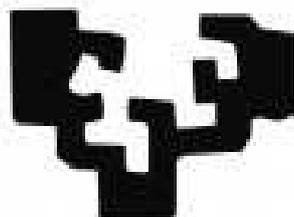


eman ta zabal zazu



Universidad
del País Vasco

Euskal Herriko
Unibertsitatea

Regulación del síndrome de abstinencia a opiáceos por los sistemas de recaptación de glutamato

Máster de Farmacología. “Desarrollo,
Evaluación y Uso Racional de
Medicamentos”

**Proyecto fin de máster de Amets Jauregi Aurrekoetxea
Director: Joseba Gotzon Pineda Ortiz**

Leioa, septiembre de 2011



REGULACIÓN DEL SÍNDROME DE ABSTINENCIA A OPIÁCEOS POR LOS SISTEMAS DE RECAPTACIÓN DE GLUTAMATO

<u>1.- INTRODUCCIÓN</u>	pág. 5
1.1.- GLUTAMATO	pág. 5
1.1.1.- Receptores ionotrópicos del glutamato.....	pág. 5
1.1.2.- Receptores metabotrópicos (mGLUR).....	pág. 6
1.2.- ADICCIÓN A OPIACEOS	pág. 7
1.2.1.- Sistema opioide.....	pág. 7
1.2.2.- Receptores opioides.....	pág. 7
1.2.3.- Síndrome de abstinencia y dependencia.....	pág. 8
1.3.- EL LOCUS COERULEUS (LC)	pág. 11
1.3.1.- Generalidades: anatomía y fisiología.....	pág. 11
1.3.2.- Opiáceos y abstinencia.....	pág. 11
<u>2.- HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</u>	pág. 12
<u>3.- MATERIAL Y MÉTODOS</u>	pág. 14
3.1.- MATERIALES	pág. 14
3.1.1.- Animales.....	pág. 14
3.1.2.- Fármacos.....	pág. 14
3.1.3.- Tratamientos.....	pág. 15
3.2.- MÉTODOS	pág. 16

3.2.1.- Evaluación del síndrome de abstinencia de la morfina.....	pág. 16
3.2.2. Análisis de datos.....	pág. 17
<u>4.- RESULTADOS</u>	pág. 18
4.1.- SÍNDROME DE ABSTINENCIA.....	pág. 18
4.2.- EFECTO DEL TRATAMIENTO CRÓNICO CON CEFTRIAXONA EN EL SÍNDROME DE ABSTINENCIA A OPIÁCEOS.....	pág. 21
4.3.- MODULACIÓN DEL EFECTO DE LA CEFTRIAXONA EN EL SÍNDROME DE ABSTINENCIA A LA MORFINA POR UN INHIBIDOR DE LA RECAPTACIÓN DEL GLUTAMATO (DHK).....	pág. 29
<u>5.- DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES</u>	pág. 34
<u>6.- BIBLIOGRAFÍA</u>	pág. 36

REGULACIÓN DEL SÍNDROME DE ABSTINENCIA A OPIÁCEOS POR LOS SISTEMAS DE RECAPTACIÓN DE GLUTAMATO

1.- INTRODUCCIÓN

1.1.- GLUTAMATO.

Los aminoácidos excitatorios (EAA) y en particular el glutamato son generalmente aceptados como los principales neurotransmisores que median la excitación sináptica del sistema nervioso central (SNC) de los mamíferos (Watkins et al., 1990; Nakanishi, 1992; Nicholls, 1993). La activación y modulación de los receptores glutamatérgicos está muy relacionado con el aprendizaje y la memoria (Artola and Singer, 1993; Sapoznik et al., 2006) y las fases tempranas del desarrollo neuronal (Constantine-Paton et al., 1990; McDonald and Johnston, 1990). Es bien conocido, también, que el glutamato puede ser neurotóxico, especialmente cuando las reservas de energía se ven comprometidas. Esta afirmación ha dado pie a la propuesta de que la neurodegeneración esta relacionada con algunos desórdenes tanto agudos como crónicos del sistema glutamatérgico (derrame cerebral isquémico, epilepsia, enfermedad de Parkinson, VIH, demencia y síndrome de abstinencia de opiáceos).

Los efectos del glutamato están mediados por receptores ionotrópicos (NMDA, AMPA y kainato), los cuales se encuentran integrados por canales iónicos, y por receptores metabotrópicos acoplados a la proteína G (grupos I, II y III) (Danbolt, 2000; Matsui and Williams, 2010; Rasmussen, 2010)

1.1.1.- Receptores ionotrópicos del glutamato.

Los receptores ionotrópicos están constituidos por canales catiónicos y se clasifican según la función de su ligando específico en receptores sensibles a N-metil-D-aspartato (receptores NMDA), receptores sensibles al ácido- α -amino-3-hidroxi-5-

metil-4-isoxazolil-propiónico (receptores AMPA) y receptores sensibles a kainato (receptores de kainato).

a) Receptores NMDA: Los receptores NMDA son molecularmente distintos a los receptores AMPA y kainato, pero también unidos a los canales iónicos. Estos receptores están activados por el glutamato y el NMDA pero no responden a los AMPA, kainato o a los agonistas mGluRs (metabotrópicos). La corteza cerebral es el lugar donde mayor cantidad de receptores NMDA se ha localizado. Los receptores NMDA son permeables tanto a Na^+ y K^+ como a Ca^{2+} , y están asociados con los procesos de aprendizaje/memoria, desarrollo neuronal y regulación del dolor.

b) Receptores AMPA: Los receptores AMPA son llamados así por su relativa alta afinidad por el AMPA (y quisqualato) frente a kainato. Estos receptores tienen baja afinidad con el NMDA. Han sido identificados cuatro subtipos: GluR1-GluR4. Los receptores AMPA están implicados entre otros procesos, en el síndrome de abstinencia a opiáceos.

c) Receptores kainato: Estos receptores tienen muy baja afinidad por AMPA y NMDA. Su papel no está todavía bien identificado, pero se sospecha que podrían estar implicados a nivel presináptico en la modulación de la transmisión GABAérgica y en la regulación de la liberación del glutamato.

1.1.2.- Receptores metabotrópicos (mGLUR).

Estos receptores, son receptores acoplados a proteínas Gi/o. Los mGLURs están clasificados según su estructura o función en tres grupos llamados I, II y III. Los receptores del grupo I se acoplan principalmente a la proteína Gq, mientras que los del grupo II y III se acoplan a Gi/Go.

1.2.- ADICCIÓN A OPIACEOS.

1.2.1.- Sistema opioide.

Un opioide es un agente químico que remeda la acción de la morfina y se une a receptores opioides en el sistema nervioso central (SCN), tracto gastrointestinal y otros órganos. Hay cuatro grandes clases de sustancias opioides: los péptidos opioides endógenos (endorfinas, encefalinas o dinorfinas), los alcaloides derivados del opio (como la morfina, codeína...), los opiáceos semi-sintéticos (como la heroína y la oxicodona) y los opiáceos completamente sintéticos (meperidina y metadona), que tienen una estructura no relacionada con los alcaloides del opio.

1.2.2.- Receptores opioides.

Los receptores opioides, son receptores acoplados a proteínas G que se activan mediante péptidos opioides producidos endógenamente o mediante la administración exógena de drogas opioides u opiáceos. Principalmente se encuentran en el sistema nervioso central (SNC), aunque también han sido identificados en el sistema nervioso periférico (SNP). Están compuestos por una cadena polipeptídica simple con siete segmentos α -hélice transmembranales, quedando el terminal amino (NH_2) en el exterior de la célula y la terminal carboxi (COOH) en el interior. Los dominios están unidos entre sí por asas polipeptídicas (tres intracelulares y tres extracelulares)

Existen al tres subtipos de receptores opioides (Pasternak, 2004; Zamalloa, 2007):

a) Receptores μ (“mu”): Están relacionados con la morfina, la cual induce la analgesia, bradicardia, hipotermia y miosis.

b) Receptores κ (“kappa”): Están relacionados al quetocyclazocin, el cual induce la disminución del reflejo flexor y la sedación.

c) Receptores δ (“delta”): En 1977, Lord et al. identificaron en ratones un diferente cuarto tipo de receptor opioide, que tenía una alta afinidad con las encefalinas, al que llamaron “delta”.

La nomenclatura de los receptores opioides ha sido un gran tema de debate. En biología molecular, por ejemplo, los receptores δ , κ y μ son DOR, KOR y MOR respectivamente. El Comité Internacional de Unión Farmacológica de Nomenclaturas de Receptores y Clasificación de Medicamentos (NC-IUPHAR) sugirió otra nomenclatura para definir los ya nombrados receptores δ , κ y μ : DOP, KOP y MOP.

Si nos centramos en los receptores μ , podemos ver cómo en los últimos años, y bajo mucha controversia, se ha sugerido la existencia de algunos subtipos de los receptores MOR: MOR₁, MOR₂ and MOR₃. Todos estos subtipos de receptores han sido confirmados con técnicas moleculares. Pasternak (2004) sugirió que MOR₁ es el responsable de la analgesia supraespinal y periférica, la euforia y la miosis, MOR₂ se encarga de la analgesia espinal y de los efectos gastrointestinales y respiratorios y ha sido identificado como receptor directamente acoplado a la enzima óxido nítrico sintasa constitutiva.

Una gran cantidad de receptores μ han sido identificados en el SNC. El RNAm de estos receptores ha sido encontrado en distintas zonas del cerebro como el prosencéfalo (bulbos olfatorios, estriado, núcleo accumbens, hipocampo, núcleos de la amígdala, giro dentado, etc.), diencefalo (núcleos talámicos, núcleos preópticos mediales del hipotálamo, etc.), mesencefalo (sustancia gris periacueductal, etc.) y en la protuberancia (núcleos del rafe, locus coeruleus (LC), núcleos prabraquiales, etc.).

1.2.3.- Síndrome de abstinencia y dependencia.

La continua administración de algunos fármacos de naturaleza opioide, como los opiáceos, produce fenómenos de dependencia tanto física (tolerancia y abstinencia) como psíquica.

La tolerancia es la reducción de la respuesta del organismo a una concentración/dosis de una determinada sustancia, lo que conduce al aumento de la

dosis o al acortamiento entre los intervalos de administración de la sustancia para producir el mismo efecto del agonista opiode.

Para hacer un diagnóstico de dependencia en la clínica humana, el DSM-IV-TR (2002) (Manual Diagnóstico y Estadístico de los Trastornos Mentales) establece que debe haber un patrón desadaptivo de consumo que conlleve malestar o deterioro (físico, psicológico o social) y, al menos, tres de los siguientes criterios en algún momento de un período continuado de 12 meses:

- Tolerancia.
- Abstinencia.
- La sustancia es consumida en cantidades mayores o durante más tiempo de lo que se pretendía en un principio.
- Existe un deseo persistente o esfuerzos infructuosos de interrumpir el consumo de controlarlo.
- Se emplea mucho tiempo en actividades relacionadas con la obtención de la sustancia, consumo o recuperación de sus efectos.
- Se da una importante reducción de las actividades cotidianas del sujeto debido a la ingesta de la sustancia.
- Se continúa consumiendo la sustancia a pesar de tener conciencia de sus potenciales riesgos.

El CIE-10 (Organización Mundial de la Salud, 2005) refiere que para poder hablar de dependencia han de presentarse tres o más de los siguientes criterios en un periodo de 12 meses:

- Fuerte deseo de consumir la sustancia (*craving*).
- Dificultades para controlar dicho consumo.
- Síndrome de abstinencia al interrumpir o reducir el consumo.
- Tolerancia.
- Abandono progresivo de intereses ajenos al consumo de la sustancia. Inversión cada vez mayor de tiempo en actividades relacionadas con la obtención de la sustancia o con la recuperación de sus efectos.
- Persistencia en el uso de la sustancia a pesar de percibir de forma clara sus efectos perjudiciales.

Debemos tener en cuenta, que el uso de opiáceos está muy extendido en la práctica clínica de tratamientos crónicos del dolor. Por tanto, una herramienta muy valiosa utilizada para estudiar estos fenómenos ha sido la experimentación con animales.

Los signos de comportamiento más característicos en animales (roedores) con síndrome de abstinencia a opiáceos son los siguientes:

- Aumento de la frecuencia de aparición de los siguientes signos:
 - Conducta exploratoria del entorno.
 - Saltos.
 - Castaño de los dientes.
 - Masticaciones.
 - Sacudidas en forma de perro mojado.

- Aparición *de novo* de los siguientes signos:
 - Diarrea
 - Palidez de las orejas
 - Piloerección
 - Ptosis
 - Pestaño
 - Rinorrea
 - Chillidos al tocar
 - Lagrimeo
 - Postura anormal
 - Erección de pene
 - Hostilidad al ser cogidos
 - Eyaculación

1.3.- EL LOCUS COERULEUS (LC).

1.3.1- Generalidades: anatomía y fisiología.

El locus coeruleus es el mayor grupo de neuronas noradrenérgicas (NA) en el cerebro de los mamíferos y está localizado bilateralmente en el tronco del encéfalo, ventrolateral al cuarto ventrículo. En las ratas, el LC está compuesto por 1500 neuronas por núcleo aproximadamente.

Las eferencias del LC conforman las proyecciones noradrenérgicas más amplias del SNC. Las neuronas del LC se proyectan a la mayoría de las áreas del cerebro. Estas eferencias incluyen el cerebelo, el tálamo y el hipotálamo, cortex cerebral, hipocampo, tronco del encéfalo y astas dorsales y ventrales de la médula espinal.

Las neuronas del LC están implicadas en una gran variedad de funciones. Entre ellas, podemos destacar de interés para nuestro proyecto el síndrome de abstinencia a opiáceos. Además, las propiedades electrofisiológicas de las neuronas del LC son muy homogéneas, lo que hace que sean ideales para el estudio de sistemas noradrenérgicos.

1.3.2.- Abstinencia a opiáceos y LC.

Cuando los opiáceos son administrados crónicamente, se desarrolla una tolerancia a sus efectos (Nestler, 2004). La utilización crónica también genera dependencia hacia los opiáceos, indicado con un síndrome de abstinencia cuando dejan de ser administrados o se administra un antagonista opioide. La dependencia a opioides es evidente en la respuesta fisiológica de las neuronas del LC; se da una liberación masiva de glutamato. Si esta hiperactividad glutamatérgica no es frenada, con la utilización de antagonistas de glutamato por ejemplo, se desarrolla el síndrome de abstinencia a opioides.

2.- HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Las neuronas del LC responden directamente a los agonistas que activan toda clase de receptores glutamatérgicos, y esto puede ocurrir como respuesta al glutamato, NMDA, AMPA, kainato, quisqualato y agonistas mGluR. En el síndrome de abstinencia a opiáceos hay una hiperactividad de glutamato en el LC, producido por mecanismos extrínsecos e intrínsecos (Nestler, 2004). Los mecanismos extrínsecos implican la activación de las neuronas del LC 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 LC y una desensibilización de la respuesta postsináptica al glutamato durante la abstinencia a opiáceos (Kogan, 1994). En consonancia con estos hallazgos, las lesiones del núcleo paragigantocelular lateral o la administración de antagonistas inespecíficos del receptor de glutamato atenúan la hiperactividad inducida por la abstinencia a opiáceos y el síndrome conductual (Rasmussen, 1995).

Por otra parte, en el SNC se han descrito distintos tipos de proteínas recaptadoras de glutamato que se encargan a varios niveles de terminar la acción de este neurotransmisor (EAAT). Estudios de nuestro laboratorio (manuscrito en fase de preparación) han demostrado la presencia de al menos dos tipos de transportadores, el EAAT2 y el EAAT3, en el LC de ratas. Los EAAT3 estarían localizados en membranas neuronales y serían responsables de la terminación de la acción sináptica del glutamato, mientras que los EAAT2 estarían en células gliales, entre otros lugares, y jugarían un papel fundamental en el mantenimiento de concentraciones tónicas de glutamato.

Ha sido demostrado recientemente que se puede incrementar la expresión de recaptadores de tipo EAAT2 tras el tratamiento crónico con ceftriaxona (Rothstein et al., 2005). Por tanto, podemos plantear como hipótesis que el tratamiento crónico con ceftriaxona reduce la cantidad de glutamato endógeno en la hendidura sináptica del LC y como consecuencia, reduce los efectos provocados por la sobre-activación del sistema glutamatérgico en el LC y, en concreto, la aparición de un síndrome de abstinencia a opiáceos.

Esta hipótesis no es nueva porque ya se ha sido publicado previamente que los β -láctamicos son capaces de reducir el síndrome de abstinencia de opiáceos y bloquear

el desarrollo de la tolerancia en animales (Rawls et al., 2001a; 2010b). En nuestro laboratorio nos hemos interesado en profundizar en esta hipótesis valorando los mecanismos neuroquímicos y anatómicos concretos que se desarrollan. Nos ha interesado comprobar si el efecto de la ceftriaxona se produce por efecto en los recaptadores EAAT2 en el LC.

El trabajo presentado en esta memoria es sólo una parte del un proyecto más amplio que se está llevando a cabo en el laboratorio enfocado al estudio electrofisiológico del LC. Hemos valorado la parte conductual del síndrome de abstinencia para confirmar si el protocolo de morfina y ceftriaxona era válido en nuestras condiciones experimentales para reducir el síndrome de abstinencia a opiáceos. Además, hemos explorado los mecanismos de esta acción evaluando si se produce una interacción en el EAAT2 en el síndrome de abstinencia.

En resumen, la **hipótesis** planteada para hacer este estudio fue ver como interactúan la ceftriaxona (potenciador específico de la transcripción de los EAAT2) y el DHK (inhibidor específico de los EAAT2) en el síndrome de abstinencia a la morfina, cuando se da una liberación masiva de glutamato en el locus coeruleus. Como ya se ha demostrado en la literatura, los β -láctamicos reducen el síndrome de abstinencia de opiáceos. Nosotros hemos querido comprobar cómo esta reducción es cuantificable en los signos propios del síndrome de abstinencia, que es dosis dependiente y además que el efecto puede ser revertido por fármacos inhibidores de la recaptación del glutamato, como lo es el DHK.

Los objetivos principales del estudio fueron los siguientes:

- Estudiar el efecto y dosis-dependencia del tratamiento crónico con ceftriaxona, un fármaco potenciador de la expresión de EAAT2 (recaptador de glutamato), sobre el síndrome de abstinencia conductual precipitado por naloxona en ratas tratadas con morfina.
- Estudiar la modulación del efecto de la ceftriaxona en el síndrome de abstinencia a la morfina por un inhibidor de la recaptación del glutamato que actúa en el EAAT2 (DHK).

3.- MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. MATERIALES.

3.1.1.- Animales.

Para llevar a cabo este experimento, se utilizaron 57 ratas albino macho de la cepa Sprague-Dawley, cuyo peso oscilaba alrededor de los 300 g. Estos animales fueron criados en el estabulario de la Universidad del País Vasco (UPV-EHU), bajo las condiciones estándares de laboratorio (temperatura constante de 20°C, humedad relativa del 65-70% y un ciclo de luz-oscuridad de 12h, siendo la fase lumínica de 08:00h a 20:00h). Desde el inicio del experimento hasta la realización del estudio, todas las ratas se mantuvieron en jaulas de plástico, y tuvieron libre acceso a agua y a una dieta estándar compuesta por proteínas (15,4%), lípidos (2,9%), glúcidos (60,5%), fibra (3,9%), humedad (12%), minerales (5,3%) y con un aporte calórico teórico de 3000 cal/kg.

Se realizó el máximo esfuerzo posible para disminuir el sufrimiento y el número de animales utilizados en el estudio. Todos los procedimientos experimentales se realizaron de acuerdo con la Directiva 86/609/CE del 24 de noviembre de 1986 establecida por la Comunidad Europea sobre la protección de animales utilizados para experimentación. El protocolo experimental utilizado para el estudio fue aprobado por el Comité de Ética de Bienestar Animal de la Universidad del País Vasco (CEBA 76/2010/PINEDA ORTIZ y CEBA/77/2010/PINEDA ORTIZ).

3.1.2.- Fármacos.

Los fármacos utilizados durante este experimento fueron cuatro: morfina, naltrexona, ceftriaxona y DHK (ácido dihidrokaínico). En la siguiente tabla se especifica cual es el perfil farmacológico de cada uno de ellos y dónde fueron adquiridos.

FÁRMACO	PERFIL FARMACOLÓGICO	ADQUISICIÓN
<u>MORFINA</u>	Agonista opioide μ	Alcaliber, S.A.
<u>NALTREXONA</u>	Antagonista opioide	Sigma
<u>CEFTRIAXONA</u>	Potenciador de la transcripción de los transportadores de Glu EAAT2	Laboratorios Sala
<u>DHK</u> (ácido dihidrokaínico)	Inhibidor específico de los EAAT2	Tocris

Estos fármacos tuvieron que ser disueltos antes de su administración. La morfina fue disuelta en 42,5% de parafina líquida estéril, 7,5% de Arlacel y 50% de suero (NaCl 0,9%). El resto de los fármacos se disolvió en suero salino (NaCl 0,9%).

3.1.3.- Tratamiento.

En este estudio, el tratamiento de los animales fue de 7 días completos. Se dividieron las 57 ratas en tres grupos: el grupo de ceftriaxona 200 mg/kg (n=21), el grupo de ceftriaxona 100 mg/kg (n=16) y el grupo de ceftriaxona 200 mg/kg+DHK (n=20). En cada uno de los tratamientos se hicieron grupos paralelos control, tratados con una solución salina, con el mismo número de ratas que las tratadas (menos en el grupo de CFT 200 mg/kg, ya que se añadió una rata más al grupo de salino).

El tratamiento comenzó con la administración de la ceftriaxona (200 mg/kg o 100 mg/kg, i.p.) al grupo de ratas tratadas, mientras que al grupo control se le

administraba NaCl 0,9% (i.p.). Al quinto día de tratamiento, se procedía a colocar a todas las ratas una implantación subcutánea de morfina (pellet), que se liberaba lentamente durante las siguientes 72 horas (inducíamos así un tratamiento subcrónico con opiáceos). Esta implantación se colocaba en el cuello de la rata por vía subcutánea, bajo sedación con hidrato de clorato (400 mg/kg i.p.), y seguidamente se les dejaba recuperarse. Tras el periodo de 72 horas (el 8 días tras el comienzo con la ceftriaxona) se les inyectaba la naltrexona (10 mg/kg, i.p.) para evaluar su comportamiento con el síndrome de abstinencia que se producía.

Se siguió el mismo protocolo en el grupo de ratas tratadas con DHK, pero 30 minutos antes de la inyección de naltrexona se les administraba el DHK (10 mg/kg s.c.) tanto a las ratas control como a las tratadas con CFT (200 mg/kg).

3.2. MÉTODOS.

3.2.1.- Evaluación del síndrome de abstinencia de la morfina.

La evaluación del síndrome de abstinencia de la morfina se realizó siete días completos pasados después de haber comenzado el tratamiento con ceftriaxona (es decir, el 8º día) y 3 días completos pasados después de haber insertado el pellet (es decir, el cuarto día tras la implantación). El día de la evaluación se inyectó la naltrexona (10 mg/kg, i.p.) y se llevó a cabo una observación de los signos de abstinencia que se reflejan en el comportamiento de las ratas.

La observación de los signos cuantificables (exploración, saltos, sacudidas de perro mojado, castaño de dientes y masticación) se realizó durante el periodo de 15 minutos inmediatamente posterior a la administración de la naltrexona, en una sala acondicionada para ello. Estos signos son cuantificados por su frecuencia, es decir, se cuantifica el número de episodios que se da en cada uno de los animales.

A los 60 minutos de haber inyectado la naltrexona, se realizó la comprobación de la existencia o no en cada animal de los siguientes signos (“presentes”): chillidos al tocar, hostilidad al coger en mano, ptosis, pestañeo, rinorrea, lagrimación, diarrea, erección del pene, postura anormal, orejas blanquecinas, eyaculación y piloerección. En

este caso no se cuantifica la frecuencia, sino que se anota su presencia o ausencia y se valora la incidencia en los animales estudiados (Pineda et al., 1998; Rasmussen et al., 1990).

3.2.2. Análisis de datos.

La puntuación total del síndrome de abstinencia fue calculado teniendo en cuenta los signos “cuantificables” en los primeros 15 minutos desde la administración de la naltrexona y los signos positivos (“presentes”) observados tras los 60 minutos desde su administración en cada rata (Ulibarri et al., 1987). La frecuencia de aparición de los signos “cuantificables” se han mostrado como medias \pm error estándar de la media (E.E.M.). la incidencia de los signos “presentes” se ha mostrado como número de animales positivos (signos presentes) / animales totales evaluados.

Todos los datos recogidos durante los experimentos comportamentales fueron anotados en tablas, en hojas de cálculo de Excel. Una vez terminada la experimentación, estos datos se introdujeron en el programa GraphPad Prism 5, en el que se llevo a cabo tanto el análisis estadístico como las figuras.

Se hicieron comparaciones por parejas de la siguiente manera:

- Efecto de ceftriaxona: morfina + naltrexona + salino VS morfina + naltrexona + ceftriaxona;
- Modulación por DHK sobre el efecto de la ceftriaxona: morfina + naltrexona + salino + DHK VS morfina + naltrexona + ceftriaxona + DHK.

La comparativa entre grupos para el número de episodios (frecuencia) de cada signo “cuantificable” (exploración, saltos, sacudidas de perro mojado, castaño de dientes y masticación) medido durante los 15 primeros minutos desde la administración de la naltrexona se analizó estadísticamente mediante el test no paramétrico U de Mann Whitney para dos colas. La incidencia mayor o menor en los distintos grupos de los signos “presentes” (chillidos al tocar, hostilidad al coger en mano, ptosis, pestaño, rinorrea, lagrimación, diarrea, erección del pene, postura anormal, orejas blanquecinas, eyaculación y piloerección), se analizó estadísticamente con el test Exacto de Fisher. Se consideraron estadísticamente significativos todos los valores de probabilidad menores a 0,05, siendo divididos en dos subgrupos de probabilidades: $P < 0,05$ (*) y $P < 0,01$ (**).

4.- RESULTADOS

4.1.- SÍNDROME DE ABSTINENCIA.

Para poder cuantificar el síndrome de abstinencia, hemos verificado que la implantación subcutánea de una emulsión oleosa de morfina (200 mg/kg), la cual se va re-absorbiendo durante las siguientes 72 horas, seguida de la administración de naltrexona (10 mg/kg por vía intraperitoneal) al cuarto día, produce buenos niveles de dependencia física hacia los opiáceos en las ratas tratadas.

Prácticamente todas las ratas tratadas con morfina mostraron los siguientes signos característicos de abstinencia: chillidos al tocar, hostilidad al coger en mano, ptosis, pestañeo, rinorrea, lagrimación, diarrea, erección del pene, postura anormal, orejas blanquecina, eyaculación y piloerección (Tabla 1).

Después de la implantación del pellet, y tras la inyección de naltrexona, también observamos una mayor frecuencia de aparición de los siguientes signos, que suelen ser característicos de la dependencia a los opioides: la exploración, los saltos, las sacudidas de perro mojado, el castaño de dientes y la masticación. (Fig. 1).

Estos resultados muestran como la administración del pellet de morfina produce una dependencia física con el consiguiente síndrome de abstinencia al administrar la inyección de su antagonista, la naltrexona.

Tabla 1. En esta tabla se muestran los signos positivos indicativos del síndrome de abstinencia inducido por la administración de naltrexona en ratas tratadas con morfina.

	<i>RATAS positivas/ total</i>
CHILLIDOS AL TOCAR	28/ 29
HOSTILIDAD AL COGER EN MANO	28/ 29
PTOSIS	29/ 29
PESTAÑEO	28/ 29
RINORREA	26/ 29
LAGRIMACIÓN	27/ 29
DIARREA	21/ 29
ERECCIÓN DEL PENE	28/ 29
POSTURA ANORMAL	29/ 29
OREJAS BLANQUECINAS	29/ 29
EYACULACIÓN	27/ 29
PILOERECCIÓN	29/ 29

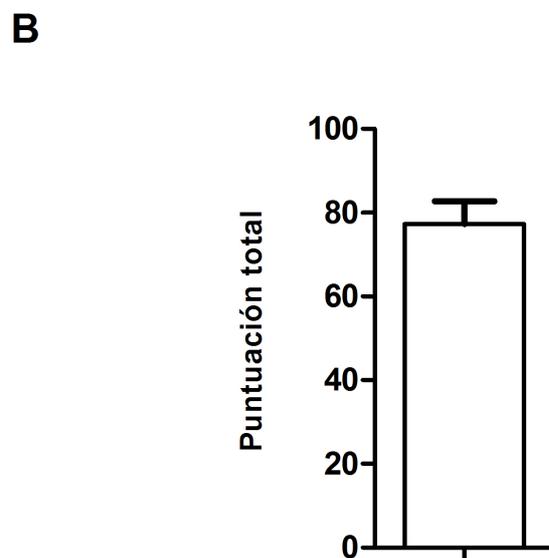
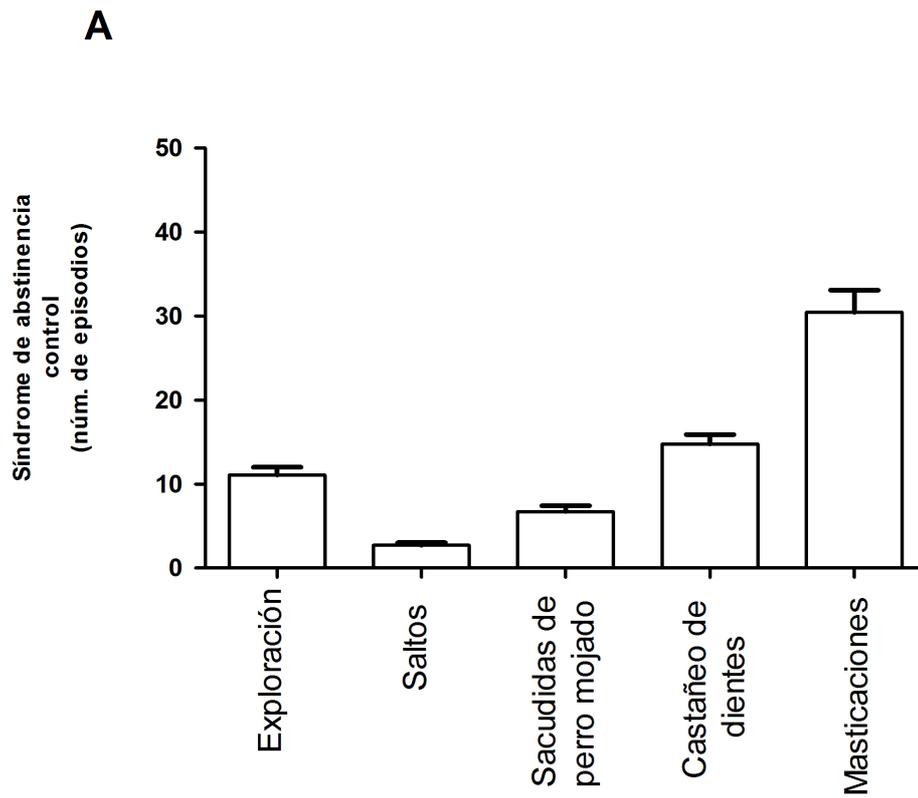


Figura 1. El histograma de barras (A) representa el número de episodios de cada signo observado en las ratas con síndrome de abstinencia. En la figura B está representada la puntuación total obtenida con todos los signos de abstinencia (tanto los cuantificados como los positivos) en el grupo control \pm E.E.M. ($n = 29$).

4.2.- EFECTO DEL TRATAMIENTO CRÓNICO CON CEFTRIAXONA EN EL SÍNDROME DE ABSTINENCIA A OPIÁCEOS.

Una vez comprobado el desarrollo del síndrome de abstinencia a la morfina en ratas tratadas con el pellet, empezamos el experimento con los grupos de tratamiento de ceftriaxona (CFT: 200 y 100 mg/kg, i.p., una vez al día , 7 días) para comprobar si este β -lactámico, que se ha descrito como potenciador de la expresión de EAAT2, reducía el síndrome de abstinencia físico.

Para evaluar el efecto de la ceftriaxona en el síndrome de abstinencia a morfina se inyectó este fármaco durante 7 días a una dosis diaria de 100 o 200 mg/kg, vía intraperitoneal. Se compararon dos grupos de tratamiento: uno que recibía morfina + salino (control) y el otro, morfina + ceftriaxona. Para realizar el tratamiento combinado (morfina + ceftriaxona), al quinto día de tratamiento con CFT o salino se colocó el pellet de morfina (200 mg/kg s.c.) y al cuarto día desde la colocación del pellet se procedió a administrar la naltrexona (10 mg/kg i.p). Finalmente, en estos animales evaluamos el síndrome de abstinencia.

Tratamiento crónico con ceftriaxona (200 mg/kg)

Las ratas tratadas con CFT (200 mg/kg) presentaron una menor incidencia de aparición de signos de abstinencia que las ratas control, pero esta reducción no resultó significativa, como podemos ver en la Tabla 2. En el caso de los signos “cuantificables,” apreciamos una reducción significativa de la frecuencia media de episodios en cada animal para los saltos ($P<0,01$), el castaño de dientes ($P<0,01$) y la masticación ($P<0,01$) (Fig. 2). En el caso de la exploración, observando el histograma también se aprecia cierta diferencia entre el grupo control y el de CFT (200 mg/kg), pero este cambio no llega a ser significativo, y en el signo de sacudidas de perro mojado apenas es perceptible ningún cambio (Fig. 2). En la Figura 3 se aprecia cómo la puntuación total también es estadísticamente significativa.

Estos datos indican que la ceftriaxona (200 mg/kg) reduce el síndrome de abstinencia físico en ratas tratadas con morfina.

Tabla 2. En esta tabla se muestran la comparación de los signos positivos observados en el síndrome de abstinencia de las ratas tratadas con salino y CFT (200 mg/kg). Se observan menos ratas con signos positivos en el grupo de CFT (200 mg/kg) que en el de salino.

	<i>RATAS positivas/ total</i>	
	<i>SALINO (control)</i>	<i>CEFTRIAXONA 200 mg/kg</i>
CHILLIDOS AL TOCAR	11/ 11	7/ 10
HOSTILIDAD AL COGER EN MANO	11/ 11	7/ 10
PTOSIS	11/ 11	8/ 10
PESTAÑEO	10/ 11	6/ 10
RINORREA	10/ 11	10/ 10
LAGRIMACIÓN	10/ 11	10/ 10
DIARREA	7/ 11	6/ 10
ERECCIÓN DEL PENE	11/ 11	7/ 10
POSTURA ANORMAL	11/ 11	7/ 10
OREJAS BLANQUECINAS	11/ 11	8/ 10
EYACULACIÓN	11/ 11	8/ 10
PILOERECCIÓN	11/ 11	9/ 10

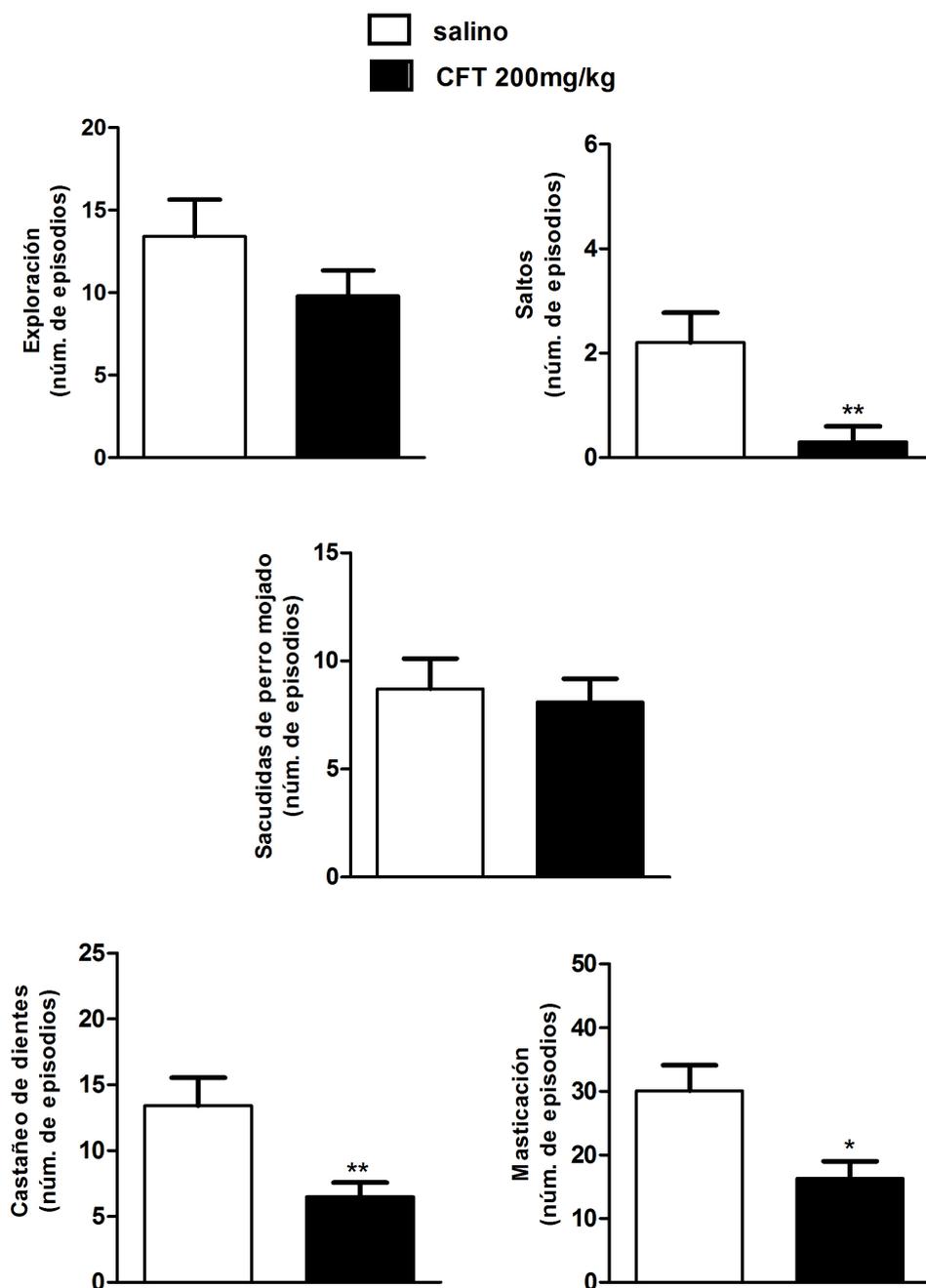


Figura 2. Cada uno de estos cinco histogramas de barras representa el número de episodios que se observó en los cinco signos cuantificables del síndrome de abstinencia a morfina en ratas tratadas con CFT (200 mg/kg). En este caso, tres de los signos resultaron ser estadísticamente significativos: los saltos (**, $P < 0,01$), el castaño de dientes (**, $P < 0,01$) y la masticación (*, $P < 0,05$). Se presenta la media \pm E.E.M de 11 y 10 animales, respectivamente, en cada grupo. Las comparaciones se realizaron con el test U de Mann-Whitney.

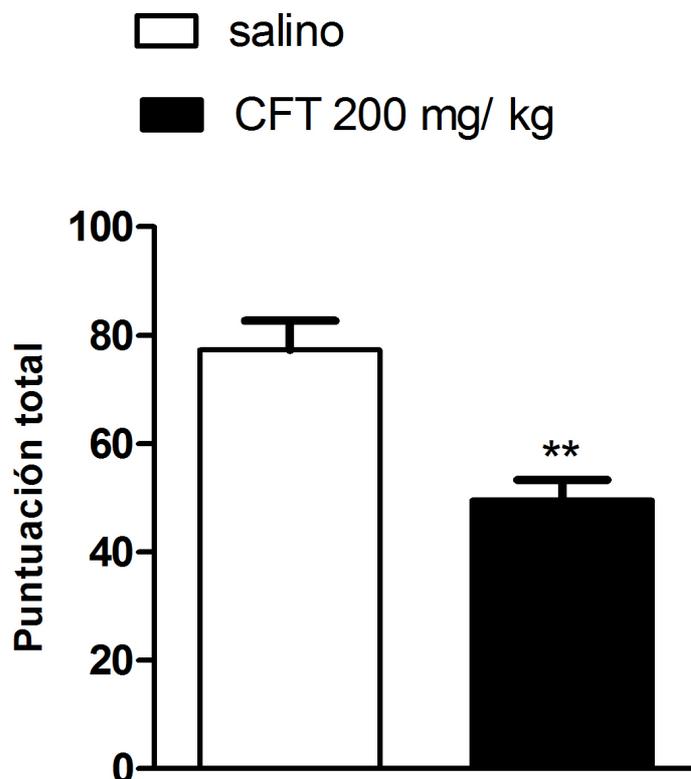


Figura 3. En este histograma de barras está representada la puntuación total obtenida en el sumatorio de todos los signos (tantos los cuantificables como los positivos) del síndrome de abstinencia a morfina en ratas tratadas con CFT (200 mg/kg). Al comparar el grupo de salino con el de CFT (200 mg/kg), se puede observar como la diferencia es estadísticamente significativa (**, $P < 0,01$). Se presenta la media \pm E.E.M de 11 y 10 animales, respectivamente, en cada grupo. Las comparaciones se realizaron con el test U de Mann-Whitney.

Tratamiento crónico con ceftriaxona (100 mg/kg)

Para comprobar si el efecto de CFT es dosis-dependiente, repetimos el experimento con un grupo de ratas que fueron tratadas con una dosis menor de CFT (100 mg/kg). El protocolo que se siguió fue el mismo que el de la CFT (200 mg/kg).

Las ratas tratadas con CFT (100 mg/kg) presentaron signos positivos de abstinencia muy similares a los del grupo control. No hubo ninguna diferencia en la incidencia de los signos “presentes” (Nº animales positivos/total) (Tabla 3). Igualmente, si observamos las figuras de los signos “cuantificables”, podemos apreciar que tampoco hubo ningún cambio significativo en la frecuencia de episodios de cada signo entre el grupo control y el grupo de CFT (100 mg/kg) (Fig. 4). Finalmente, la Figura 5 confirma lo ya explicado anteriormente; la CFT (100 mg/kg) no tiene ningún efecto sobre el síndrome de abstinencia de morfina.

Por lo tanto, podemos concluir que el efecto de la ceftriaxona en el síndrome de abstinencia está relacionado con la dosis.

Tabla 3. En esta tabla se muestra la comparación de los signos observados en el síndrome de abstinencia de las ratas tratadas con salino y CFT (100 mg/kg), medidos por su presencia o ausencia. No se observa ninguna diferencia significativa entre los dos grupos.

	<i>RATAS positivas/ total</i>	
	<i>SALINO (control)</i>	<i>CEFTRIAXONA 100 mg/kg</i>
CHILLIDOS AL TOCAR	7/ 8	8/ 8
HOSTILIDAD AL COGER EN MANO	7/ 8	8/ 8
PTOSIS	8/ 8	8/ 8
PESTAÑEO	8/ 8	8/ 8
RINORREA	8/ 8	8/ 8
LAGRIMACIÓN	7/ 8	8/ 8
DIARREA	7/ 8	7/ 8
ERECCIÓN DEL PENE	7/ 8	8/ 8
POSTURA ANORMAL	8/ 8	8/ 8
OREJAS BLANQUECINAS	8/ 8	8/ 8
EYACULACIÓN	7/ 8	7/ 8
PILOERECCIÓN	8/ 8	8/ 8

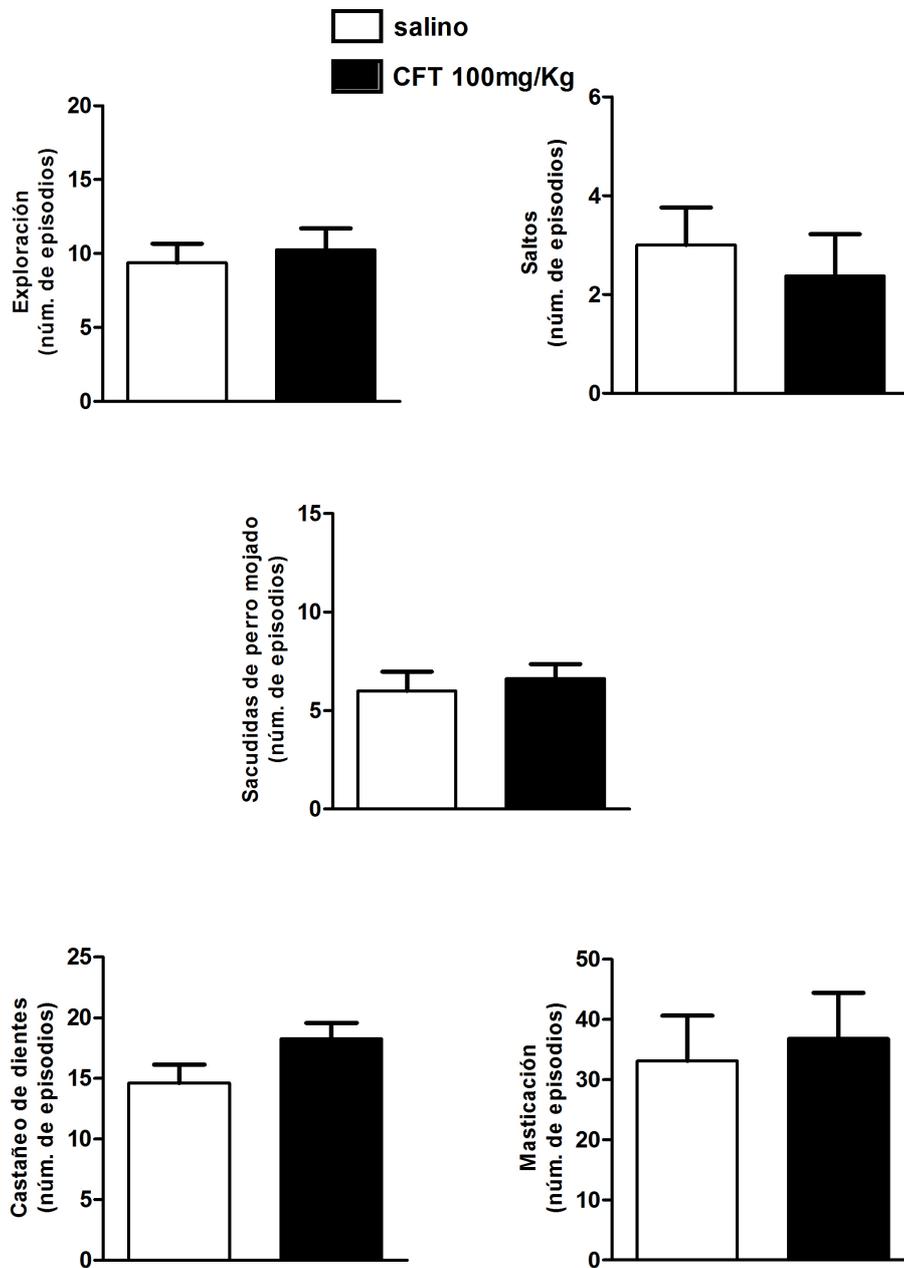


Figura 4. Cada uno de estos cinco histogramas de barras representa el número de episodios que se observó en los cinco signos cuantificables del síndrome de abstinencia a morfina en ratas tratadas con CFT (100 mg/kg) . En este caso, ninguno de los cinco signos resultó ser estadísticamente relevante. Se presenta la media \pm E.E.M de 8 y 8 animales, respectivamente, en cada grupo. Las comparaciones se realizaron con el test U de Mann-Whitney.

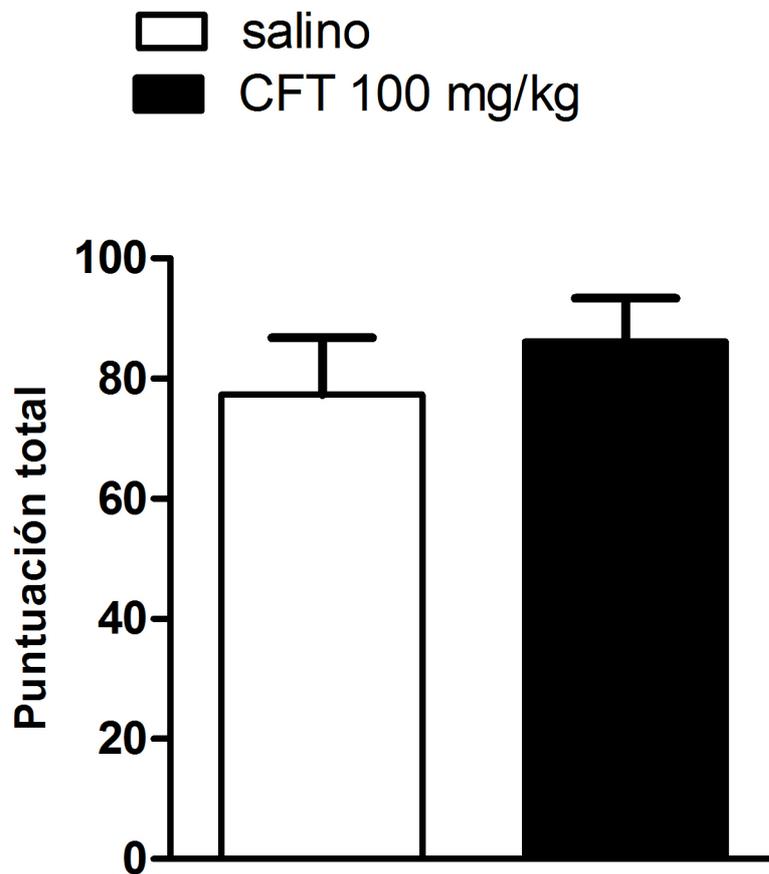


Figura 5. En este histograma de barras está representada la puntuación total obtenida en el sumatorio de todos los signos (tantos los cuantificables como los positivos) del síndrome de abstinencia a morfina en ratas tratadas con CFT (100 mg/kg). Al comparar el grupo de salino con el de CFT (100 mg/kg), se puede observar como la diferencia es estadísticamente irrelevante. Se presenta la media \pm E.E.M de 8 y 8 animales, respectivamente, en cada grupo. Las comparaciones se realizaron con el test U de Mann-Whitney.

4.3.- MODULACIÓN DEL EFECTO DE LA CEFTRIAXONA EN EL SÍNDROME DE ABSTINENCIA A LA MORFINA POR UN INHIBIDOR DE LA RECAPTACIÓN DEL GLUTAMATO (DHK).

En los dos anteriores subapartados, hemos podido ver que al analizar el comportamiento de los animales, parece que la ceftriaxona tiene efecto en el síndrome de abstinencia físico de la morfina dependiendo de la dosis. En este apartado, hemos añadido al tratamiento de ceftriaxona (200 mg/kg), el fármaco DHK. Este fármaco es un inhibidor específico de los EAAT2, y queremos comprobar si revierte el efecto de la CFT (200 mg/kg) en el síndrome de abstinencia a la morfina (si fuese así confirmaría la hipótesis planteada). En este caso, como en los dos tratamientos de ceftriaxona anteriores, se siguió el mismo protocolo de tratamiento semanal crónico con ceftriaxona (200 mg/kg), pero se añadió el DHK (10 mg/kg s.c.) tanto al grupo de CFT (200 mg/kg) como en el de salino, 30 minutos antes de la administración de la naltrexona (10 mg/kg). Esto es, el DHK se inyecta agudamente al final del tratamiento con ceftriaxona o salino, antes de generar el síndrome de abstinencia.

Las ratas tratadas con CFT (200 mg/kg) + DHK presentaron signos positivos de abstinencia muy similares a los del grupo control (CFT, sin CFT). No hubo diferencias en la incidencia de los signos “presentes” (Nº animales positivos/total) (Tabla 4). Además, si observamos las figuras de los signos “cuantificables”, podemos apreciar que tampoco hubo ningún cambio significativo en la frecuencia media de aparición de episodios de los distintos signos entre el grupo control (salino + DHK) y el grupo de CFT (200 mg/kg) +DHK (Fig. 6). Para terminar, la Figura 7 agrupa todos los signos (tanto los “cuantificables” como los “presentes”) y podemos ver como la CFT (200 mg/kg) + DHK no tiene ningún efecto sobre el comportamiento en el síndrome de abstinencia a morfina respecto al control, lo que lo diferencia del grupo de CFT (sin DHK, que tenía un efecto atenuador de la abstinencia (ver apartado 4.2.).

Como conclusión, podemos decir que el DHK revierte el efecto atenuante de la ceftriaxona en el síndrome de abstinencia a opiáceos.

Tabla 4. En esta tabla se muestra la comparación de los signos observados en el síndrome de abstinencia de las ratas tratadas con salino+DHK y CFT (200 mg/kg) +DHK, medidos por su ausencia o presencia. No se observa ninguna diferencia significativa entre los dos grupos.

	<i>RATAS positivas/ total</i>	
	<i>SALINO+DHK (control)</i>	<i>CEFTRIAXONA 200 mg/kg+DHK</i>
CHILLIDOS AL TOCAR	10/ 10	9/ 10
HOSTILIDAD AL COGER EN MANO	10/ 10	10/ 10
PTOSIS	10/ 10	10/10
PESTAÑEO	10/ 10	10/ 10
RINORREA	8/ 10	9/ 10
LAGRIMACIÓN	10/ 10	10/ 10
DIARREA	7/ 10	8/ 10
ERECCIÓN DEL PENE	10/ 10	10/ 10
POSTURA ANORMAL	10/ 10	10/ 10
OREJAS BLANQUECINAS	10/ 10	10/ 10
EYACULACIÓN	9/ 10	10/ 10
PILOERECCIÓN	10/ 10	10/ 10

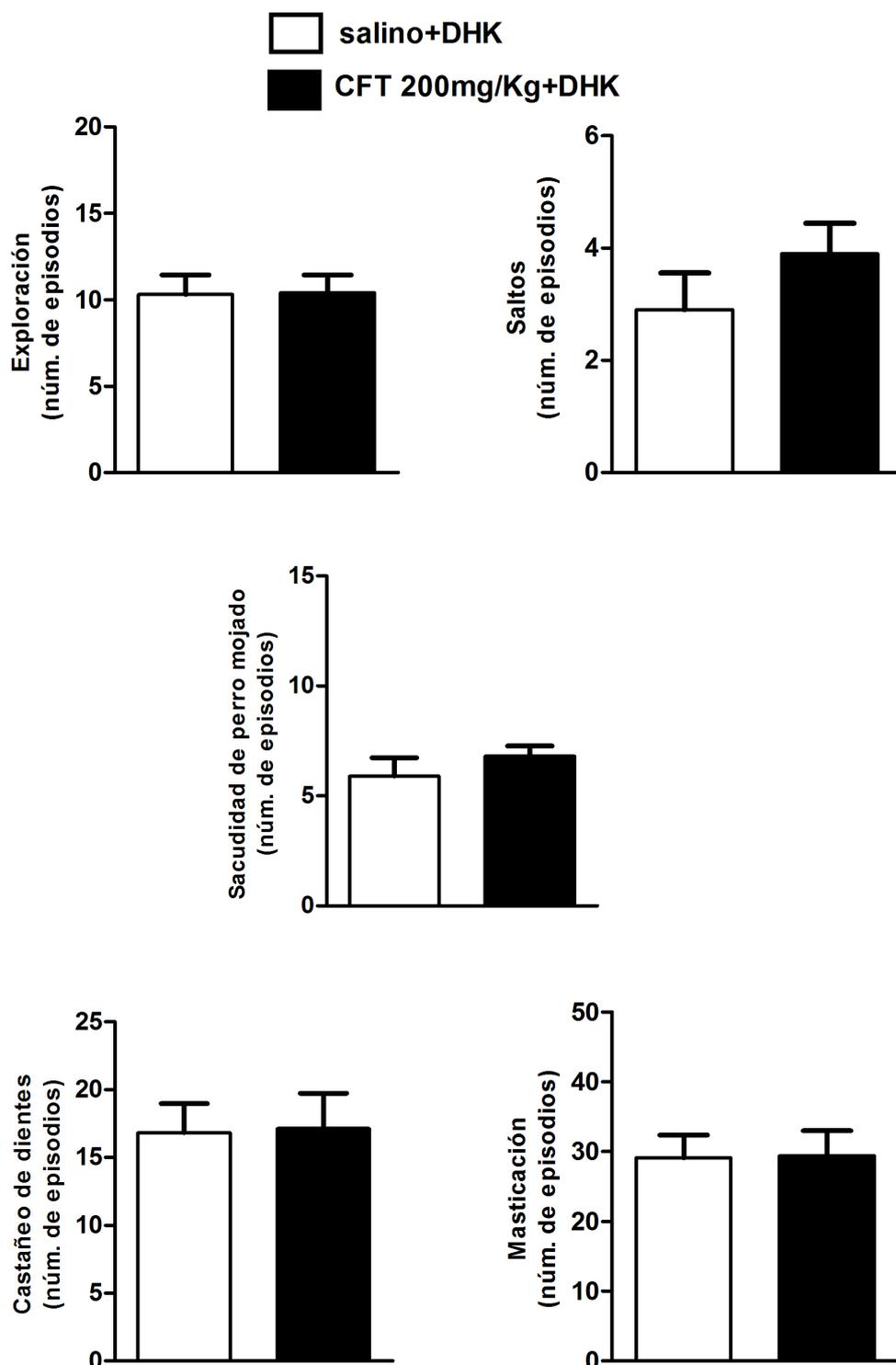


Figura 6. Cada uno de estos cinco histogramas de barras representa el número de episodios que se observó en los cinco signos cuantificables del síndrome de abstinencia a morfina en ratas tratadas con CFT (200 mg/kg) +DHK.. (Al grupo control también se le administró DHK). Ninguno de los cinco signos resultó ser estadísticamente relevante. Se presenta la media \pm E.E.M de 10 y 10 animales, respectivamente, en cada grupo. Las comparaciones se realizaron con el test U de Mann-Whitney.

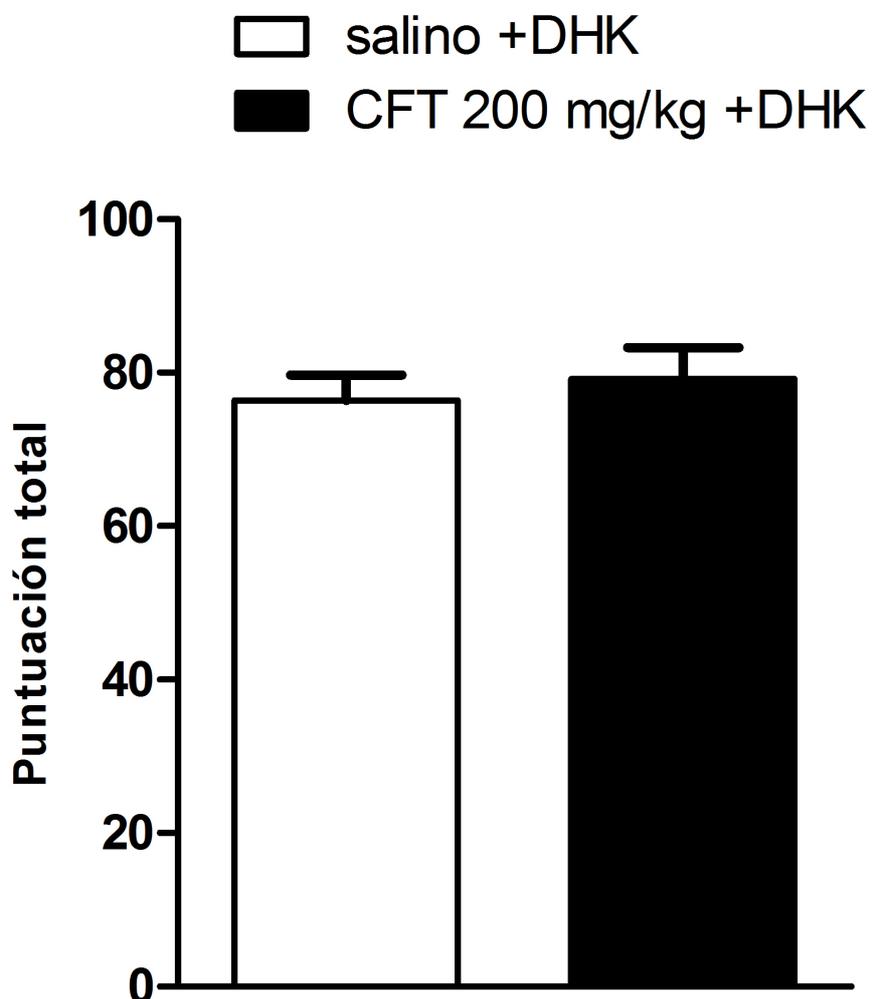


Figura 7. En este histograma de barras está representada la puntuación total obtenida en el sumatorio de todos los signos (tantos los cuantificables como los positivos) del síndrome de abstinencia a morfina en ratas tratadas con CFT (200 mg/kg) +DHK. Al comparar el grupo de salino+DHK con el de CFT (200 mg/kg) +DHK, se puede observar cómo la diferencia no es estadísticamente significativo. Se presenta la media \pm E.E.M de 10 y 10 animales, respectivamente, en cada grupo. Las comparaciones se realizaron con el test U de Mann-Whitney.

5.- DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

El glutamato desempeña un papel muy relevante en los procesos de neuroadaptación durante el síndrome de abstinencia a opiáceos. En concreto, en el LC se ha demostrado que el glutamato se encuentra sobre-activado durante el síndrome de abstinencia a opiáceos (Rasmussen, 1995). Como hemos planteado en la hipótesis, la ceftriaxona es un fármaco que incrementa el número de proteínas recaptadoras de glutamato en el cerebro (Rothstein et al., 2005). En el LC hay una gran número de recaptadores de glutamato de tipo glial (EAAT2, ver apartado hipótesis). Por tanto, se puede plantear la hipótesis de que el incremento de recaptadores de glutamato provoque una reducción del síndrome de abstinencia a opiáceos como consecuencia de un mayor nivel de recaptación de este neurotransmisor y la consecuente reducción de las concentraciones sinápticas de glutamato en el LC. De hecho, otros autores ya habían descrito que la ceftriaxona reduce el desarrollo de tolerancia y abstinencia a los opiáceos (Rawls et al., 2001a; 2010b).

El trabajo de esta investigación se enmarca en un proyecto más amplio enfocado al estudio electrofisiológico del LC y por ello pretendimos confirmar conductualmente si el protocolo a usar en este proyecto con morfina y ceftriaxona era válido en nuestras condiciones experimentales para reducir la abstinencia conductual a opiáceos y además profundizar con el inhibidor DHK en los mecanismos de acción de la ceftriaxona. En resumen, podemos decir que la ceftriaxona reduce algunos de los signos más característicos del síndrome de abstinencia a opiáceos en ratas y este efecto ocurre dependiendo de la dosis administrada. Al inyectar agudamente DHK, pudimos comprobar que la inhibición de la recaptación de glutamato revierte el efecto de la ceftriaxona, indicando que la acción atenuante de la ceftriaxona en el síndrome de abstinencia puede ser debida a una modificación de los recaptadores tipo EAAT2.

Como **conclusiones principales** de este experimento podemos nombrar tres:

1.- El protocolo de administración de morfina con pellets durante 3 días genera un síndrome de abstinencia florido y cuantificable en ratas, que se puede precipitar con naltrexona. Por tanto, el protocolo empleado en este estudio induce niveles de abstinencia conductual que son comparables a otros protocolos más duraderos con inyecciones repetidas de morfina (Pineda et al., 1998) o comprimidos NIDA de morfina (Lane-Ladd et al, 1997). Además, nuestro laboratorio ya había demostrado que el protocolo empleado en este trabajo produce un grado importante de tolerancia a los opiáceos en conducta analgésica y en el LC (Santamarta et al., 2006).

2.- El tratamiento crónico con ceftriaxona, un fármaco que incrementa el número de proteínas recaptadoras de glutamato (Rothstein et al., 2005), provoca una reducción en el síndrome de abstinencia a opiáceos y en concreto en algunos signos asociados. Este efecto de CFT esta relacionado con la dosis administrada. En consonancia con nuestros datos, existen algunos estudios ya publicados en los que se demuestra cómo los antibióticos β -lactámicos, y en concreto la ceftriaxona, bloquean el desarrollo del síndrome de abstinencia a opiáceos (Rawls et al., 2010a) y reducen la tolerancia analgésica opioide (Rawls et al., 2010b; Scott et al., 2010) en ratas tratadas con otros protocolos de morfina.

3.- La administración aguda de un inhibidor de la recaptación de glutamato glial, como es el DHK (Jensen y Brauner-Osborne, 2004), revierte el efecto atenuante de la ceftriaxona en el síndrome de abstinencia a opiáceos. Por tanto, el DHK es capaz de impedir que el tratamiento crónico con ceftriaxona disminuya el síndrome conductual de abstinencia a la morfina. Esta interacción es posible que se pueda dar en el LC dado el importante papel que tiene el Glu en este núcleo durante el síndrome de abstinencia a opiáceos (ver Hipótesis) y que además en este núcleo existe una alta densidad de EAAT2 funcionalmente activos (resultados de nuestro laboratorio, ver Hipótesis). El esquema sería que durante la administración de ceftriaxona aumentaría la cantidad de EAAT2 en el LC, lo que reduciría las concentraciones sinápticas de glutamato en este núcleo e impediría la sobre-activación neuronal noradrenérgica durante este síndrome atenuando el nivel

conductual de abstinencia. Los datos de un inhibidor de la recaptación de EAAT2 como el DHK revirtiendo el efecto de ceftriaxona apoyan esta hipótesis.

Podemos concluir este trabajo diciendo que la modulación de las proteínas recaptadoras de glutamato podrían llegar a ser lugares diana adecuados para el desarrollo de herramientas farmacológicas que regulen patologías asociadas con una hiperactividad glutamatérgica, como es el síndrome de abstinencia a opiáceos.

6.- REFERENCIAS

Aghajanian GK, Kogan H, Moghaddam B (1994). Opiate withdrawal increases glutamate and aspartate efflux in the locus coeruleus: an in vivo microdialysis study. *Brain Res.* 636: 126-130.

Artola A, Singer W (1993). Long-term depression of excitatory synaptic transmission and its relationship to long-term potentiation. *Trends in Neurosciences* 16: 480-487.

Constatine-Paton M, Cline HT, Debski E (1990). Patterned activity, synaptic convergence, and the NMDA receptor in developing visual pathways. *Annual Review of Neuroscience* 13: 129-154.

Danbolt NC (2000). Glutamate uptake. *Progress in Neurobiology* 65: 1-105.

Jensen AA, Brauner-Osborne H (2004) Pharmacological characterization of human excitatory amino acid transporters EAAT1, EAAT2 and EAAT3 in a fluorescence-based membrane potential assay. *Biochem Pharmacol* 67: 2115-2127.

Lane-Ladd SB, Pineda J, Boundy VA, Pfeuffer T, Krupinski J, Aghajanian GK, Nestler EJ (1997). CREB (cAMP response element-binding protein) in the locus coeruleus: Biochemical, physiological, and behavioral evidence for a role in opiate dependence. *Journal of Neuroscience* 17: 7890–7901.

Lord JA, Waterfield AA, Hughes J, Kosterlitz HW (1977). Endogenous opioid peptides: multiple agonists and receptors. *Nature* 267: 495-499.

Matsui A, Williams JT (2010). Activation of m-opioid receptors and block of K_{IR3} potassium channels and NMDA receptor conductance by *l*- and *d*-methadone in rat locus coeruleus. *British Journal of Pharmacology* 161: 1403-1413.

McDonald JW, Johnston MV (1990). Physiological and pathophysiological roles of excitatory amino acids during central nervous system development. *Brain Research Reviews* 15: 41-70.

Nakanishi S (1992). Molecular diversity of glutamate receptors and implications for brain function. *Science* 258 :597-603.

Nestler E.J. (2004). Historical review: Molecular and cellular mechanisms of opiate and cocaine addiction. *Trends in Pharmacological Sciences* 25: 4.

Nicholls DG (1993). The glutamatergic nerve terminal. *European Journal of Biochemistry* 212: 613-631.

Pasternak GW (2004). Multiple opiate receptors: deja vu all over again. *Neuropharmacology* 47: 312-323.

Pineda J, Torrecilla M, Martín-Ruiz R, Ugedo L (1998). Attenuation of withdrawal-induced hyperactivity of locus coeruleus neurones by inhibitors of nitric oxide synthase in morphine-dependent rats. *Neuropharmacology* 37: 759-767.

Rasmussen K, Beitner-Johnson D, Krystal JH, Aghajanian GK, Nestler EJ (1990). Opiate withdrawal and the rat locus coeruleus: behavioral, electrophysiological, and biochemical correlates. *Journal of Neuroscience* 10: 2308–2317.

Rasmussen K. (1995) The role of the locus coeruleus and N-methyl-D-aspartic acid (NMDA) and AMPA receptors in opiate withdrawal. *Neuropsychopharmacology* 13 (4): 295-300.

Rasmussen, BA, Baron DA, Kim JK, Unterwal EM, Rawls SM (2010). β -Lactam antibiotic produces a sustained reduction in extracellular glutamate in the nucleus accumbens of rats. *Springer- Verlag*. 761-764.

Rawls SM, Zielinski M, Patel H, Sacavage S, Barona DA, Patel D (2010a). Beta-lactam antibiotic reduces morphine analgesic tolerance in rats through GLT-1 transporter activation. *Drug and Alcohol Dependence* 107: 261-263.

Rawls SM, Baron DA, Kim J (2010b). b-lactam antibiotic inhibits development of morphine physical dependence in rats. *Behavioural Pharmacology* 0: 1-4.

Rothstein JD, Patel S, Regan MR, Haenggeli C, Huang YH, Bergles DE, Jinm L, Dykes Hoberg M, Vidensky S, Chung DS, Toan SV, Bruijn LI, Su ZZ, Gupta P, Fisher PB (2005) Beta-lactam antibiotics offer neuroprotection by increasing glutamate transporter expression. *Nature* 433:73-77.

Santamarta MT, Ulibarri I, Pineda J (2005). Inhibition of neuronal nitric oxide synthase attenuates the development of morphine tolerance in rats. *Synapse* 57: 38-46.

Sapoznik S, Ivenshitz M, Segal M (2006). Age-dependent glutamate induction of synaptic plasticity in cultured hippocampal neurons. *Learning and Memory* 13: 719-727.

Van Bockstaele EJ, Commons KG (2001). Internalization of mu opioid receptors produced by etorphine in the rat locus coeruleus. *Neuroscience* 108: 467-477.

Watkins JC, Krogsgaard-Larsen P, Honoré T (1990). Structure-activity relationships in the development of excitatory amino acid receptor agonists and competitive antagonists. *Trends in Pharmacological Sciences* 11: 25-33.

Zamalloa T (2007). Functional characterization of glutamate receptors and neuronal regulation by opiates in the rat locus coeruleus. Doctoral thesis.