona, pero no si se administran durante el período de adicción (4 días). Estos datos podrían indicar

que la inhibición de la NOS afecta a la expresión de la abstinencia, más que al desarrollo de la dependencia en ratas. Un estudio más reciente afirma que tanto L-NAME como L-NMMA no tienen efectos sobre la abstinencia si se administran durante la inducción de la dependencia física a la morfina, pero pueden disminuir la abstinencia cuando se administran durante la fase de expresión del síndrome<sup>70</sup>.

Otra cuestión de interés es el hecho de que la inhibición de la abstinencia a la morfina por varios inhibidores de la NOS está limitada a un cierto rango de dosis y presenta una curva acampanada: el efecto antiabstinencia del L-NAME es evidente entre 7,5 y 100 mg/kg, pero dosis de 200-400 mg/kg no tienen este efecto<sup>66,68</sup>. La NO<sub>2</sub>Arg también describe este tipo de curva. Este perfil es similar al que se observa con MK-801 y otros bloqueadores de los receptores NMDA y no NMDA<sup>71,72</sup>. La razón de este hecho es desconocida, pero deben considerarse otros mecanismos activados por las altas concentraciones<sup>73</sup>: por ejemplo, la



## ABSTINENCIA MORFÍNICA

104				105		72	106	73	66	
7-NI	NIO	NAME	NO <sub>2</sub> Arg	NAME	NO <sub>2</sub> Arg	NMMA	NMMA	7-NI	NO <sub>2</sub> Arg	NAME
1,8-100 mg/kg s.c.	1-300 mg/kg s.c.	1 a 56 mg/kg s.c.	1 a 30 mg/kg s.c.	5 a 20 mg/kg i.p.	5 a 20 mg/kg i.p.	0,02-4 mg/kg i.p.	2 a 8 mg/kg s.c.	6,25-50 mg/kg s.c.	7,5-100 mg/kg s.c.	0,5-400 mg/kg s.c.
Aum. (?)	Aum. (?)	O	O	Dism.	Dism.	Dism.	Dism.	O	O	U
Dism.	Dism.	Dism.	Dism.	O	O			Dism.	Dism.	Dism.
Dism.	Dism.	Dism.	Dism.	Dism.	O	Dism./ Aum.		U		Dism.
Dism.	O	Dism.	Dism.	Dism.	O	Dism.			U	
Dism.	O	O	O				O	Dism.	Dism.	
Dism.	Dism.	Dism.	Dism.	Dism.	Dism.		O	U		Dism.

Otros síntomas evaluados: salivación:  $\beta$  por NAME i.p.<sup>76</sup> y 7NI s.c.<sup>104</sup>; lagrimeo:  $\beta$  por NAME s.c.<sup>76</sup>; ptosis:  $\beta$  por NAME s.c.<sup>76</sup>; rinorrea:  $\beta$  por NAME s.c.<sup>76</sup>; temblor:  $\beta$  por NAME s.c.<sup>66</sup>; priapismo:  $\beta$  por 7NI y NO<sub>2</sub>ARG<sup>73</sup>.

NAME: N<sup>o</sup>-nitro L-arginina metil éster; NO<sub>2</sub>Arg: N<sup>o</sup>-nitro L-arginina; NMMA: L-N<sup>o</sup>-monometil arginina; 7NI: 7-nitroindazol; NIO: N(5)-(1-iminoetil)-L-ornitina.

conversión de NO<sub>2</sub>Arg a L-arginina<sup>74</sup> pudiera ser una de las explicaciones. Este tipo de curvas se observan también con algunos de los efectos antiabstinencia del 7-NI (7-nitro indazol), un inhibidor selectivo de la isoforma neuronal de la NOS<sup>73,75</sup>.

Se han sugerido múltiples explicaciones de la disminución del síndrome de abstinencia a opiáceos tras la inhibición de la NOS<sup>68,69,76</sup>. La principal explicación se refiere al efecto del NO sobre la liberación presináptica de neurotransmisor. La disminución de la liberación del neurotransmisor tras la administración de un inhibidor de la NOS podría atenuar los síntomas de abstinencia. La noradrenalina podría ser uno de estos neurotransmisores. Esta conexión catecolaminérgica viene apoyada por el hecho de que el GMPc incrementa la tirosina hidroxilasa<sup>77</sup> y potencia la liberación presináptica de catecolaminas<sup>78</sup>. También se ha sugerido que la hipoactividad dopaminérgica podría ser un factor que contribuya a los efectos conductuales de la inhibición del síndrome de abstinencia

por inhibidores de la NOS<sup>79</sup>, ya que la administración exógena de NO estimula la liberación de dopamina en rebanadas de cerebro<sup>80</sup>. También es posible una conexión colinérgica: durante la abstinencia precipitada por antagonista se produce un incremento de la transmisión colinérgica<sup>81,82</sup>, y se sabe que se requiere el GMPc para la liberación de acetilcolina (ACh)<sup>83</sup>. Algunos estudios indican que el mecanismo antiabstinencia de los antagonistas de glutamato<sup>84</sup> y de inhibidores de la NOS<sup>85</sup> es la inhibición de la liberación de ACh. También se ha implicado una conexión de adenosina: los agonistas de receptores de adenosina poseen un potente efecto antiabstinencia<sup>86</sup> y la inhibición de la NOS estimula la liberación de adenosina<sup>87</sup>. Otros neurotransmisores han sido implicados en los mecanismos que inducen el salto compulsivo durante la abstinencia a morfina precipitada por naloxona, como serotonina, ácido gamma aminobutírico, histamina y otros. Sin embargo, la relación precisa entre el NO y estos neurotransmisores no se conoce.

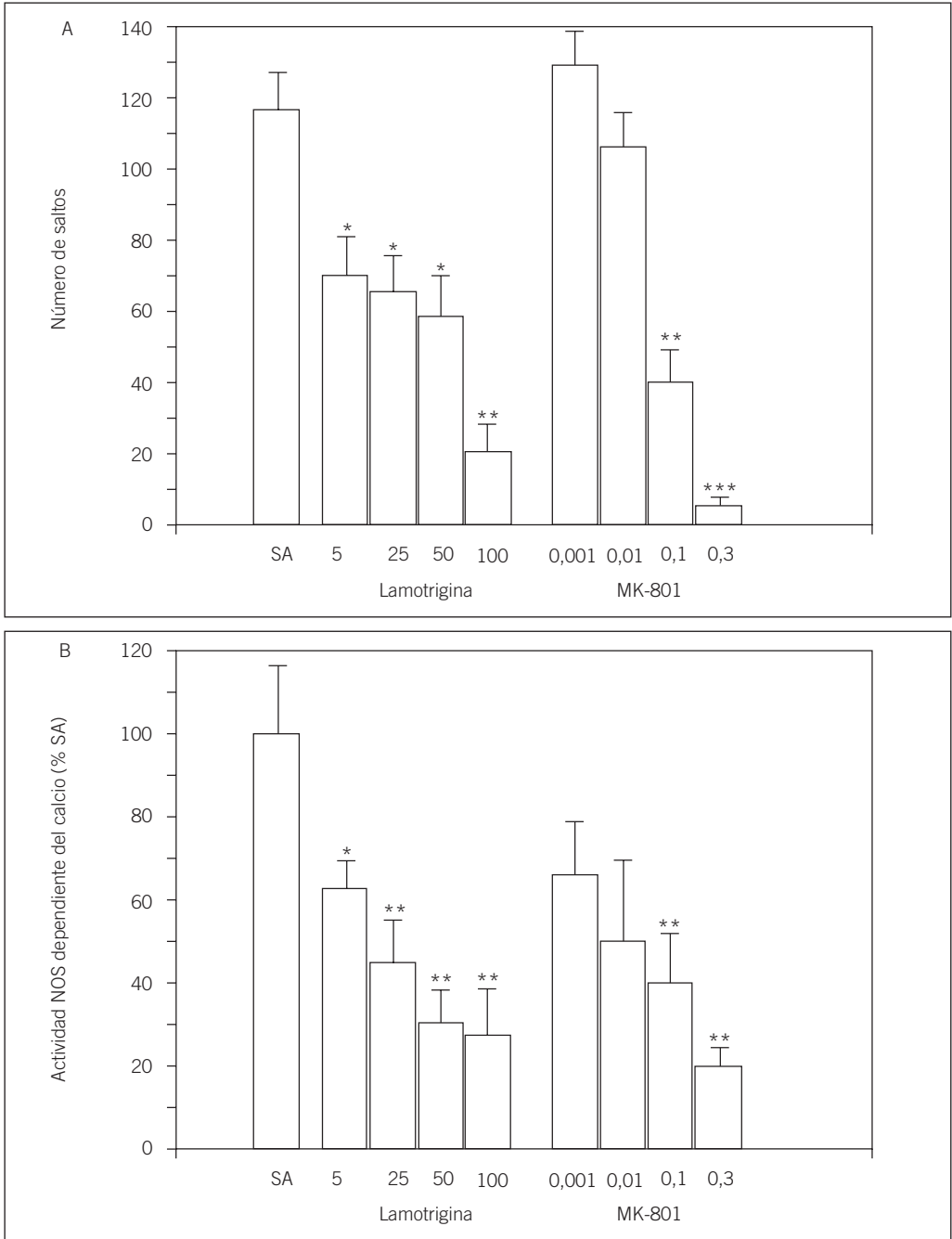


Fig. 5. Lamotrigina y MK-801 previenen los síntomas de abstinencia (número de saltos) (A) y la hiperactividad de la NOS (B) en ratones con síndrome de abstinencia (SA) por administración de naloxona el cuarto día de adicción. (Para más detalles, véase Lizaola<sup>99</sup>); \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  y \*\*\* $p < 0,001$  respecto al grupo con síndrome de abstinencia.

Otra cuestión importante es la posibilidad de que los efectos antiabstinencia de los inhibidores de la NO sintasa estén relacionados con sus propiedades ansiolíticas. De hecho, la abstinencia a la morfina ha sido utilizada como modelo de estrés<sup>88</sup>, y el NO ha sido implicado como una "hormona de estrés"<sup>45,47</sup>. De esta forma, los efectos ansiolíticos de los inhibidores de la NOS<sup>89</sup> podrían tomar parte en el efecto antiabstinencia de estos compuestos.

### *La conexión aminoacidérgica*

Los primeros intentos de disminuir el incremento de la transmisión aminoacidérgica en el *locus coeruleus* durante la abstinencia opiácea<sup>27</sup> se basaron en el uso de antagonistas de receptores de AAE. Estos agentes atenúan los cambios conductuales y también las alteraciones eléctricas o bioquímicas en la abstinencia en varias especies animales<sup>23,84,90-93</sup>.

Aunque el antagonista no competitivo NMDA dizocilpina (MK-801) es el más ampliamente utilizado, compuestos con diferentes características, como agentes competitivos no NMDA (DNQX: 6,7-dinitro-quinoxalina 2,3-diona) o antagonistas del lugar de unión a estricnina del receptor NMDA (5,7 DCKA: ácido 5,7-diclorokinurénico), atenúan el salto estereotipado inducido por naloxona en ratones dependientes de morfina. En un intento de explicar este mecanismo de acción común, Cappendijk et al<sup>71</sup> propusieron que los antagonistas NMDA podrían disminuir la liberación de norepinefrina o bien su actividad<sup>94,95</sup>. Por otra parte, los antagonistas NMDA tienen actividad ansiolítica<sup>96,97</sup>, lo que podría inhibir el salto, ya que la ansiedad es un síntoma generalizado en el síndrome de abstinencia en animales y en humanos<sup>98</sup>. En la búsqueda de una explicación bioquímica a estos hallazgos, Cappendijk et al<sup>68</sup> sugirieron por vez primera la posibilidad de que el efecto antiabstinencia de los antagonistas de receptores de AAE podría deberse a la disminución de la producción de NO.

En concordancia con esta última hipótesis, nuestro grupo de trabajo ha demostrado que la inhibición de la síntesis de NO puede ser el mecanismo por el cual agentes bloqueadores de receptores de AAE como MK-801 y agentes inhibidores de la liberación de AAE como lamotrigina (3,5-diamino-6-[2,3-diclorofenil]-1,2,4-triazina) atenúan la abstinencia opiácea en ratones<sup>99</sup> (fig. 5).

## **Conclusión y perspectivas**

El NO es un modulador de los procesos que llevan al desarrollo de la dependencia opiácea y a la expresión de la abstinencia, y la vía AAE:L-arginina:NO:GMPc podría ser un eje en los cambios neuronales durante el tratamiento con opiáceos previo a la abstinencia. La comprensión de los mecanismos de esta interacción y la dilucidación de los neurotransmisores, receptores y segundos mensajeros implicados servirá para diseñar estrategias alternativas en el tratamiento de la dependencia y abstinencia opiácea.

¿Cuáles podrían ser las futuras direcciones de investigación en esta área para comprobar las posibilidades reales de estos tratamientos en humanos? En primer lugar, sería interesante estudiar los efectos de los antagonistas de receptores de AAE o de inhibidores de la NOS en modelos de abstinencia por privación, no en modelos de abstinencia inducida por antagonistas. Por otra parte, sería interesante evaluar cómo los antagonistas NMDA o los inhibidores de la NOS podrían inhibir la abstinencia una vez que se ha expresado ésta. De hecho, los pacientes heroínómanos piden intervención médica cuando ya están sufriendo las consecuencias de la abstinencia.

Según una de las últimas reuniones sobre el papel de los sistemas glutamatérgicos en el desarrollo de la abstinencia opiácea, auspiciado por el National Institute on Drug Abuse<sup>100</sup>, la significación clínica de los antagonistas de AAE o inhibidores de la NOS radica en tres posibles usos principales: el primero es su uso en la prevención de las recaídas (sobre la base de que la recaída es un proceso de memoria y con estos agentes puede evitarse el estímulo de la "perdurabilidad" que ejerce el NO en los modelos de LTP). El segundo es el tratamiento de los síntomas de abstinencia a opiáceos, y el tercero es la posibilidad de que estos agentes puedan ser coadministrados con otros agentes ya en uso como metadona, levo-alfa acetil metadol, clonidina o guanfacina, para acortar la transición a un programa de naltrexona.

Otro punto de investigación es el papel de la vía AAE:NO en la recompensa opiácea y en los efectos reforzadores de las drogas de abuso, principalmente en la transmisión dopaminérgica entre al área tegmental ventral y el *nucleus accumbens*. Otra cuestión importante es determinar los cambios en la vía AAE:NO tras la administración crónica de los antagonistas opiáceos, principalmente en la hipersensibilidad

tras los tratamientos de deshabituación con naltrexona.

Por último, tras los estudios iniciales en roedores, deben comenzarse con los estudios en primates. Los estudios preliminares indican que el MK-801 produce toxicidad que puede ser grave. Este fármaco, como otros antagonistas NMDA no competitivos, produce reacciones tipo fenciclidina (PCP) en animales como hiperactividad locomotora, caídas, ataxia y catalepsia<sup>101,102</sup>. Otros antagonistas NMDA competitivos sobre el receptor del glutamato no presentan esta toxicidad. El LY-274614, por ejemplo, no produce comportamientos tipo PCP, aunque produce una sedación importante<sup>91</sup>. Estos antagonistas sin toxicidad PCP podrían ser preferibles a otros receptores no competitivos del receptor NMDA, pero la relevancia clínica de este tipo de fármacos debe ser clarificada. En el caso de los inhibidores de la NOS, los efectos en la presión arterial son un importante factor limitante. El NO produce hipotensión a través de la activación de la NOS endotelial y, por tanto, la mayoría de los inhibidores de la NOS inducen hipertensión, con excepción de 7-NI (7-nitroindazol), que inhibe específicamente la NOS neuronal. Los estudios en humanos deben comenzarse con 7-NI u otros inhibidores más selectivos.

## BIBLIOGRAFÍA

- Morgan JI, Curran T. Stimulus-transcription coupling in neurons: role of cellular immediate-early genes. *Trends Neurosci* 1989; 12: 459-62.
- Jaffe JH. Drug addiction and drug abuse. En: Goodman LS, Gilman A, editores. *The pharmacological basis of therapeutics*. Nueva York: McMillan Co., 1970; 276-313.
- Nestler EJ, Breitner-Johnson D. Common biochemical mechanisms underlying opiate and cocaine addiction. *DN&P* 1992; 5: 214-222.
- Koob GF. Neural mechanisms of drug reinforcement. *Ann NY Acad Sci* 1992; 654: 171-191.
- Bhargava HN. Diversity of agents that modify opioid tolerance, physical dependence, abstinence syndrome, and self-administrative behavior. *Pharmacol Rev* 1994; 46: 293-324.
- Emmett-Oglesby MW, Mathis DA, Moon RTY, Lal H. Animal models of drug withdrawal symptoms. *Psychopharmacology* 1990; 101: 292-309.
- Redmond DE, Krystal JH. Multiple mechanisms of withdrawal from opioid drugs. *Ann Rev Neurosci* 1984; 7: 443-478.
- 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.
- Laschka E, Herz A, Bläsing J. Sites of action of morphine involved in the development of physical dependence in rats I. Comparison of precipitated morphine withdrawal after intraperitoneal and intraventricular injection of morphine antagonists. *Psychopharmacologia* 1976; 46: 133-139.
- Bell J, Adler MW. Comparison of peripheral and central administration of naloxone in precipitating abstinence in morphine-dependent rats. *Drug Alch Depend* 1988; 21: 189-194.
- Marshall DC, Buccafusco JJ. Supraspinal and spinal mediation of naloxone-induced morphine withdrawal in rats. *Brain Res* 1985; 329: 131-142.
- Dahlström A, Fuxe K. Evidence for the existence of monoamine-containing neurons in the central nervous system. I. Demonstration of monoamines in the cell bodies of brainstem neurons. *Acta Physiol Scand* 1965; 232 (Supl): 1-55.
- Pert CB, Kuhar MJ, Snyder SH. Autoradiographic localization of the opiate receptor in rat brain. *Life Sci* 1975; 16: 1.849-1.853.
- Loughlin SE, Fallon JH. Locus coeruleus. En: Paxinos G, editor. *The rat nervous system*. Vol 2. North Ryde, Australia: Academic Press, 1985; 79-93.
- Copper JR, Bloom FE, Roth RH. Norepinephrine and epinephrine. En: Copper JR, Bloom FE, Roth RH, editores. *The biochemical basis of neuropharmacology*. Nueva York: Oxford University Press, 1991; 220-284.
- Aghajanian GK. Tolerance of nucleus coeruleus neurons to morphine and expression of withdrawal response by clonidine. *Nature* 1978; 276: 186-188.
- Crawley JN, Lavery R, Roth R. Clonidine reversal of increased norepinephrine metabolite levels during morphine withdrawal. *Eur J Pharmacol* 1979; 57: 247.
- Lavery R, Roth RH. Clonidine reverses the increased norepinephrine turnover during morphine withdrawal in rats. *Brain Res* 1980; 182: 482-485.
- Swan AC, Elsworth JD, Charney DS, Jablons DM, Roth RH, Redmond Jr DE et al. Brain catecholamine metabolites and behavior in morphine withdrawal. *Eur J Pharmacol* 1983; 86: 167-175.
- Distefano PS, Brown OM. Biochemical correlates of morphine withdrawal. I. Characterization in the adrenal medulla and locus coeruleus. *J Pharmacol Exp Ther* 1985; 233: 333-339.
- Buccafusco JJ, Marshall DC, Turner RM. A comparison of the inhibitory effects of clonidine and guanfacine on the behavioral and autonomic components of morphine withdrawal. *Life Sci* 1984; 35: 1.401-1.408.

22. Ennis M, Aston-Jones G. Activation of locus coeruleus from nucleus paragigantocellularis: a new excitatory amino acid pathway in brain. *J Neurosci* 1988; 8: 3.644-3.657.
23. Tung CS, Grenhoff J, Svensson TH. Morphine withdrawal responses of rat locus coeruleus neurons are blocked by an excitatory amino-acid antagonist. *Acta Physiol Scand* 1990; 138: 581-582.
24. Tsuda K, Tsuda S, Nishio I, Masuyama Y, Goldstein M. Glutamatergic regulation of [3H]-noradrenaline release in the medulla oblongata of normotensive and spontaneously hypertensive rats. *J Hypertension* 1994; 12: 517-522.
25. Navarro CE, Cabrera RJ, Donoso AO. Release of 3H-noradrenaline by excitatory amino acids from rat mediobasal hypothalamus and the influence of aging. *Brain Res Bull* 1994; 33: 677-682.
26. Malva JO, Carvalho AP, Carvalho CM. Modulation of dopamine and noradrenaline release and of intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration by presynaptic glutamate receptors in hippocampus. *Br J Pharmacol* 1994; 113: 1.439-1.447.
27. Aghajanian GK, Kogan JH, Moghaddam B. Opiate withdrawal increases glutamate and aspartate efflux in the locus coeruleus: an in vivo microdialysis study. *Brain Res* 1994; 636: 126-130.
28. Akaoka H, Aston-Jones G. Indirect serotonergic agonists attenuate neuronal opiate withdrawal. *Neurosci* 1993; 54: 561-565.
29. Aston-Jones G, Ennis M, Pieribone VA, Nickell WT, Shipley MT. The brain nucleus locus coeruleus: restricted afferent control of a broad afferent network. *Science* 1986; 234: 734-737.
30. Hong M, Milne B, Jhamandas K. Evidence for the involvement of excitatory amino acid pathways in the development of precipitated withdrawal from acute and chronic morphine: an in vivo voltammetric study in the rat locus coeruleus. *Brain Res* 1993; 623: 131-141.
31. McMahon SB, Wall PD. Electrophysiological mapping of brainstem projections of spinal cord lamina I cells in the rat brain. *Brain Res* 1985; 333: 19-26.
32. Fung SJ, Reddy VK, Liu RH, Wang Z, Barnes CD. Existence of glutamate in noradrenergic locus coeruleus neurons of rodents. *Brain Res Bull* 1994; 35: 505-512.
33. Garthwaite J, Charles SL, Chess-Williams R. Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests role as intercellular messenger in the brain. *Nature* 1988; 336: 385-388.
34. Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA. Biosynthesis of nitric oxide from L-arginine. A pathway for the regulation of cell function and communication. *Biochem Pharmacol* 1989; 38: 1.709-1.715.
35. Knowles RG, Palacios M, Palmer RMJ, Moncada S. Formation of nitric oxide from L-arginine in the central nervous system: a transduction mechanism for stimulation of the soluble guanylate cyclase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 5.159-5.162.
36. Bredt DS, Snyder SH. Isolation of nitric oxide synthase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 682-685.
37. Garthwaite J. Glutamate, nitric oxide and cell signalling in the nervous system. *Trends Neurosci* 1991; 14: 60-67.
38. Palmer RMJ, Ferridge AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 1987; 327: 524-526.
39. Palmer RM, Ashton DS, Moncada S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature* 1988; 333: 664-666.
40. Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991; 43: 109-142.
41. Bredt DS, Snyder SH. Nitric oxide mediates glutamate-linked enhancement of cGMP levels in the cerebellum. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 9.030-9.033.
42. Garthwaite J, Garthwaite G, Palmer RMJ, Moncada S. NMDA receptor activation induces nitric oxide synthesis from arginine in the rat brain slices. *Eur J Pharmacol* 1989; 172: 413-416.
43. Bohme GA, Bon C, Stutzmann JM, Doble A, Blanchard JC. Possible involvement of nitric oxide in long-term potentiation. *Eur J Pharmacol* 1991; 199: 379-381.
44. Shibuki K, Okada D. Endogenous nitric oxide release required for long-term synaptic depression in the cerebellum. *Nature* 1991; 349: 326-328.
45. Calzà L, Giardino L, Ceccatelli S. NOS mRNA in the paraventricular nucleus of young and old rats after immobilization stress. *NeuroReport* 1993; 4: 627-630.
46. Bliss TVP, Collingridge GL. A synaptic model of memory: long term potentiation in the hippocampus. *Nature* 1993; 361: 31-39.
47. Leza JC, Salas E, Sawicki G, Russell JC, Radoski MW. The effect of stress on homeostasis in JCR:LA-cp rats: the role of nitric oxide. *J Pharmacol Exp Ther* 1998; 286: 1.397-1.403.
48. Mollace V, Bagegga G, Nistico G. Evidence that L-arginine possesses proconvulsant effects mediated through nitric oxide. *NeuroReport* 1991; 2: 269-272.
49. De Sarro G, Di Paola ED, De Sarro A, Vidal MJ. L-arginine potentiates excitatory amino acid-induced seizures elicited in the deep prepiriform cortex. *Eur J Pharmacol* 1993; 230: 151-158.
50. Sancesario G, Iannone M, Morello M, Nistico G, Bernardi G. Nitric oxide inhibition aggravates ischemic damage of hippocampal but not of NADPH neurons in gerbils. *Stroke* 1994; 25: 436-444.
51. Moro MA, De Alba J, Leza JC, Lorenzo P, Fernández AP, Bentura ML et al. Neuronal expression of inducible nitric oxide synthase after oxygen and glucose deprivation in rat fore-

- brain slices. *Eur J Neurosci* 1998; 10: 445-456.
52. Koh JY, Choi DW. Vulnerability of cultured cortical neurons to damage by excitotoxins: differential susceptibility of neurons containing NADPH-dihydrogenase. *J Neurosci* 1988; 8: 2.153-2.163.
  53. Choi DW. Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. *Neuron* 1988; 1: 623-634.
  54. Meldrum B, Garthwaite J. Excitatory amino acids neurotoxicity and neurodegenerative disease. *Trends Pharmacol Sci* 1990; 11: 379-387.
  55. Olanow CW. A radical hypothesis for neurodegeneration. *Trends Neurosci* 1993; 16: 439-444.
  56. Salter M, Knowles RG, Moncada S. Widespread tissue distribution, species distribution and changes in activity of  $Ca^{2+}$ -dependent and  $Ca^{2+}$ -independent nitric oxide synthases. *FEBS Lett* 1991; 291: 145-149.
  57. Knowles RG, Moncada S. Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem J* 1994; 298: 249-258.
  58. Rodrigo J, Springall DR, Utenthal O, Bentura ML, Abadia-Molina F, Viveros-Moreno V et al. Localization of nitric oxide synthase in the adult rat brain. *Phil Trans R Soc Lond* 1994; 345: 175-221.
  59. Föstermann U, Gorsky LD, Pollock JS, Schmidt HH, Heller M, Murad F. Regional distribution of EDRF/NO-synthesizing enzyme(s) in rat brain. *Biochem Biophys Res Commun* 1990; 168: 727-732.
  60. Bredt DS, Hwang PM, Snyder SH. Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. *Nature* 1990; 347: 768-770.
  61. Leza JC, Lizasoain I, San Martín Clark O, Lorenzo P. Morphine-induced changes on cerebral and cerebellar nitric oxide synthase activity. *Eur J Pharmacol* 1995; 235: 95-98.
  62. Bhargava HN, Cao YJ. Effects of chronic administration of morphine, U-50, 488H and [DPen<sup>2</sup>,DPen<sup>5</sup>]enkephalin on the concentration of cGMP in brain regions and spinal cord of the mouse. *Peptides* 1997; 18: 1.629-1.634.
  63. Volicer L, Puri SK, Choma P. Cyclic GMP and GABA levels in rat striatum and cerebellum during morphine withdrawal: effects of apomorphine. *Neuropharmacology* 1977; 16: 791-794.
  64. Cappendijk SLT, Garrelts IM, Dzoljic MR. Nitric oxide in brain tissue, cerebrospinal fluid and plasma of naive and morphine-abstinent rats [resumen 1.18]. Montreal, Canadá: Nitric oxide in the nervous system. Laurentians Mountains, julio de 1994.
  65. Barjavel MJ, Bhargava HN. Effects of morphine tolerance and abstinence on nitric oxide synthase activity in brain regions and spinal cord of the mouse. *Soc Neurosci Abstr* 1994a; 20: 1.234.
  66. Leza JC, Lizasoain I, Cuéllar B, Moro MA, Lorenzo P. Correlation between brain nitric oxide synthase and opiate withdrawal. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 1996; 353: 349-354.
  67. Weiner CP, Lizasoain I, Baylis SA, Knowles RG, Charles IG, Moncada S. Induction of calcium-dependent nitric oxide synthases by sex hormones. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 5.212-5.216.
  68. Cappendijk SLT, De Vries R, Dzoljic MR. Inhibitory effect of nitric oxide (NO) synthase inhibitors on naloxone-precipitated withdrawal syndrome in morphine-dependent mice. *Neurosci Lett* 1993; 162: 97-100.
  69. Kimes AS, Vaupel DB, London ED. Attenuation of some signs of opioid withdrawal by inhibitors of nitric oxide synthase. *Psychopharmacology* 1993; 112: 521-524.
  70. Dambisya YM, Lee TL. Role of nitric oxide in the induction and expression of morphine tolerance and dependence in mice. *Br J Pharmacol* 1996; 117: 914-918.
  71. Cappendijk SLT, De Vries R, Dzoljic MR. Excitatory amino acid receptor antagonists and naloxone-precipitated withdrawal syndrome in morphine-dependent mice. *Eur J Neuropharmacol* 1993; 3: 111-116.
  72. Thorat SN, Barjavel MJ, Matwyshyn GA, Bhargava HN. Comparative effects of NG-monomethyl-L-arginine and MK-801 on the abstinence syndrome in morphine dependent mice. *Brain Res* 1994; 642: 153-159.
  73. Cappendijk SLT, Duval S, De Vries R, Dzoljic MR. Comparative study of normotensive and hypertensive nitric oxide synthase inhibitors on morphine withdrawal syndrome in rats. *Neurosci Lett* 1995; 163: 67-70.
  74. Hecker M, Mitchell JA, Harris HJ, Katsura M, Thiemermann C, Vane JR. Endothelial cells metabolize NG-monomethyl-L-arginine to L-citrulline and subsequently to L-arginine. *Biochem Biophys Res Commun* 1990; 167: 1.037-1.043.
  75. Kimes AS, Vaupel DB, London ED. Comparison of the attenuation of opioid withdrawal by nitric oxide synthase inhibitors [resumen 5.11]. Montreal, Canadá: Nitric oxide in the nervous system. Laurentians Mountains, julio de 1994.
  76. Adams ML, Kalicki JM, Meyer ER, Cicero TJ. Inhibition of the morphine withdrawal syndrome by a nitric oxide synthase inhibitor, NG-nitro-L-arginine methyl ester. *Life Sci* 1993; 52: 245-149.
  77. Roskoski R, Roskoski LM. Activation of tyrosine hydroxylase in PC12 cells by the cyclic GMP and cyclic AMP second messenger system. *J Neurochem* 1987; 48: 236-242.
  78. O'Sullivan AJ, Burgoyne RD. Cyclic GMP regulates nicotine-induced secretion from cultured bovine adrenal chromaffin cells: effects of 8-bromo-cyclic GMP, atrial natriuretic peptide, and nitroprusside (Nitric oxide). *J Neurochem* 1990; 54: 1.805-1.808.

79. Starr MS, Starr BS. Do NMDA receptor-mediated changes in motor behaviour involve nitric oxide? *Eur J Pharmacol* 1995; 272: 211-217.
80. Hanbauer Y, Wink D, Osawa Y, Edelman GM, Gally JA. Role of nitric oxide in NMDA-evoked release of [3H]-dopamine from striatal slices. *NeuroReport* 1992; 3: 409-413.
81. Bhargava HN, Way EL. Brain acetylcholine and choline following acute and chronic morphine treatment and during withdrawal. *J Pharmacol Exp Ther* 1974; 194: 65-73.
82. Guno Tjon Tien Ril HK, De Vries TJ, Wardeh G, Hogenboom F, Mulder AH, Schoffelmeyer ANM. Long-lasting reciprocal changes in striatal dopamine and acetylcholine release upon morphine withdrawal. *Eur J Pharmacol* 1993; 235: 321-322.
83. Sandberg K, Berry CJ, Eugster E, Rogers TB. A role for cGMP during tetanus toxin blockade of acetylcholine release in the rat pheochromocytoma (PC12) cell line. *J Neurosci* 1989; 9: 3.946-3.954.
84. Tanganelli S, Antonelli T, Morari M, Bianchi C, Beani L. Glutamate antagonists prevent morphine withdrawal in mice and guinea pigs. *Neurosci Lett* 1991; 122: 270-272.
85. Prast H, Philippu A. Nitric oxide releases acetylcholine in the basal forebrain. *Eur J Pharmacol* 1992; 216: 139-140.
86. Dionyssopoulos T, Hope W, Coupar IM. Effect of adenosine analogues on the expression of opioid withdrawal in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 1992; 42: 201-206.
87. Kostic MM, Schrader J. Role of nitric oxide in reactive hyperemia of the guinea pig heart. *Circ Res* 1992; 70: 208-212.
88. Lightman SL, Young WS III. Changes in hypothalamic proenkephalin A mRNA following stress and opiate withdrawal. *Nature* 1987; 328: 643-645.
89. Guimaraes FS, De Aguiar JC, Del Bel EA, Ballejo G. Anxiolytic effect of nitric oxide synthase inhibitors microinjected into the dorsal central grey. *NeuroReport* 1994; 5: 1.929-1.932.
90. Trujillo KA, Akil H. Inhibition of morphine tolerance and dependence by the NMDA receptor antagonist MK-801. *Science* 1991; 251: 85-87.
91. Rasmussen K, Fuller RW, Stockton ME, Perry KW, Swinford RM, Ornstein PL. NMDA receptor antagonists suppress behaviors but not norepinephrine turnover on locus coeruleus unit activity induced by opiate withdrawal. *Eur J Pharmacol* 1991; 197: 9-16.
92. Rasmussen K, Krystal JH, Aghajanian GK. Excitatory amino acids and morphine withdrawal: differential effects of central and peripheral kynurenic acid administration. *Psychopharmacology* 1991; 105: 508-512.
93. Koyuncuoglu H, Dizdar Y, Aricioglu F, Sayin U. Effects of MK-801 on morphine physical dependence: attenuation and intensification. *Pharmacol Biochem Behav* 1992; 43: 487-490.
94. Jones SM, Snell LD, Johnson KM. Phencyclidine selectively inhibits N-methyl-D-aspartate induced hippocampal [3H] norepinephrine release. *J Pharmacol Exp Ther* 1987; 240: 492-497.
95. Burgard EC, Decker G, Sarvey JM. NMDA receptor antagonists block norepinephrine-induced long-lasting potentiation and long-term potentiation in rat dentate gyrus. *Brain Res* 1989; 482: 351-355.
96. Trullas R, Jackson B, Skolnick P. Anxiolytic properties of 1-aminocyclopropane-carboxylic acid, a ligand at strichnine-insensitive glycine receptors. *Pharmacol Biochem Behav* 1989; 34: 313-316.
97. Kehne JH, McCloskey TC, Baron MB, Chi EM, Harrison BL, Whitten JP et al. NMDA receptor complex antagonists have potential anxiolytic effects as measured with separation-induced ultrasonic vocalizations. *Eur J Pharmacol* 1991; 193: 283-292.
98. Lal H, Emmett-Oglesby MW. Behavioural analogues of anxiety, animal models. *Neuropharmacology* 1983; 22: 1.423-1.441.
99. Lizasoain I, Leza JC, Cuéllar B, Moro MA, Lorenzo P. Inhibition of morphine withdrawal by lamotrigine: implication of nitric oxide. *Eur J Pharmacol* 1996; 299: 41-45.
100. Herman BH, Vocci F, Bridge P. The effects of NMDA receptor antagonists and nitric oxide synthase inhibitors on opioid tolerance and withdrawal. Medication development issues for opiate addiction. *Neuropsychopharmacol* 1995; 13: 269-293.
101. Koek W, Woods JH, Winger GD. MK-801, a proposed noncompetitive antagonist of excitatory amino acid neurotransmission, produces phencyclidine-like behavioral effects in pigeons, rats and rhesus monkeys. *J Pharmacol Exp Ther* 1988; 245: 969-974.
102. Willetts J, Balster RL, Leander SD. The behavioral pharmacology of NMDA receptor antagonists. *Trends Pharmacol Sci* 1990; 11: 423-428.
103. Kolesnikov YA, Pick CG, Ciszewska G, Pasternak GW. Blockade of tolerance to morphine but not to k opioids by a nitric oxide synthase inhibitor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 5.162-5.166.
104. London ED, Vaupel DB, Kimes AS. Inhibitors of nitric oxide synthase as potential treatments for opioid withdrawal. *Regulatory Peptides* 1994; 54: 165-166.
105. 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.
106. Bhargava HN. Attenuation of tolerance to, and physical dependence on, morphine in the rat by inhibition of nitric oxide synthase. *Gen Pharmacol* 1995; 26: 1.049-1.053.



## DISCUSIÓN

A. GARCÍA SÁNCHEZ: Entiendo que el glutamato está actuando en el *locus coeruleus*, donde observáis un aumento de expresión que, supongo, es de nNOS. El óxido nítrico podría actuar de diferentes formas, ya sea inhibiendo la liberación de la adrenalina o a través de otros mecanismos. ¿Cómo explicáis que también se observe una inducción de la nNOS en cerebelo y en células de Purkinje, que normalmente no expresan?

J.C. LEZA: Parece que en ratas no se expresa nNOS, pero sí en ratón. Nosotros también nos planteamos la pregunta de por qué se expresaba nNOS en el cerebelo y por qué no en otras áreas. Una posible explicación sería que del *locus coeruleus* parten aferencias al cerebelo al igual que del estriado, otro de los núcleos que está muy implicado en la abstinencia opiácea. Estas conexiones noradrenérgicas que van al cerebelo están reguladas por interneuronas glutamatérgicas, lo que podría explicar la presencia de inducción de la nNOS. Realmente, a través de estudios de inmunohistoquímica se puede ver que esto ocurre también en otras áreas como en *locus coeruleus* o en el núcleo paragigantocelular.

A. GARCÍA SÁNCHEZ: Por otro lado, el glutamato estimula puntualmente la NOS, porque aumenta la concentración de calcio. Pero, que yo sepa, no hay datos de inducción y vosotros estáis hablando de una inducción, por tanto de un aumento de la cantidad de proteína que detectáis por inmunocitoquímica. Me resulta difícil entender todo este proceso, desde el glutamato en el *locus coeruleus* afectando la liberación de noradrenalina y el efecto de esas vías noradrenérgicas sobre el cerebelo. ¿Cómo se explica que esta disminución en la liberación de noradrenalina vaya a afectar a las concentraciones de proteína enzimática?

J.C. LEZA: No tengo suficientes elementos de juicio como para interpretar estos datos desde la óptica de la biología molecular, pero puedo añadir que en el ensayo de citrulina trabajamos con tubos control, unos que tienen un quelante de calcio y otros tubos que no tienen ese quelante de calcio y que contienen un inhibidor de la NOS. Restando la actividad de los terceros de la de los segundos, deducimos si la inducción es dependiente o independiente del calcio. La actividad que hemos presentado anteriormente es dependiente del calcio. Sobre la posibilidad de que el glutamato induzca la expresión de la NOS,

sea constitutiva o inducible, puedo añadir que por datos de nuestro grupo, todavía no publicados, parece ser que sí. Esto lo hemos demostrado en el modelo de isquemia-reperusión donde el glutamato es aplicado en el líquido de perfusión que baña la rebanada de tejido y donde se ha visto que por sí mismo es capaz de inducir la NOS.

A. GARCÍA SÁNCHEZ: Me parece interesante el dato, pero no queda claro, puesto que un trabajo realizado con anticuerpos frente a la NO neuronal reflejó aumentos de expresión en el cerebelo. Si esto se produce a los 5 o 7 días quiere decir que es relativamente rápido, teniendo en cuenta que debe ser un efecto bastante indirecto. ¿Existen datos acerca de si existe algún tipo de inducción en los factores de crecimiento, en citocinas o en otras sustancias en estos modelos?

J.C. LEZA: No que yo conozca.

R. MALDONADO: Comentas el tema de la importancia de la tormenta noradrenérgica en la expresión de la abstinencia. Los últimos resultados al respecto, basados en inducir con 6-OH-dopamina una lesión de todas las proyecciones del *locus coeruleus* con la consiguiente depleción de noradrenalina en todo el cerebro, refieren que en estos animales no existe ninguna modificación en la expresión comportamental de la abstinencia y que tampoco existe ninguna modificación en los efectos inducidos por la clonidina sobre la abstinencia. ¿Cuál es tu opinión sobre estos hallazgos?

J.C. LEZA: Una posible explicación es que se produjeran otros fenómenos como, por ejemplo, una sobreactivación durante el período de tolerancia del propio NO. Éste podría estar estimulando la liberación de otros neurotransmisores, que serían los responsables del efecto observado sin la participación de las catecolaminas. Quizás hemos focalizado las cosas demasiado en el *locus coeruleus* y, a pesar de tratarse de un centro muy importante, evidentemente no es el único. De hecho, también se observó que la clonidina no abolía absolutamente el síndrome de abstinencia, lo que permite sugerir la posible participación de otros neurotransmisores como los aminoácidos excitadores.

R. MALDONADO: Está demostrado que los cambios en el NO se producen sobre todo en el cerebelo. Nosotros hemos obtenido resultados similares para el caso de la abstinencia



por cannabinoides, donde las modificaciones se localizaron específicamente en el cerebelo y no en otras estructuras. ¿Habéis realizado experimentos de administración directa en el cerebelo para intentar modificar la expresión de la abstinencia?

J.C. LEZA: No hemos realizado este tipo de estudios, pero creo que, efectivamente, en el cerebelo se observan cambios que proceden de otras estructuras como el estriado, *locus coeruleus* o el núcleo paragigantocelular.

O. BULBENA: No conozco tanto la nNOS como la iNOS y cuando has mencionado que la actividad era dependiente del calcio he pensado en la iNOS. ¿Se dispone de estudios sobre si esta actividad iNOS viene precedida de la expresión del NF- $\kappa$ B? Sobre todo en dos sentidos: en un sentido cinético de saber en qué momento se expresa el NF- $\kappa$ B para inducir este aumento, y posteriormente, si cabe pensar que el tratamiento con inhibidores del NF- $\kappa$ B también pudiera revertir la sintomatología que ha producido el L-NAME.

J.C. LEZA: Efectivamente, el NF- $\kappa$ B parece ser un factor esencial en la expresión de la iNOS. En nuestro modelo de isquemia y reperfusión cerebral in vitro, en rebanadas de cerebro anterior, hemos observado que la activación del NF- $\kappa$ B precede al aumento que nosotros vemos en la actividad de la iNOS. Con PDTC, por ejemplo, se puede evitar la actividad de la iNOS, que es dependiente del calcio, pero que también depende de NF $\kappa$ -B.

V. FELIPO: Parece que cuando se disminuyen los valores de NO descienden los síntomas de la abstinencia. ¿Cuál sería el mecanismo molecular que conectaría el NO con los síntomas y que se integraría de algún modo en el mecanismo que ha presentado anteriormente Maldonado?

J.C. LEZA: No sabría responder cómo se podrían interrelacionar, pero la fosforilación de proteínas que ocurre en el momento de la to-

lerancia también podría producirse con algunas de las NOS.

A.M. PLANAS: Me gustaría hacer un comentario que creo habría que tener en cuenta respecto a que según en qué células se puede constatar o no la presencia de NOS neuronal. Nosotros hemos trabajado con anticuerpos y nos encontramos que, en función de la fijación que se hace del tejido, puede verse o no verse la presencia de NOS. Por tanto, siempre se debe tener en cuenta en qué condiciones se ha trabajado y que también dependerá de los valores de NOS que hubiera. Quisiera, así mismo, hacer una reflexión acerca de estos cambios que observáis en las células de Purkinje. Se trata de células inhibitoras y cuando están muy activadas pueden producir ataxia en el animal. ¿Qué relación podría tener una activación de NOS con un impedimento físico como, por ejemplo, la limitación a que el animal salte? Quiero decir, que estamos centrando la atención en unos cambios motores dentro de un amplio conjunto de síntomas de la abstinencia que, tal vez y hasta cierto punto, podrían ser completamente secundarios.

J.C. LEZA: Es realmente complicado interpretar cuándo nos encontramos con neuronas que pueden ser inhibitoras y que están aparentemente sobreestimuladas en un cuadro que es fundamentalmente excitador. Pero, realmente no sabría responder específicamente a tu pregunta.

R. MALDONADO: Nosotros hemos realizado un estudio similar sobre la dependencia a cannabinoides y encontramos unas modificaciones muy importantes y selectivas de la ciclasa en el cerebelo, que no observamos, al menos con tanta intensidad, en el caso de la dependencia opiácea. Sobre la expresión comportamental de estas dos formas de abstinencia, en la abstinencia a cannabinoides el principal signo que observamos fue precisamente una ataxia y, sin embargo, en la abstinencia a opioides no apareció esta ataxia.