

# POSIBLE MODULACIÓN DE LOS EFECTOS DEL SÍNDROME DE ABSTINENCIA A MORFINA POR LOS RECEPTORES $A_1$ DE LA ADENOSINA

Agustina Cano\*, Luisa Rocha\*\*\*, Magdalena Briones\*\*, Rafael Villalobos\*\*\*

## SUMMARY

The opiate withdrawal syndrome has attracted the interest of scientists and society since realizing that in the 1880s the medically useful opiate drugs induce state of physiological and psychological dependency. Explanations for this syndrome of autonomic disturbance and psychic distress, which appears when drug intake ceases, have ranged from elaborate psychological and moral theories to increasing precise biochemical theories. New compounds, introduced partly for their lack of withdrawal effects, have included both heroin and methadone; now both are known for their withdrawal syndromes and substantial abuse. Nearly every treatment suspected to affect brain functions has been tried without significant success against the withdrawal syndrome, including electroconvulsive therapy, major and minor tranquilizers, insuline-induced hypoglycemic shock, and many others. Not a single opiate treatment so far has been convincingly proven effective, thus the problems of opiate dependency remain substantial for the individuals involved, and costly to society due to lost productivity, treatment delivery, and crime associated with drug supply and procurement.

The scientific excitement about treatment for opiate withdrawal phenomena was increased by the discoveries that opiates act as receptors that are targets for numerous endogenous opiate-like peptide neurotransmitters. The research into the mechanisms of opiate action, tolerance and withdrawal suddenly appeared to offer insights into fundamental processes of central neural regulation and physiology. At the same time the increasing numbers of neurotransmitters, receptors, intracellular modulators, and interacting neuronal systems make more complex models and explanations necessary. At present, data suggest that every known neurotransmitters and neuroregulatory systems could be involved. Drug withdrawal is an integral part of most types of dependence and, to a large extent, opiate withdrawal has been considered the prototypical classical measure of opiate dependence. The opiate withdrawal syndrome is characterized by multiple behavioral and physiological signs such as behavioral activation, ptosis, diarrhea, wet dog shakes and motivational dysfunction, which may be represented in the central nervous system at multiple sites. Much recent evidence have been derived from studies of the nucleus locus coeruleus, the primary source of noradrenergic

innervation of the limbic system, cerebral and cerebellar cortices, and a quantitatively smaller sources of innervation of hypothalamic and other brainstem nuclei. The locus coeruleus presents a noradrenergic innervation and is enriched with opioid receptors of the  $\mu$  and  $\kappa$  subtypes. In addition, it receives afferents from primary pain and sensory systems and sends efferents to many areas of the brain associates with specific physiological changes described during classical morphine withdrawal syndrome. Postsynaptic receptors for these efferents are the adrenoceptors subtypes, where noradrenaline release, in addition to some specific effects, seems to modulate other neurotransmitter inputs. The locus coeruleus appears to contain presynaptic receptors on the perikarya or dendrites, and on the nerve terminals that mediate modulatory responses. Receptors for substance P, muscarinic acetylcholine, and glutamate are excitatory, and inhibitory responses are seen following application of  $\alpha$ -2 adrenoceptors, adenosine, GABA and benzodiazepine agonists, with evidence suggesting auto- and hetero-regulation, which involves the participation of efferents from the limbic system, cerebral cortex and hypothalamic innervation.

The development of dependence with repeated use and the expression of withdrawal syndrome are characteristic features of all the opiates, represented by morphine. Although many studies regarding several neurotransmitters and receptors have been conducted to define the mechanisms involved in the development of dependence and expression of opiate withdrawal, these have not been fully clarified despite the huge accumulation of experimental and clinical data at present. The known mechanism associated to the presentation and termination of morphine withdrawal is important in the cases of dependence from voluntary administration, when withdrawal results of suppression of morphine administration in the pain treatment, as well as in the cases of neonatal abstinence, which leads to prolonged hospitalization for both mother and infant.

Morphine is an opioid agonist with higher affinity by  $\mu$  opioid receptors, however, many evidences indicate that other receptors, such as adenosine receptors, participate in the morphine effects. Opiate receptor-mediated adenylate cyclase signalling in the locus

\* Departamento de Fisiología, Instituto Nacional de Cardiología, Ignacio Chávez. Juan Badiano N° 1, Col. Sección XIV, Tlalpan, 14080 México, D.F. e-mail: canagu@cardiología.org.mx

\*\* Subdirección de Neurociencias, Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente.

\*\*\* Departamento de Farmacobiología, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN. México, D.F.

Recibido primera versión: 27 de julio de 2001. Segunda versión: 3 de diciembre de 2001. Aceptado: 5 de abril de 2002.

coeruleus is an important pathway in opiate dependence. Acutely administered opiate binds to opioid receptors and inhibits production of cyclic adenosin monophosphate (cAMP) by adenylate cyclase and decrease cAMP-dependent protein kinase (PKA) activity. This results in the alteration of ion channels and the inhibitions of firing of locus coeruleus neurons. The continued presence of opiates and ongoing inhibition of adenylate cyclase activity may produce a compensatory enhancement of adenylate cyclase and PKA activity. Tolerance to opiates is associated with an increase in adenylate cyclase activity and the return of intracellular cAMP to baseline levels after two or three days of morphine treatment. Abrupt withdrawal of opiate after chronic administration produces adenylate cyclase hyperactivity associated with an acute flood of intracellular cAMP. Intravenous or intraventricular infusion of cAMP antagonizes morphine analgesia and accelerates the development of opiate tolerance and withdrawal syndrome. Complex regional alterations in adenylate cyclase and PKA activity and G protein subunits, after chronic morphine treatment, have been demonstrated in several brain regions.

Adenosine receptors, like opioid receptors, play an important role in regulating neuronal adenylate cyclase activity and intracellular cAMP levels and can therefore affect opiate dependence. Adenosine  $A_1$  receptor activation inhibits both adenylate cyclase activity and intracellular cAMP formation, while  $A_{2a}$  receptor activation stimulates both; these receptors ultimately affect PKA activity via cAMP regulation.

A variety of studies have suggested that adenosine receptors are involved in central opiate actions. On the other hand, the decrease of morphine withdrawal behavioral signs after a certain period of time, suggests endogenous changes that attenuate or terminate with morphine withdrawal. In rodents, the  $A_1$  adenosine agonists blockade the morphine withdrawal signs apparition; which suggests the participation of  $A_1$  receptors in the endogenous response related with attenuation of morphine withdrawal. Morphine withdrawal has been related with neural activity increased from locus coeruleus and many studies suggest the participation of other brain regions, such as limbic system and cerebral cortex. The main purpose of the present study was to know the endogenous changes in number ( $B_{max}$ ) and affinity ( $K_d$ ) of the adenosine  $A_1$  receptors in five rat brain structures related with activity of the locus coeruleus when the morphine withdrawal has finished. Wistar male rats received six injections of morphine (20 mg/kg, i.p.), one each twenty four hours. The frequency of presentation of five morphine withdrawal behavioral signs (anxiety, pupillary dilatation, jumping, wet dog shakes and tremor), was recorded. Animals were sacrificed when the morphine withdrawal signs were observed in less than 10% of the population, and brain regions were dissected. In receptor binding studies by saturation assays with  $^3H$ -clorocyclopentil-adenosine ( $^3H$ -CCPA), a selective radioligand to adenosine  $A_1$  receptors was used to obtain the corresponding  $B_{max}$  and  $K_d$  values from amygdala, cortex, striatum, hippocampus and hypothalamus membranes. Forty-eighth hours after the last morphine administration, the withdrawal signs were only present in 8% of the animals. At this time there was an increase in  $A_1$  receptor number in the hippocampus (45%), the amygdala (12%), and the cerebral cortex (142%). No differences in the  $A_1$ ,  $B_{max}$ , and  $K_d$  values were detected in the hypothalamus or the striatum in comparison with the control group. No significant changes were found in the affinity values in the hippocampus and

amygdala; however, in the cortex the  $K_d$  values were higher (50%) than in the control group. Therefore, initial  $\mu$  receptor activation results in adenosine  $A_1$  receptor upregulation in brain cortex and limbic structures (hippocampus and amygdala), which are associated with the decrease of morphine withdrawal signs. Simultaneously there are no changes in the hypothalamus and striatum. These results indicate that  $A_1$  receptors of only certain cerebral structures participate in the morphine withdrawal regulation. The  $A_1$  receptor upregulation found in the cortex and limbic system could be a endogenous response related with  $\mu$  and  $A_1$  receptor interaction that increases the ability of endogenous adenosine to decrease neural excitability to locus coeruleus in association to natural morphine withdrawal termination. The effects of endogenous adenosine on upregulated  $A_1$  receptors in limbic and cortical afferent pathways could attenuate effects of opioid-mediated upregulation of adenylate cyclase and PKA which could decrease the neuronal firing rate in locus coeruleus in association with a decrease in the excitatory neurotransmitter release. Our results suggest that adenosine  $A_1$  receptors represent an important site of therapeutic intervention in opiate dependence and in the treatment of withdrawal resulting when drug intake ceases.

**Key words:** Morphine withdrawal, rat brain, adenosine  $A_1$  receptors.

## RESUMEN

El síndrome de abstinencia a opiáceos ha llamado la atención de los científicos y de la sociedad desde la década de 1880, cuando se encontró que el uso médico de las drogas opiáceas inducía estados de dependencia física y psicológica. Los nuevos compuestos, como la heroína y la metadona, que al principio se emplearon por su aparente carencia de efectos colaterales, ahora se sabe que producen síndrome de abstinencia y que, incluso, se abusa de ellos. Los problemas de la dependencia de los opiáceos por consumo voluntario, así como los asociados al síndrome de abstinencia resultante de la suspensión de la administración de morfina en el tratamiento del dolor crónico y en los casos de síndrome de abstinencia neonatal, se presentan con gran frecuencia en los individuos involucrados, y representan un alto costo para la sociedad debido a la disminución de la productividad, a los recursos destinados a apoyar los tratamientos, que en el caso de la abstinencia neonatal incluye la hospitalización de la madre y del infante, así como a la presentación de conductas criminales asociadas con la obtención de la droga. Se sabe que junto con la presentación del síndrome de abstinencia a opiáceos se altera más de un sistema endógeno de neurotransmisión, y se postula que se presentan cambios que contribuyen a la presentación del síndrome, mientras que otros contribuyen a su terminación. La mayoría de los estudios se ha dirigido a los factores que los causan, y se ha puesto poca atención en los posibles procesos endógenos asociados a la terminación del síndrome de abstinencia a opiáceos. El desarrollo de la dependencia por el uso repetido, y la presentación del síndrome de abstinencia cuando se suspende el suministro de la droga, son características típicas de todos los opiáceos, representados por la morfina. Después de cierto tiempo la disminución de los signos conductuales del síndrome de abstinencia a morfina sugiere la existencia de cambios endógenos que lo ate-

núan o que lo terminan. En los roedores, los agonistas  $A_1$  de la adenosina bloquean la aparición de los signos del síndrome de abstinencia a morfina, lo que sugiere que en la respuesta endógena relacionada con la atenuación del síndrome de abstinencia a morfina podrían participar los receptores  $A_1$ . La mayoría de las evidencias indica que el síndrome de abstinencia a opiáceos resulta de la actividad neuronal incrementada en el *locus coeruleus*. Se propone que la participación del *locus coeruleus* está regulada por la inervación noradrenérgica del sistema límbico, de la corteza cerebral y cerebelar y cuantitativamente, aunque en menor proporción, por la inervación del hipotálamo y de otros núcleos del tallo cerebral. El propósito del presente estudio fue conocer los cambios endógenos en el número ( $B_{max}$ ) y la afinidad ( $K_d$ ) de los receptores  $A_1$  en distintas regiones cerebrales al final del síndrome de abstinencia a morfina. Se utilizaron ratas Wistar macho que recibieron seis inyecciones de morfina (20 mg/kg i.p), una cada 24 horas. Se registró la frecuencia con la que se presentaban cinco signos conductuales del síndrome de abstinencia a morfina (ansiedad, dilatación de la pupila, saltos, sacudidas de perro mojado y temblor), se sacrificó a los animales en el momento en que los signos se observaron en menos de 10% de la población y se obtuvieron las regiones cerebrales. A partir de los estudios de unión a receptor en los ensayos de saturación con  $^3H$ -clorociclopentiladenosina ( $^3H$ -CCPA), un radioligando selectivo para los receptores  $A_1$ , en las membranas de la amígdala, la corteza, el estriado, el hipocampo y el hipotálamo se obtuvieron los valores de  $B_{max}$  y  $K_d$  correspondientes. Cuarenta y ocho horas después de la última inyección de morfina los signos conductuales se presentaron en sólo 8% de los animales. Para entonces, el número de receptores  $A_1$  se incrementó en el hipocampo (45%), en la amígdala (12%) y en la corteza cerebral (142%). En el hipotálamo y en el estriado las diferencias no resultaron significativas, ni en el número ni en la afinidad de los receptores  $A_1$ . En la amígdala y en el hipocampo no se modificó la afinidad, mientras que en la corteza, los valores de  $K_d$  resultaron ser mayores (50%) que en el control. El incremento en el número de receptores  $A_1$  en la corteza cerebral y en las regiones límbicas (hipocampo y amígdala), simultáneamente con la ausencia de cambios en el estriado y el hipotálamo, se asocia con el decremento en los signos del síndrome de abstinencia a morfina. Estos resultados indican que el incremento de los receptores  $A_1$  podría ser una respuesta endógena relacionada con la interacción entre los receptores  $\mu$  y  $A_1$ , que bloquea la actividad neuronal desde la corteza, y el sistema límbico hacia el *locus coeruleus*, lo que contribuye a la terminación natural del síndrome de abstinencia a morfina. Nuestros resultados sugieren que los receptores  $A_1$  de la adenosina representan un nivel de intervención terapéutica en la dependencia a los opiáceos y en el tratamiento del síndrome de abstinencia resultante de la suspensión del suministro de la droga.

**Palabras clave:** Síndrome de abstinencia a morfina, cerebro de rata, receptores  $A_1$  de la adenosina.

## INTRODUCCIÓN

El conocimiento de los mecanismos endógenos que terminan con el síndrome de abstinencia es importante no únicamente en los casos relacionados con la dependencia de opiáceos (11, 27), sino también en los casos del síndrome de abstinencia resultante de la suspensión del tratamiento con morfina debido a dolor crónico (36), así como en los casos del síndrome de abstinencia neonatal (8, 29). El estudio de tales mecanismos en humanos se dificulta por obvias razones, por lo que se recurre a modelos experimentales en animales. Al respecto se conoce que la administración repetida de morfina a roedores produce tolerancia y dependencia. Al suspender el suministro de la droga se presenta síndrome de abstinencia, que se caracteriza por una serie de alteraciones conductuales, que incluye: saltos, sacudidas de perro mojado, temblores, dilatación de la pupila y ansiedad, observables entre tres y seis horas después de la última administración de morfina (18, 23, 27, 44, 46). La proporción de estos signos se incrementa hasta alcanzar un grado máximo, y, después de cierto periodo, los signos conductuales desaparecen (18, 23), lo que sugiere la existencia de mecanismos endógenos que termina con la excitabilidad neuronal que produce el síndrome de abstinencia a morfina. Se sabe que el síndrome de abstinencia a morfina se produce por la actividad neuronal incrementada en el *locus coeruleus*, que se propaga a otras regiones cerebrales (27, 28, 32, 34), y que en la producción de este síndrome de abstinencia, además del sistema opioide (3, 27, 28), podrían participar otros sistemas de neurotransmisión y neuromodulación (7, 15, 20, 22, 34, 36, 39, 44). Sin embargo, poca atención se ha puesto a regiones cerebrales distintas al *locus coeruleus*, así como a los mecanismos endógenos que terminan con el síndrome de abstinencia a morfina. Se sabe también que la morfina se une con mayor afinidad a los receptores  $\mu$  opioides (31, 33, 40). Sin embargo, los efectos de la activación inicial de los receptores  $\mu$  parecen modularse por su interacción con otros receptores, como los receptores de la adenosina, pues los efectos analgésicos de la morfina se acentúan en presencia de agonistas de los receptores de la adenosina y se bloquean en presencia de sus antagonistas (10, 38, 41), mientras que los efectos del síndrome de abstinencia a opioides se abaten en presencia de análogos de la adenosina, mismos que se revierten en presen-

cia de sus antagonistas (7, 22, 25, 36, 44). En ambos casos, la participación de los receptores  $A_1$  es más consistente que en los otros subtipos de receptores de la adenosina (7, 22, 38). Esta serie de evidencias, junto con el hecho de que la activación de los receptores  $A_1$  en diferentes regiones cerebrales inhibe la actividad neuronal de manera consistente (30), hace de los receptores  $A_1$  candidatos importantes en los mecanismos asociados con la terminación endógena del síndrome de abstinencia de la morfina. Por otro lado, estudios recientes sugieren que la administración crónica de diferentes drogas que producen dependencia induce la interacción entre receptores de distintos sistemas de neurotransmisión (1, 15, 19, 23, 39), y que una forma de participación de los distintos sistemas de neurotransmisión asociados al síndrome de abstinencia de los opiáceos podría ser mediante cambios en sus receptores (1, 7, 13, 21, 23, 41).

A partir de las evidencias expuestas, con el propósito de conocer la respuesta endógena en los receptores  $A_1$  de la adenosina en cinco regiones cerebrales de rata (amígdala, corteza, estriado, hipocampo, hipotálamo), en asociación con la terminación del síndrome de abstinencia de la morfina más que a su producción, en la presente investigación se cuantificaron los cambios en la afinidad y cantidad de los receptores  $A_1$  al finalizar el síndrome de abstinencia de la morfina natural, resultante de la suspensión de la administración repetida de morfina y sin utilizar naloxona para precipitarlo. Lo anterior contrasta con la mayoría de los estudios en los que se administra morfina de forma continua a roedores y se precipita el síndrome de abstinencia con naloxona (12, 18), si se considera que el síndrome de abstinencia de la morfina en humanos no resulta de la precipitación con naloxona, sino de la suspensión del suministro repetido de la droga (8, 11, 28, 37).

## MATERIAL Y MÉTODOS

### *Animales, tratamiento con morfina y obtención del tejido*

Se utilizaron ratas Wistar macho, de 250-300 g de peso corporal, con agua y alimento *ad libitum* (n=12). Después de una semana de habituación, cada rata recibió una inyección intraperitoneal (i.p) de morfina (20 mg/kg) cada 24 horas durante 6 días, tratamiento que se sabe

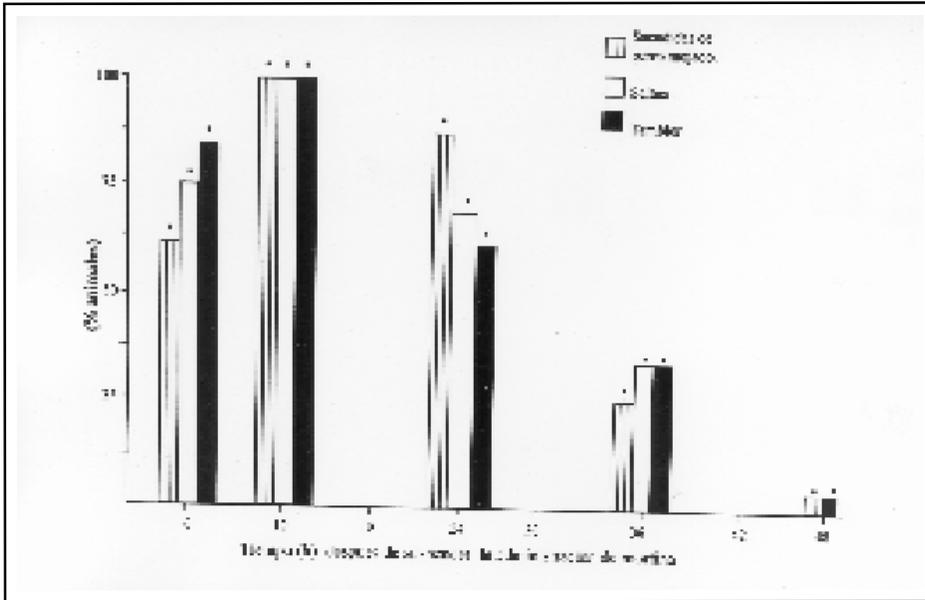
produce tolerancia y dependencia (3). Después de la última administración se registró la frecuencia con que se presentaban algunos signos característicos del síndrome de abstinencia de opiáceos (18, 23) en los animales (saltos [ante la manipulación], temblor, sacudidas de perro mojado, dilatación de pupila y ansiedad [intentos repetidos por meter la cabeza debajo del aserrín]). Se realizaron observaciones durante 20 minutos, cada 3 horas, durante las 12 horas subsecuentes, y cada 12 horas en las siguientes 36. Los animales del grupo control (n=12) recibieron el mismo esquema de inyecciones, pero con solución salina (1ml/kg, i.p). Se realizaron tres réplicas de la condición anterior y se encontró que 48 horas después de la última administración menos de 10% de los animales presentaron los signos del síndrome de abstinencia de la morfina. Así, 48 horas después de la última inyección se sacrificó a los animales (n=12) por decapitación y se obtuvieron las siguientes regiones cerebrales: amígdala, corteza, estriado, hipocampo e hipotálamo, sobre una superficie fría (4°C), según el procedimiento de Glowinsky e Iversen (1966).

### *Obtención de las membranas cerebrales*

Se unieron cada una de las estructuras (n=12), se pesaron y se homogeneizaron en buffer Tris-HCl frío (50 mM, pH 7.4) con un polytron (PT-10) en la escala de 6, durante 30 segundos. El homogeneizado se centrifugó dos veces a 30,000 g por 20 min, a 4°C. El precipitado resultante se resuspendió en buffer Tris-HCl, pH 7.4. Con el propósito de eliminar la adenosina endógena remanente que pudiese interferir con la unión del radioligando, las muestras se incubaron con adenosina deaminasa (2U/ml) (Sigma Chemical, Co.) en buffer Tris por 30 min a 25°C. Las suspensiones de membranas se recentrifugaron y los nuevos precipitados se suspendieron en buffer Tris y se guardaron a -70°C en volúmenes de 1 ml, hasta su utilización en los ensayos de unión ligando-receptor.

### **Ensayos de unión a receptores $A_1$**

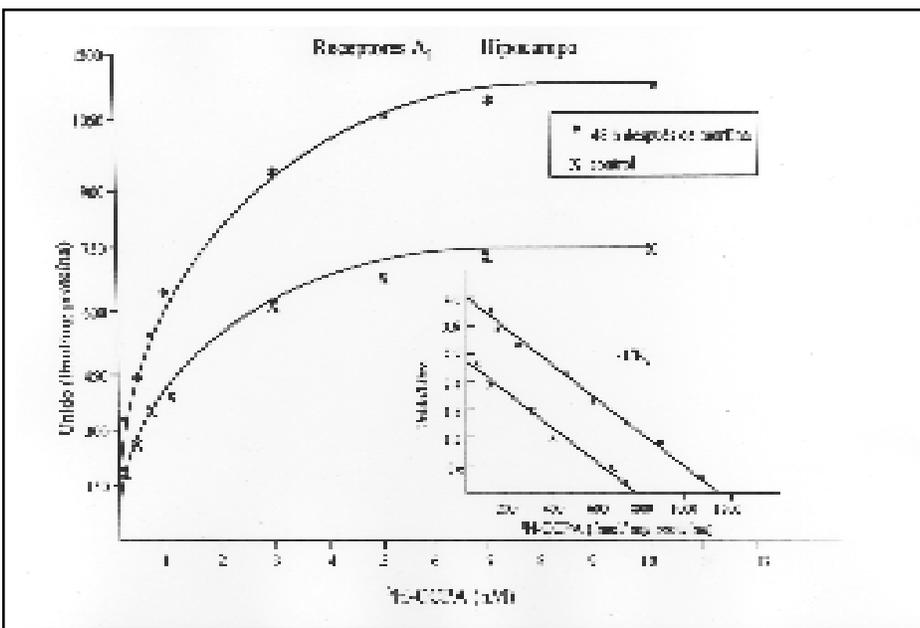
Se realizaron ensayos de saturación con  $^3\text{H}$ -clorociclo-pentil-adenosina ( $^3\text{H}$ -CCPA) (170 Ci/mmol, Dupont/New England Nuclear, EUA), como radioligando selectivo para los receptores  $A_1$  de la adenosina. Las membranas (0.1-0.5 mg proteína) se incubaron con 8 concentraciones (0.1-10 nM) de radioligando en buffer Tris-HCl (50 mM,



**Figura 1.** Secuencia temporal en la presentación de los signos del síndrome de abstinencia de la morfina. Se muestra el promedio porcentual de los animales que presentaron las conductas indicadas, proveniente de tres réplicas con n=12. En todos los casos la diferencia fue significativa respecto del grupo control, con una P<0.05.

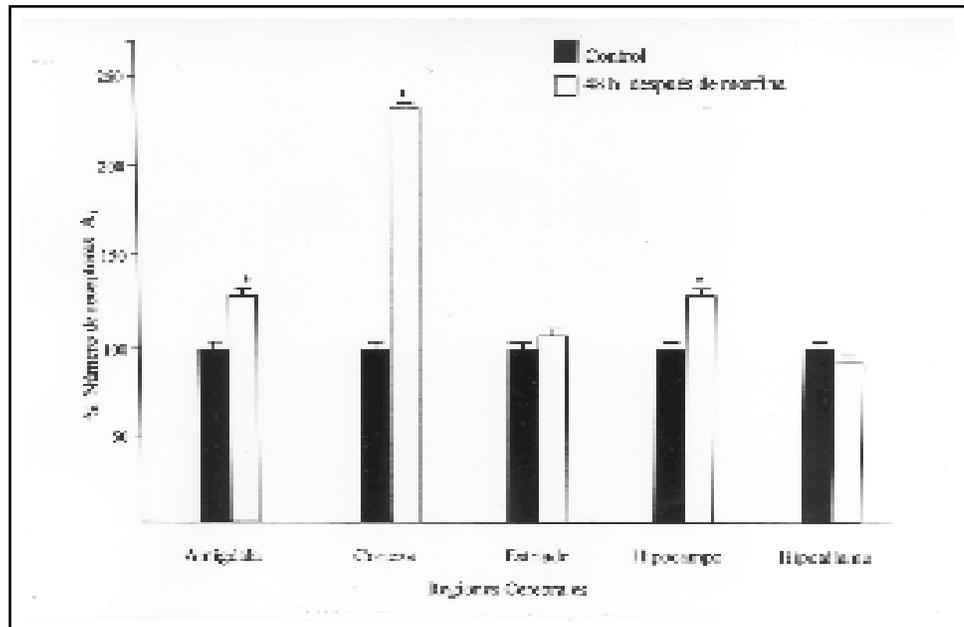
pH 7.4) por una hora a 25°C en un volumen total de 250  $\mu$ l. La unión no específica se determinó en presencia de 1 mM de teofilina (antagonista no selectivo para los receptores de la adenosina). Se realizaron por lo menos 4 ensayos independientes para cada estructura y se determinó por triplicado cada concentración de la curva de saturación. El ligando unido del libre se separó mediante filtración por vacío a través de filtros GF/B en un multifiltro Brandel (Gaithersburg, MD) con dos lavados de 5 ml de buffer Tris HCl frío. Los filtros se sumergieron en 4 ml de líquido de cen-

telleo (Aquasol, Amersham) y se cuantificó la radioactividad en un espectrómetro (Beckman LS6000SC). Se calcularon los valores de  $B_{max}$  y de  $K_d$  mediante el análisis de Scatchard con el programa LIGAND EBDA (26). El contenido de proteínas se midió con el reactivo de Folin (24). Las réplicas de los ensayos de saturación se analizaron individualmente y las medias de los parámetros de unión a receptor ( $B_{max}$  y  $K_d$ ) ( $\pm$  error estándar de 4 experimentos) del grupo experimental y control se compararon mediante una prueba t de Student independiente.



**Figura 2.** Curvas de saturación y transformación de Scatchard representativas para los receptores  $A_1$  en el hipocampo de ratas, 48 horas después de la última administración de morfina, en comparación con el control. Cada concentración de la curva se probó por triplicado.

**Figura 3.** Representación porcentual de los cambios en el número de receptores  $A_1$  en diferentes regiones cerebrales, 48 horas después de suspender la administración de morfina en comparación con los valores control (100%). \* $P < 0.05$ .



## RESULTADOS

### *Conductas del síndrome de abstinencia*

Los parámetros registrados (temblor, sacudidas de perro mojado, dilatación de pupila y ansiedad) se presentaron entre 25 y 50% de los animales a partir de las 3 horas posteriores a la última administración de morfina, como se reportó en otros trabajos (23). A las 12 horas todos los animales presentaron los cinco signos registrados. La frecuencia de su presentación disminuyó después de este tiempo, de modo que a las 24 y 36 horas después, se presentaron los signos del síndrome de abstinencia en 66% y 33% de los animales, respectivamente. Cuarenta y ocho horas después de la última

administración de morfina, la proporción de animales con los signos del síndrome de abstinencia registrados se redujo a 8%. En la figura 1 se muestra la secuencia temporal de la presentación de las sacudidas de perro mojado, saltos y temblor en la población a partir de tres réplicas, después de suspender la administración de morfina.

### *Cambios en el número ( $B_{max}$ ) y la afinidad ( $K_d$ ) de los receptores $A_1$*

Para las 5 regiones cerebrales analizadas, la unión específica del radioligando fue saturable. La unión no específica fue de 15 a 25% para  $^3H$ -CCPA. En el análisis de Schatchard se obtuvo una relación lineal al graficar los valores del

**CUADRO 1**  
Valores de  $B_{max}$  y  $K_d$  para los receptores  $A_1$  de la adenosina en cinco regiones cerebrales de ratas, 48 horas después de la última administración de morfina

Región	Receptores $A_1$ de la adenosina			
	$B_{max}$ (fmol/mg proteína)		$K_d$ (nM)	
	Control	48 h después de administrar morfina	Control	48 h después de administrar morfina
Amígdala	530 ± 15	616 ± 12*	0.49 ± 0.2	0.43 ± 0.1
Corteza	440 ± 30	1066 ± 33*	0.51 ± 0.1	0.97 ± 0.1*
Estriado	25 ± 10	32 ± 10	0.60 ± 0.2	0.51 ± 0.1
Hipocampo	730 ± 30	1061 ± 27*	0.85 ± 0.2	0.63 ± 0.1
Hipotálamo	39 ± 10	35 ± 12	0.51 ± 0.1	0.49 ± 0.1

Cada valor representa la media ± el error estándar de cuatro ensayos de saturación con  $^3H$ -CCPA. Se presenta cada concentración por triplicado, para cada estructura.

\* $P < 0.05$  en comparación con el grupo control.

radioligando unido en función de la relación unido/libre, con un coeficiente de Hill cercano a 1. En estas gráficas el valor de la  $K_d$  corresponde al recíproco negativo de la pendiente y el valor de  $B_{max}$  corresponde al intercepto en el eje de las X (figura 2). En la figura 2 se muestran las gráficas representativas para el hipocampo, en las que se observan las diferencias entre el grupo experimental y el control.

En el hipotálamo y el estriado el número y afinidad de los receptores  $A_1$  resultó equivalente al del grupo control. En la amígdala y el hipocampo, el número de receptores  $A_1$  resultó mayor 12% y 45%, respectivamente, en comparación con el control, sin cambios significativos en los valores de afinidad. En la corteza cerebral el número de receptores  $A_1$  fue mayor 142%, respecto del control (cuadro 1, figura 3). Los valores de  $K_d$  en la corteza resultaron mayores 50% (cuadro 1).

## DISCUSIÓN

A diferencia de otros estudios donde el síndrome de abstinencia de la morfina se precipita con naloxona (7, 18, 20, 23, 27), en la presente investigación se analizaron los cambios en los receptores  $A_1$  al final del síndrome de abstinencia natural de la morfina. Los resultados de radioligando en la presente investigación indican que una respuesta endógena natural ante este síndrome de abstinencia en ratas por parte del sistema de la adenosina es un incremento en el número ( $B_{max}$ ) de receptores  $A_1$  en la corteza cerebral, el hipocampo y la amígdala, pero no en otras regiones, como el estriado y el hipotálamo. Esto sugiere que la respuesta endógena del sistema de la adenosina no es generalizada y que la atenuación de los signos del síndrome de abstinencia de la morfina encontrada en el presente estudio podría resultar de la unión de la adenosina endógena a los receptores  $A_1$  incrementados en la corteza y en el sistema límbico. Estos resultados son consistentes con el hecho de que la inervación cortical y límbica regulan la función del *locus coeruleus* y el núcleo *accumbens*, considerados los principales sustratos anatómicos del síndrome de abstinencia de los opiáceos (18, 27, 28, 32, 34).

Estudios previos que analizaron los cambios durante el síndrome de abstinencia de la morfina reportaron un incremento en los receptores

$A_1$  en el cerebro completo (2) y en la corteza cerebral (21) de ratones, sin cambios en el hipocampo (21). Junto con nuestros resultados, esto indicaría que el incremento de los receptores  $A_1$  en la corteza se relaciona tanto con la presentación como con la terminación de este síndrome de abstinencia, mientras que el incremento de los receptores  $A_1$  en el sistema límbico se relaciona con su terminación. Lo anterior podría relacionarse con la participación del sistema límbico en los aspectos motivacionales del síndrome de abstinencia de los opiáceos (27, 34, 46). A su vez estos resultados son muy interesantes y coinciden con la participación del sistema límbico en los efectos convulsivos asociados con el síndrome de abstinencia (18), así como con la atenuación de las crisis convulsivas por agonistas  $A_1$  de la adenosina en diferentes modelos animales de epilepsia (6, 43).

Se desconoce el mecanismo mediante el cual el incremento de los receptores  $A_1$  podría atenuar los efectos del síndrome de abstinencia de la morfina. Con base en las evidencias existentes, proponemos algunas posibilidades. La morfina se une con mayor afinidad a los receptores  $\mu$ , mismos que, al igual que los receptores  $A_1$ , se acoplan al sistema de la adenilato ciclasa de manera negativa (30, 40). En un estudio previo, nosotros informamos que el número de receptores  $\mu$  cerebrales se incrementa 48 horas después del tratamiento con morfina (6). Se sabe que, como parte del síndrome de abstinencia de opiáceos, al eliminar la presencia del ligando, una respuesta inmediata como mecanismo compensatorio es un incremento masivo de los niveles intracelulares de AMPc (27, 28, 34). El incremento en el número de receptores  $A_1$  y  $\mu$  después del síndrome de abstinencia de la morfina podría relacionarse con una respuesta dirigida a disminuir los niveles de AMPc, como parte de una intercomunicación entre ambos receptores (1, 9, 13). De este modo podría disminuir la liberación de neurotransmisores, como los aminoácidos excitadores, asociados con excitabilidad neuronal incrementada durante el síndrome de abstinencia (42, 45). Tal hipótesis es más consistente con el efecto bloqueador que tienen los agonistas  $A_1$  de la adenosina (7, 22, 44) sobre el síndrome de abstinencia, que para los agonistas  $\mu$ , cuyos efectos sobre la actividad neuronal pueden ser tanto excitatorios como inhibitorios (40). Otra posibilidad podría ser una regulación a nivel transcripcional, pues se ha encontrado que en asociación con el síndrome de abstinencia de la morfina se presenta la inducción de genes tempranos, como c-jun, c-fos y krox-24, así como de sus proteínas en el *locus coeruleus*,

corteza, hipocampo y otras regiones cerebrales (4, 16). Se propone que tal inducción podría resultar de la fosforilación de factores de transcripción constitutivos que se unen con alta afinidad a los elementos responsivos a calcio/AMPC (CREB), con la participación de la PKA (17).

Los resultados de radioligando, respecto de la afinidad indican un incremento en los valores de  $K_d$  en la corteza, lo cual podría reflejar una disminución en la afinidad en los receptores  $A_1$  (30), quizá como respuesta compensatoria ante el incremento marcado (142%) en el número de receptores  $A_1$  en esta región cerebral. Sin embargo, debido a que no es tan grande la diferencia en los valores de afinidad, esto no necesariamente implica cambios conformacionales en los receptores  $A_1$ . Tal diferencia podría resultar de una alteración en el acoplamiento de los receptores  $A_1$  con las proteínas G después del tratamiento con morfina (9).

Resulta interesante considerar que el incremento de receptores  $A_1$  cerebrales podría ser un evento común en diferentes alteraciones neuronales que se presentan de manera repetida como respuesta de plasticidad neuronal. Tal es el caso del estado epiléptico (5) y la abstinencia alcohólica (19), situaciones en las que se ha reportado un incremento en el número de receptores  $A_1$  después de crisis epilépticas repetidas (5) y después de episodios repetidos de abstinencia alcohólica (19) en ratas, respectivamente.

Nuestros resultados indican que, junto con la terminación de los signos del síndrome de abstinencia de la morfina, se presenta un incremento de receptores  $A_1$  en la corteza y en el sistema límbico. En tal situación podría facilitarse la acción inhibitoria de la adenosina endógena, y atenuar los signos de este síndrome de abstinencia. Así, un sistema alterno en el tratamiento del síndrome de abstinencia de los opiáceos es el sistema de la adenosina, no sólo en los casos de dependencia a opiáceos (27), sino en aquellos en los que se trata el dolor crónico con morfina (37), y en los de síndrome de abstinencia neonatal (8, 29). Habría que considerar los procesos endógenos que regulan la disponibilidad de la adenosina, como la recaptura y la degradación (30), además del uso de agonistas  $A_1$  (22, 25, 36) en el diseño de fármacos para el tratamiento del síndrome de abstinencia de opiáceos.

## Agradecimientos

Agradecemos a Feliciano Camacho, del Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente, por su asistencia técnica. Este trabajo recibió el apoyo parcial de los proyectos del CONACyT 28553-M (R.V.) y 31702-M (L.R.).

## REFERENCIAS

1. AGNATI L, FERRE C, CORTELLI P, FUXE K: A brief appraisal on some aspects of the receptor-receptor interaction. *Neurochem Int*, 27:139-146, 1995.
2. AHLIJANIAN M, TAKEMORI A: Changes in adenosine receptor sensitivity in morphine-tolerant and dependent mice. *J Pharmacol Exp Ther*, 236:615-620, 1986.
3. ANTIKIEWICZ-MICHALUK L, MICHALUK J, MARONALEWIEKA D, VETULANI J: The effect of morphine dependence and abstinence on opioid receptors in the cerebral cortex and spinal cord of the rat. *Pol J Pharmacol Pharm*, 40:11-16, 1988.
4. BECKMANN A: Immediate early gene expression during morphine withdrawal. *Neuropharmacology*, 34:1183-1189, 1995.
5. CANO A, ROCHA L, VILLALOBOS R, BRIONES M: Effect of kainate-induced status epilepticus on  $A_1$  adenosine receptor in the rat brain. *Drug Devel Res*, 43:194, 1998.
6. CANO-MARTINEZ A, VILLALOBOS-MOLINA R, ROCHA L: Effects of chronic morphine and  $N^6$ -cyclopentyladenosine administration on kainic acid-induced status epilepticus. *Epilepsy Res*, 44:89-96, 2001.
7. CAPASSO A: Adenosine receptors are involved in the control of acute naloxone-precipitated withdrawal: in vitro evidence. *Life Sci*, 66:873-883, 2000.
8. COGHLAN D, MILNER M, CLARKE T, LAMBERT I, MCDERMOTT C, MCNALLY M, BECKETT M, MATTEWS T: Neonatal abstinence syndrome. *Ir Med J* 92:232-236, 1999.
9. COLLINS S, CARON M, LEFKOWITZ J: From ligand binding to gene expression: new insights into the regulation of G-protein-coupled receptors. *TIBS*, 17:37-39, 1992.
10. EKBLOM A, SEGERDAHL M, SOLLEVI A: Adenosine increase the cutaneous heat pain threshold in healthy volunteers. *Acta Anaesthesiol Scand*, 39:717-722, 1995.
11. ENGLERT M, RONSON A, LOSSINGOLD, BODY J: Terminal medical interventions: psychosocial, medical, ethical and legal aspects. *Rev Med Brux*, 22:93-99, 2001.
12. FUNADA M, NARITA M, SUZUKI T, MIAWA M: Effect of pretreatment with pertussis toxin on the development of physical dependence of morphine. *Nannyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 349:88-95, 1993.
13. FUXE K, FERRE S, ZOLI M, AGNATI L: Integrated events in central dopamine transmission and analyzed at multiple levels. Evidences for intramembrane adenosine  $A_1$ /dopamine  $D_2$  and adenosine  $A_1$ /dopamine  $D_1$  receptor interaction in the basal ganglia. *Brain Res*, 16:258-273, 1998.
14. GLOWINSKI J, IVERSEN L: Regional studies of catecholamines in the rat brain. *J Neurochem*, 13:655-669, 1966.
15. HARRIS G, ASTON-JONES G: Involvement of  $D_2$  dopamine receptors in the nucleus accumbens in the opiate withdrawal syndrome. *Nature*, 371:155-157, 1994.
16. HAYWARD M, DUMAN R, NESTLER E: Induction of the c-fos proto-oncogene during opiate withdrawal in

the locus coeruleus and other regions of rat brain. *Brain Res*, 525:256-266, 1999.

17. IKEMOTO M, OSUGI T, EANG X, TANAKA H, NKANO K, MIKI N: Decrease in CRE binding activity by chronic morphine administration in mouse brain. *Neuroreport*, 6:262-264, 1995.
18. ISSACSON R, LANTHORN T: Hippocampal involvement in the pharmacologic induction of withdrawal-like behaviours. *Fed Proc*, 40:1508-1512, 1981.
19. JARVIS M, BECKER H: Single and repeated episodes of ethanol withdrawal increase adenosine A1 but not A2a, receptor density in mouse brain. *Brain Res*, 786:80-88, 1998.
20. JHAMANADAS K, SUTAK M: Action of enkephalin analogues and morphine on brain acetylcholine release: Differential reversal by naloxone and opiate pentapentide. *Br J Pharmacol*, 71:201-210, 1980.
21. KAPLAN G, LAITE-MORRIS K, SEARS M: Alterations of adenosine A1 receptors in morphine dependence. *Brain Res*, 657:347-350, 1994.
22. KAPLAN G, SEARS M: Adenosine receptor agonists attenuate and adenosine receptor antagonists exacerbate opiate withdrawal signs. *Psychopharmacol (Berl)*, 123:64-70, 1996.
23. KATSURA M, HARA A, HIGO A, CHIHAYA T, HIBINO Y, OHKUMA S: Continuous treatment with morphine increases diazepam binding inhibitor mRNA in mouse brain. *J Neurochem*, 71:2638-2641, 1998.
24. LOWRY O, ROSENBROUGH N, FARR A, RANDALL L: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 3:265-275, 1951.
25. MICHALSKA E, MALEC D: Agonists and antagonists of adenosine receptors and morphine withdrawal syndrome in rats. *Pol J Pharmacol*, 45:1-9, 1993.
26. MUNSON P, RODBARD R: Ligand: a versatile computerized approach for characterization of ligand systems. *Anal Biochem*, 107:883-888, 1989.
27. NESTLER E: Molecular mechanisms of opiate and cocaine addiction. *Curr Opin Neurobiol*, 7:713-719, 1997.
28. NESTLER E, HOPE B, WIDNELL K: Drug addiction: a model for molecular basis of neural plasticity. *Neuron*, 11:995-1006, 1993.
29. OEI J, FELLER JM, LUI K: Coordinate outpatient care of the narcotic-dependent infant. *J Paediatr Child Health*, 37:266-270, 2001.
30. PALMER T, STILES G: Adenosine receptors. *Neuropharmacol*, 34:683-694, 1995.
31. PASTERNAK G: Radioligand binding. *Modern Methods Pharmacol*, 6:1-17, 1990.
32. RASMUSSEN K: Afferent effects on locus coeruleus in opiate withdrawal. *Prog Brain Res*, 88:207-216, 1991.
33. RAYNOR K, KONG H, YASUDA K: Pharmacological characterization of the cloned kappa, delta and mu opioid receptors. *Molecular Pharmacol*, 45:330-334, 1994.
34. REDMOND D, KRISTAL J: Multiple mechanisms of withdrawal from opioid drugs. *Ann Rev Neurosci*, 7:443-478, 1984.
35. ROCHA L, TATSUKAWA K, CHUGANI H, ENGEL JJR: Benzodiazepine receptor binding following chronic treatment with naloxone, morphine and met-enkephalin in normal rats. *Brain Res*, 612:247-252, 1993.
36. SALEM A, HOPE W: Effect of adenosine receptor agonists and antagonists on the expression of opiate withdrawal in rats. *Pharmacol Biochem Behav*, 57:671-679, 1997.
37. SAMUELSSON H, MALMBERG F, ERIKSON M, HEDNER T: Outcomes of epidural morphine treatment in cancer pain, nine years of clinical experience. *J Pain Symptom Manage*, 10:105-112, 1995.
38. SAWYNOK J: Adenosine receptor activation and nociception. *Eur J Pharmacol*, 17:1-11, 1998.
39. SHI D, NIKODIJEVIC O, JACOBSON K, DALY J: Chronic caffeine alters the density of adenosine, cholinergic, GABA and serotonin receptors and calcium channels in mouse brain. *Cell Mol Neurobiol*, 13:247-261, 1993.
40. STANDIFER K, PASTERNAK G: G proteins and opioid receptor-mediated signaling. *Cell Signal*, 9:237-248, 1997.
41. TAO P, LIU C, TSAI H: Chronic intracerebroventricular administration of morphine downregulate spinal adenosine A1 receptors in rats. *Eur J Pharmacol*, 24:233-237, 1995.
42. TRUJILLO K, AKIL H: Inhibition of morphine tolerance and dependence by the NMDA receptor antagonist MK-801. *Science*, 251:85-87, 1991.
43. VON LUBITZ D, PAUL I, JI X, CARTEX M, JACOBSON K: Chronic adenosine A1 receptors agonist and antagonist: effects on receptor density and N-Methyl-A-aspartate induced seizures in mice. *Eur J Pharmacol*, 253:95-99, 1994.
44. ZARRIDAST M, NAGHIPOUR B, ROUSHAN-ZAMIR F, SHAFAGHI B: Effects of adenosine receptor agents on the expression of morphine withdrawal in mice. *Eur J Pharmacol*, 12:17-22, 1999.
45. ZHU H, BARR G: Opiate withdrawal during development: are NMDA receptors indispensable?. *Trends Pharmacol Sci*, 22:404-408, 2001.
46. ZUZUKI T: Pharmacological studies on drug dependence in rodents: dependence on opioid and CNS depressants. *Jpn J Pharmacol*, 52:1-10, 1990.