Universitat Pompeu Fabra

Departament de Ciències Experimentals i de la Salut

Laboratori de Neurofarmacologia

TESIS DOCTORAL:

PARTICIPACIÓN DEL SISTEMA OPIOIDE ENDÓGENO EN LA ADICCIÓN A LA NICOTINA

Memoria presentada por

Lola Galeote González

Para optar al grado de doctor

Barcelona 2008

Fernando Berrendero Díaz, Investigador Ramón y Cajal y Rafael Maldonado López, Catedrático de la Universitat Pompeu Fabra

CERTIFICAN:

Que la presente Tesis Doctoral titulada: "Participación del sistema opioide endógeno en la adicción a la nicotina" presentada por Lola Galeote González, Licenciada en Farmacia, para optar al grado de Doctor por la Universitat Pompeu Fabra, ha sido realizada bajo su dirección y reúne todos los requisitos necesarios para ser juzgada.

Y para que conste, y a efectos oportunos, firman el presente certificado a 31 de octubre de 2008

Fernando Berrendero Díaz Rafael Maldonado López

AGRADECIMIENTOS

Son muchas las personas que de un modo u otro han participado en el desarrollo de este proyecto y a todas ellas les debo estar agradecidas.

En primer lugar agradecerles a mis tutores la confianza depositada en todo momento tanto en mí como en este proyecto.
A Rafa por acogerme en su grupo y por enseñarme todo acerca del mundo de la investigación.
A Fernando por enseñarme a ser paciente con la ciencia y por ser paciente conmigo.

Gracias a todo el laboratorio de neurofarmacología y de neurobiología del comportamiento.
Al "pedazo de cuerpo técnico", a las Neus, a mi "mami", a las Cristinas, a Roberto, Raquel… pero en especial a Dulce, que sin su ayuda este trabajo no hubiese tenido este final. A mis compis predoc, esencia de este grupo: a Clara, Ester, Xevi, Andreea, Emma, Ainhoa, Juliana, Thomas, Aurelius, Laura y Arnau. A los que con suerte ya son doctores, gracias Jose, Miquel y Elena. Gracias Miquel Angel por ser tan buen gestor. A los seniors Andrés, Pato y Blanca. A Olga, por ayudarme siempre tanto y por ser algo más que una compañera. Y a todos los que se fueron, Araceli, Ana, Lupe, Vicky, Murtra, Grace y Flavia y recién llegaron.
Gracias a todos por darme apoyo teórico y moral para poder continuar en esta dura carrera.

A mi familia guarri¡¡¡¡¡¡¡ Al Xevi, Clara, Miquel, Niko, Juliana, Blanca, Emma, Ainhoa, Niko Bellora, Antonio, Thomas, Aurelius, Marta, mi Jimena, mi Ferri…dios somos tantos….ayyy q buenos momentos, nunca olvidaré lo que significa la hora de comer…las risas, las discusiones, los desahogos, los hachazos, el monotema….siempre lo guardaré en la memoria y siempre lo recordaré con gran cariño.
Otra vez a la Fiz, por ser simplemente mi amiga, por entendernos tan bien y por perdonárnoslo todo.
A mi Ferri…. Gracias por ser como eres, por ser mi amigo y por saber que siempre vas a estar ahí. Gracias por apoyarme y ayudarme en todo lo que he hecho.

A mi familia de Barcelona, a mis compis de mi piso Almu y Anais, por que hemos tenido mucha suerte de vivir juntas. Gracias por aguantarme en casa. A mis amigos del barrio¡¡¡ y a los que no son del barrio también¡¡¡ A Isa, a Fali, a Lucia y Luci, a Santi, a Olmo, a Pablo, a Susi, a Chiri y a los que ya se fueron, al Mahue, Elena, Pau y Marta. Barcelona sin todos vosotros no vale la pena. Ha sido un placer conoceros y os guardo siempre bien dentro. Gracias Santo por la pedazo de portada, ha quedado perfecta. Eres un artista¡¡.
Gracias a Bea y Lupe por aguantar hasta el último momento la incertidumbre del viaje. Me gusta que hagamos proyectos juntas. Me da vida.
A mi "compañía platanera" y a Marina. Saber que por las tardes iba a estar con vosotras me daba fuerza y alegría para escribir durante el día. El trapecio y vosotras ha sido la mejor terapia que se puede tener. Me siento orgullosa de lo que hemos creado, os quiero un montón¡¡¡¡

A Teresa, Luisa y Raquel. Por que la distancia podría haber sido un impedimento a la amistad, pero no lo ha sido. Por que siempre puedo contar con vosotras y eso es un alivio.

A Virginia por ser mi amiga, por los años vividos juntas. Por hacerme reflexionar siempre y por no enfadarte nunca.

A Samu, por que eres lo más bonito que me ha pasado nunca, me has enseñado mucho, a que las cosas no son tan importante, a tomarme la vida de mejor forma y eso vale oro. Gracias por ser tan paciente conmigo. Gracias por haberme dado los mejores años.

A mi Familia. A mis abuelitos por estar siempre tan orgullosos de mí. Por haberme criado y apoyado en todo. A la Malle y al Nino por ser los mejores tíos que se puede tener¡¡¡ A mi padre por haber aguantado tantas tonterías. A Ana y Aurora por ser mis niñas. Porque Casa sin vosotras sería muy aburrida jaja¡¡¡¡ y a mi madre, por ser mi referencia, porque soy como soy por lo que tú me has enseñado, y eso me gusta. Por decirme siempre "tú sola puedes", y al final lo he conseguido. Por que os quiero mucho a todos y sin vosotros yo no soy nada.

A mi Familia
A Samu

Juegas las cartas que te dá el momento
mañana es sólo un adverbio de tiempo

Joan Manuel Serrat

Índice

Abreviaturas

INTRODUCCIÓN

1. Adicción
    1.1. Definición de adicción 3
    1.2. Factores que influyen en el abuso y dependencia de drogas 4
        1.2.1. Factores biológicos 4
            1.2.1.1. Edad de comienzo 4
            1.2.1.2. Factores genéticos y epigenéticos 5
            1.2.1.3. Trastornos psiquiátricos y de personalidad 6
            1.2.1.4. Diferencias de género 6
        1.2.2. Factores ambientales 7
        1.2.3. Propiedades farmacológicas de las drogas 8
    1.3. Modelos experimentales para el estudio de la adicción 8
        1.3.1. Condicionamiento espacial 9
        1.3.2. Condicionamiento operante o instrumental: autoadministración intravenosa 9
        1.3.3. Autoestimulación intracraneal 10
    1.4. Fases de la adicción 11
        1.4.1. Consumo agudo: efectos reforzantes 12
        1.4.2. Consumo crónico 14
            1.3.2.1. Fenómenos de sensibilización 15
            1.3.2.2. Fenómenos de tolerancia 16
        1.4.3. Abstinencia aguda 18
        1.4.4. Abstinencia a largo plazo: Recaída al proceso adictivo 19
            1.4.4.1. Recaída por nuevo contacto con la droga 20
            1.4.4.2. Recaída por estímulos asociados al consumo de la droga 21
            1.4.4.3. Recaída por estrés 22
    1.5. Teorías de la adicción 23
        1.5.1. Teoría de la sensibilización del incentivo

(Robinson y Berridge, 1993) 23
1.5.2. Teoría motivacional de la adicción: neuroadaptación y alostasis (Koob y Le Moal, 1997) 24

2. Nicotina
2.1. Características generales 28
2.2. Mecanismos de acción 28
2.2.1. Receptores Nicotínicos 28
2.2.1.1. Clasificación y estructura 31
2.2.1.2. Distribución en el organismo 31
2.2.1.3. Procesos fisiológicos en los que intervienen 34
2.3. Acciones farmacológicas de la nicotina 36
2.3.1. Efectos sobre los procesos cognitivos 36
2.3.2. Efectos sobre la ansiedad 37
2.3.3. Efecto sobre la actividad locomotora 37
2.3.4. Efectos antinociceptivos 38
2.3.5. Efectos sobre enfermedades neurológicas psiquiátricas 40
2.3.6. Propiedades adictivas de la nicotina 41
2.3.6.1. Consumo agudo: efectos reforzantes agudos 41
2.3.6.2. Consumo crónico 45
2.3.6.2.1. Fenómenos de sensibilización 45
2.3.6.2.2. Fenómenos de tolerancia 45
2.3.6.3. Abstinencia aguda 47
2.3.6.4. Abstinencia a largo plazo: recaída al proceso adictivo 48

3. Participación del sistema opioide en los efectos farmacológicos de la nicotina
3.1. Sistema opioide endógeno 50
3.1.1. Receptores opioides y sus ligandos 50
3.1.1.1. Clasificación y estructura 50
3.1.1.2. Distribución en el organismo 51
3.1.1.3. Ligandos endógenos 54
3.1.1.4. Ligandos exógenos 55

3.1.2. Procesos fisiológicos y fisiopatológicos en los que participa el sistema opioide 55
3.1.2.1. Control del dolor 56
3.1.2.2. Motivación y refuerzo inducido por drogas 58
3.2. Interacción nicotina-sistema opioide endógeno 62
3.2.1. Efectos sobre la ansiedad 63
3.2.2. Efectos sobre la actividad locomotora 63
3.2.3. Efectos antinociceptivos 64
3.2.4. Efectos en la tolerancia antinociceptiva 64
3.2.5. Efectos reforzantes 65
3.2.6. Efectos en la abstinencia de la nicotina 66

OBJETIVOS

Objetivos generales 71
Objetivos específicos 71

RESULTADOS

Artículo 1: "Berrendero y cols., 2005. Nicotine-induced antinociception, rewarding effects, and physical dependence are decreased in mice lacking the preproenkephalin gene. *Journal of Neuroscience*. 25(5):1103-12" F.I: 7.49 75

Artículo 2: "Galeote y cols., 2008. δ-opioid receptors participate in the rewarding effects of nicotine. (en preparación)" 87

Artículo 3: "Galeote y cols., 2008. Prodynorphin gene disruption increases the sensitivity to nicotine self-administration in mice. *The International Journal of Neuropsychopharmacology*. (en prensa)" F.I: 4.89 113

Artículo 4: "Galeote y cols., 2006. Mu-opioid receptors are involved in the tolerance to nicotine antinociception. *Journal of Neurochemistry*. 97(2):416-23" F.I: 4.45 127

Artículo 5: "Galeote y cols., 2008. Involvement of kappa/dynorphin system in the development of tolerance to nicotine-induced antinociception. *Journal of Neurochemistry*. 105(4):1358-68" F.I: 4.45 137

Articulo 6: "Martín-Garcia y cols., 2008. New operant model of nicotine-seeking behavior in mice. *The International Journal of Neuropsychopharmacology.* (en prensa)" F.I: 4.89 151

DISCUSIÓN 169

CONCLUSIONES 195

REFERENCIAS 199

Abreviaturas

AEIC	Autoestimulación intracraneal
AMPc	Adenosina-5-aminofosfato cíclico
ATV	Área tegmental ventral
AUC	Área bajo la curva
CRF	Factor de liberación de corticotropina
DA	Dopamina
GABA	Ácido γ-aminobutírico
Nac	Núcleo accumbens
nAChRs	Receptores nicotínicos de acetilcolina
nor-BNI	Nor-binaltorfimina
PDYN	Prodinorfina
PENK	Proencefalina
PKA	Proteína quinasa A
POMC	Péptidos derivados de la propiomelanocortina
SNC	Sistema nervioso central
α- Bgt	α- Bugarotoxina

Introducción

1. Adicción

1.1. Definición de adicción

En la última edición de DSM-IV (Manual diagnóstico y estadístico de los trastornos mentales de la Asociación Psiquiátrica de Estados Unidos) los términos dependencia y adicción se utilizan de manera indistinta. En la presente Tesis Doctoral se usarán ambos vocablos siguiendo la terminología de dicho manual.

Tres tipos de consumo de drogas han sido definidos: (1) ocasional, controlado o uso social, (2) abuso o uso perjudicial y (3) adicción a una sustancia. Las actuales investigaciones se focalizan en entender los cambios celulares y moleculares que median la transición desde un uso ocasional a la pérdida de control sobre la búsqueda y toma de una droga que caracteriza a la drogadicción (Koob y Le Moal, 1997).

La adicción se define como un trastorno crónico y recidivante de la conducta que se caracteriza por (1) la búsqueda y consumo compulsivo de la droga, (2) pérdida del control para limitar el consumo a pesar de las consecuencias negativas para el sujeto y (3) aparición de un estado emocional negativo (disforia, irritabilidad, ansiedad) cuando no se tiene acceso a la droga que lleva a la recaída repetitiva en el consumo incluso tras largos periodos de abstinencia (Koob y Le Moal, 1997).

La adicción conlleva a la necesidad imperiosa o compulsiva de consumir una droga para experimentar la sensación de placer y euforia derivada de su uso (refuerzo positivo). Por tanto, las drogas producen adicción reforzando la conducta asociada a su uso, y este efecto reforzante positivo se considera básico para el inicio de la adicción a cualquier sustancia. Este refuerzo de la conducta se basa en un aprendizaje tanto pauloviano como instrumental, y los estímulos asociados al consumo juegan un papel fundamental en el mantenimiento de la conducta. Por otra parte, el cese del consumo de la droga induce un estado de abstinencia que se caracteriza por síntomas emocionales que pueden ir acompañados de alteraciones físicas de duración variable. Evitar las consecuencias negativas de la abstinencia es otra causa de búsqueda y recaída en el consumo de la droga (refuerzo negativo). De hecho, este proceso se considera de gran importancia para el mantenimiento del

proceso adictivo. Según el DSM-IV, para diagnosticar la dependencia a una sustancia deben darse al menos tres de los siguientes criterios:

1. Síntomas de tolerancia (disminución progresiva de los efectos).
2. Síntomas de abstinencia.
3. Consumo de una sustancia en mayores cantidades o durante periodos de tiempo más largos de lo previsto.
4. Deseo persistente o intentos fallidos de reducir o controlar el consumo.
5. Emplear una cantidad de tiempo considerable intentando conseguir la sustancia.
6. La reducción de actividades sociales, laborales, o de ocio importantes debido al consumo de la droga.
7. Consumo continuado de la sustancia a pesar de los problemas de salud, sociales o económicos que genera su toma.

1.2. Factores que influyen en el abuso y dependencia de drogas

Las investigaciones enfocadas en determinar los factores involucrados en la adicción a las drogas postulan que la iniciación al abuso de drogas se asocia a factores ambientales y sociales, mientras que el paso del abuso a la adicción está más relacionado con factores genéticos y disfunciones neurobiológicas (Glanzt y Pickens, 1992). Los principales factores que favorecen el consumo de drogas se clasifican en: (1) factores biológicos, (2) factores ambientales y (3) factores relacionados con las propiedades farmacológicas de las drogas.

1.2.1. Factores biológicos

1.2.1.1. Edad de comienzo

Se ha postulado que el consumo de drogas durante la adolescencia aumenta de forma significativa la vulnerabilidad al desarrollo de la adicción en etapas adultas. Así, en el caso de la adicción al tabaco, personas que fumaron su primer cigarrillo entre los 14-16 años de edad son 1.6 veces más vulnerables para el desarrollo de una dependencia frente a aquellos que comenzaron a fumar a una edad más tardía (Breslau y cols., 1993). También la edad de comienzo influye en la cantidad de años

expuestos al consumo de tabaco (Escobedo y cols., 1993), en la probabilidad de deshabituarse (Ershler y cols., 1989) y en la cantidad de cigarrillos fumados por día (Everett y cols., 1999).

1.2.1.2. Factores genéticos y epigenéticos

Múltiples estudios han descrito la asociación de determinados polimorfismos o características genéticas con una mayor incidencia al desarrollo de un proceso adictivo (Ugedo y Ruiz, 2000). El ejemplo más clásico es el polimorfismo en el gen de la enzima alcohol-deshidrogenada ADH1B (comúnmente llamado ADH2) y en el gen de la enzima aldehído-deshidrogenada ALDH2, ambos encontrados casi exclusivamente en la población asiática. Así, una isoforma con actividad reducida de la enzima ADH2 se asocia a un consumo excesivo de alcohol, mientras que la variante inactiva de la ALDH2 se relaciona con un menor consumo del mismo (Wall y cols., 2007). Otros polimorfismos relacionados con las drogodependencias son los encontrados en el sistema dopaminérgico. La presencia del alelo A1 del polimorfismo TaqI del receptor dopaminérgico D2 está asociado con la dependencia de nicotina (Li, 2006). En relación también a ésta, encontramos que el polimorfismo en el receptor opioide μ, A118G OPRM1, está implicado en el consumo de tabaco, las recaídas e incluso en la eficacia de las terapias de reemplazo nicotínica (Li, 2006; Munafo y cols., 2007). Por otro lado, una variante genética en el receptor cannabinoide CB1 está asociado con la adicción a diversas drogas como el alcohol y la nicotina (Chen y cols., 2008). Estudios clínicos realizados en gemelos monocigóticos han permitido estimar que entre el 40% y el 60% de la vulnerabilidad al abuso de drogas puede ser atribuible a factores genéticos. Es sabido que los hijos de padres alcohólicos tienen una mayor probabilidad de ser también alcohólicos, incluso en el caso de haber sido adoptados y criados por padres no adictos (Cami y Farre, 2003). Por lo tanto, la existencia de factores genéticos no implica que una dependencia sea un trastorno hereditario sino que diversos rasgos heredables como son la sensibilidad a una sustancia, el metabolismo particular de la droga o la preferencia por una sustancia específica, son factores de riesgo o de protección frente a una determinada adicción (Ugedo y Ruiz, 2000). Además de estas alteraciones biológicas, se ha descrito la existencia de una clara contribución de los factores ambientales sobre la genética de los individuos. Por ejemplo, la dieta alimentaria de un individuo puede

contener inductores o inhibidores del citocromo que metaboliza a la nicotina, el CYP2A6, pudiendo modificar el patrón de consumo de la droga (Wall y cols., 2007).

1.2.1.3. Trastornos psiquiátricos y de personalidad

Los trastornos psiquiátricos y de personalidad son factores condicionantes en la adicción a las drogas. Rasgos de la personalidad y del temperamento como la desinhibición, el gusto por el riesgo o la búsqueda de nuevas experiencias favorecen el consumo de drogas. Trastornos psiquiátricos tales como la esquizofrenia, la ansiedad, el trastorno bipolar, la depresión y el trastorno de falta de atención e hiperactividad, se consideran igualmente como factores de riesgo a sufrir una adicción (Cami y Farre, 2003). Desde la perspectiva de cormobilidad psiquiátrica, una hipótesis ha considerado la drogadicción como un intento de "automedicar" ese estado afectivo perturbado (Khantzian, 1985) *(Hipótesis de la automedicación)*. Según esta particular hipótesis, este supuesto "autotratamiento" parece ser droga-específica, de tal forma que los individuos tienen un uso preferencial por aquella droga que se ajusta más al trastorno que padecen. Así, los adictos a la cocaína buscan en ella aumentar su grado de autoestima, tener una mayor tolerancia a la frustración y menos sentimientos de aburrimiento y vacío. Las carencias de un individuo en áreas de su funcionamiento vital (vida afectiva, autoestima, relaciones y autocuidado) podrían explicar la posible vulnerabilidad de estos individuos al efecto de una determinada droga. Sin embargo, es evidente que no todas las personas con problemas psicológicos o personales se inician en el mundo de la adicción. Además, la hipótesis de la automedicación es hoy en día muy criticada y no resuelve la gran paradoja de que a la larga el consumo de una droga puede perpetuar el problema que inicialmente indujo al consumo de la misma (Koob y Le Moal, 2006).

1.2.1.4. Diferencias de género

Aunque no es considerado como un factor causal ni de riesgo en la adicción a las drogas, es una variable que puede modificar el patrón de consumo de una sustancia. Las diferencias existentes entre géneros en la adicción son muy similares en todas las drogas de abuso, con pequeñas diferencias entre algunas de ellas. Según el Plan Nacional sobre Drogas (2006-2007) no hay variaciones significativas

de la edad de inicio en el consumo por sexo (DGPNSD, 2006). Sin embargo, las mujeres buscan terapia para dejar de consumir drogas antes que los hombres (Becker y Hu, 2008). Aunque el sexo femenino comienza consumiendo menor cantidad de droga, la evolución de este consumo se realiza más rápidamente llegando a ser dependiente de una sustancia antes que los hombres (Becker y Hu, 2008). Asimismo, las mujeres suelen presentar más problemas para dejar de consumir una droga y recaen con mayor probabilidad tras un periodo de abstinencia (Becker y Hu, 2008; Pauly, 2008). Con respecto a las propiedades reforzantes de las drogas, se ha sugerido que las mujeres son menos sensibles a los efectos reforzantes de la nicotina pero más vulnerables a los factores no nicotínicos de la adicción al tabaco (Perkins y cols., 2006).

1.2.2. Factores ambientales

El fenómeno de las drogas ha experimentado en los últimos años un profundo proceso de transformación, en paralelo a la evolución de las sociedades desarrolladas. En estas sociedades, actualmente, las drogas están vinculadas a la cultura del ocio, a diferencia de lo que sucedía en los años 80, cuando el consumo de drogas, fundamentalmente de heroína, estaba asociado a la marginalidad y a la delincuencia. La heroína ha sido sustituida por sustancias como el cannabis, la cocaína o el éxtasis, combinadas entre sí o mezcladas con alcohol y tabaco. Este cambio de las sustancias también ha ido acompañado de nuevos patrones de consumo. Estamos ante consumidores cada vez más jóvenes, perfectamente integrados en la sociedad, que consumen con fines recreativos y socializantes. Uno de los primeros elementos de riesgo es la propia presencia de las drogas en el entorno, es decir, su accesibilidad, su visibilidad y su disponibilidad. La existencia de un entorno social donde el tráfico de sustancias sea visible facilita el acceso de los menores al consumo. Algunos valores como vivir al día y la búsqueda de placer a toda costa, prevalentes en la sociedad actual, suponen un factor adicional de riesgo. El consumo de drogas por parte de los padres, o situaciones de conflictividad familiar, donde la ausencia de habilidades educativas está presente, pueden ser elementos que favorezcan el consumo de drogas en los hijos. Además, la necesidad de sentirse integrado en el grupo y la falta de habilidades para resistir a las presiones de los amigos, son algunos de los elementos que favorecen la

experimentación con las drogas. La disponibilidad económica y la ausencia de normas se han mostrado también como factores de riesgo (DGPNSD, 2007).

1.2.3. Propiedades farmacológicas de las drogas

Las propiedades farmacológicas de las drogas se han dividido clásicamente en propiedades farmacodinámicas y farmacocinéticas.

-Propiedades farmacodinámicas: Las propiedades intrínsecas del compuesto son factores importantes para determinar el potencial de adicción de una droga. Así, las propiedades reforzantes de las drogas van a ser factores determinantes de la posibilidad de abuso, la cual aumenta en el caso de las sustancias más euforizantes tales como la cocaína.

-Propiedades farmacocinéticas: Algunas características como la rapidez y la intensidad con la que comienzan los efectos farmacológicos de una droga aumentan el potencial de abuso de la misma. En este sentido, una mayor liposolubilidad aumenta el paso a través de la barrera hematoencefálica. En general, las vías de administración que permiten la llegada rápida de la sustancia al cerebro favorecen al potencial adictivo de la misma. Por ejemplo, el tabaco consumido en forma de cigarrillo, en comparación con el tabaco de mascar, favorece que la nicotina llegue más fácilmente al cerebro aumentando su potencial adictivo. Por otro lado, si una sustancia se elimina rápidamente o sus efectos desaparecen bruscamente, la abstinencia se manifiesta de manera más rápida, lo cual obligará a una administración más repetida. Es el caso de la heroína que posee una semivida corta y, por tanto, produce síntomas de abstinencia más abruptos e intensos que la metadona la cual posee una semivida larga (Baños y Farre, 2002; Cami y Farre, 2003).

1.3. Modelos experimentales para el estudio de la adicción

A pesar de que no existe ningún modelo animal que explique por completo el proceso adictivo tal y como se desarrolla en humanos, los modelos que a continuación describimos son válidos para investigar acerca de los elementos específicos que forman parte de dicho proceso.

1.3.1. Condicionamiento espacial

Este modelo consta de al menos dos compartimentos neutros, pero diferentes entre sí, que los animales deben explorar. Tras el condicionamiento con la droga, al animal se le ofrece la oportunidad de elegir entre los dos compartimentos. El tiempo que el animal pasa en el compartimento asociado a la droga es un índice indirecto del valor reforzante de dicha droga. El animal expresará preferencia por aquel contexto donde ha experimentado un refuerzo positivo (preferencia de plaza condicionada) y evitará aquel contexto que le induzca un estado aversivo (aversión de plaza condicionada). Así, este modelo nos proporciona una herramienta de gran interés para evaluar el condicionamiento que ejerce una droga reforzante y nos da información indirecta sobre los posibles efectos placenteros o disfóricos inducidos por las mismas (Carboni y Vacca, 2003).

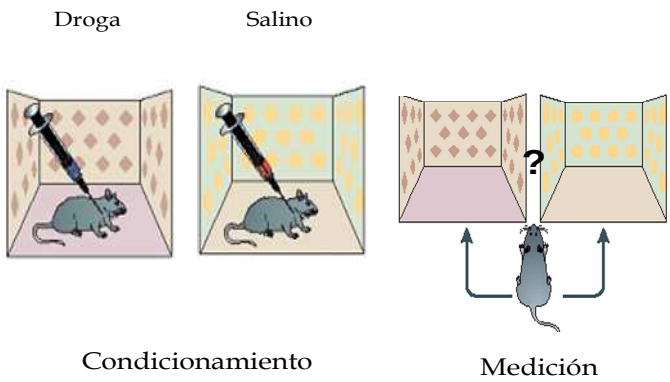


Figura 1. Modelo de condicionamiento espacial para el estudio de los efectos reforzantes de una droga.

1.3.2. Autoadministración intravenosa (condicionamiento operante)

La base fundamental de este paradigma es la noción de contingencia entre la respuesta que se solicita al animal (accionar una palanca, introducir el hocico en un agujero) y el refuerzo que recibe como consecuencia de la misma. Este método es una variación de la original "caja de Skinner" donde hay dos manipulandos (p.e.: palanca u orificio) de tal forma que la respuesta en el manipulando activo conduce de manera directa a la liberación de una infusión intravenosa de droga (refuerzo), y la respuesta en el manipulando inactivo no tiene ninguna consecuencia. De este modo cuando una situación reforzante (los efectos de la droga) es contingente con

una respuesta, la probabilidad de que aparezca dicha conducta aumenta (Skiner, 1938). Mediante este paradigma podemos determinar la motivación que manifiesta un animal por la droga utilizando los protocolos de razón progresiva. Estos protocolos consisten en aumentar progresivamente en una misma sesión el número de respuestas requeridas para la obtención de cada infusión. Este paradigma no sólo nos permite evaluar la eficacia reforzante de una droga y la motivación que siente el animal por ella, sino también los diferentes procesos implicados en la conducta adictiva como son la adquisición, el mantenimiento, la extinción y la recaída.

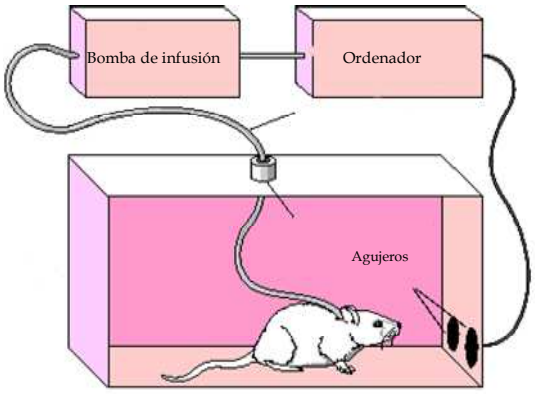


Figura 2. Modelo de autoadministración intravenosa para el estudio de los efectos reforzantes de una droga.

1.3.3. Autoestimulación intracraneal (condicionamiento operante)

La autoestimulación intracraneal (AEIC) es una técnica que consiste en observar la conducta derivada de aplicar una estimulación eléctrica a través de unos electrodos que han sido implantados en estructuras cerebrales específicas. El animal realiza una conducta operante (girar una rueda, accionar una palanca) para recibir la estimulación eléctrica allí donde el electrodo ha sido implantado. Así, cuando dicha estimulación provoca un efecto positivo o placentero, la probabilidad de realizar una conducta operante aumenta. El nivel más bajo requerido para motivar al animal a que realice la conducta operante asociada a la estimulación eléctrica es el "umbral de autoestimulación" (figura 3). La AEIC en el haz prosencefálico medial activa de forma directa los circuitos neuronales relacionados con los refuerzos naturales (p.e.: comida, agua, sexo) y con las drogas de abuso.

Por tanto, mediante este procedimiento podemos evaluar los efectos reforzantes de las drogas. Un tratamiento con drogas de abuso disminuye el umbral de autoestimulación lo que implica un aumento del estado hedónico del animal que demuestra las propiedades reforzantes de la droga. Cuando el tratamiento es crónico el "umbral de placer" se modifica reflejando un cambio en el punto de equilibrio hedónico (Ahmed y Koob, 1998). La AEIC es utilizada también para evaluar la abstinencia emocional negativa de una droga de abuso. Así, cuando el animal siente los efectos disfóricos de un estado de abstinencia de drogas, el umbral de placer aumenta progresivamente, se elevan los umbrales de AEIC, lo que se corresponde con una disminución del estado hedónico del animal (Koob y Le Moal, 2006). Por lo tanto este paradigma, al igual que el modelo de autoadministración intravenosa, es un procedimiento válido para predecir el potencial de abuso de las droga en humanos (Kornetsky y Bain, 1992).

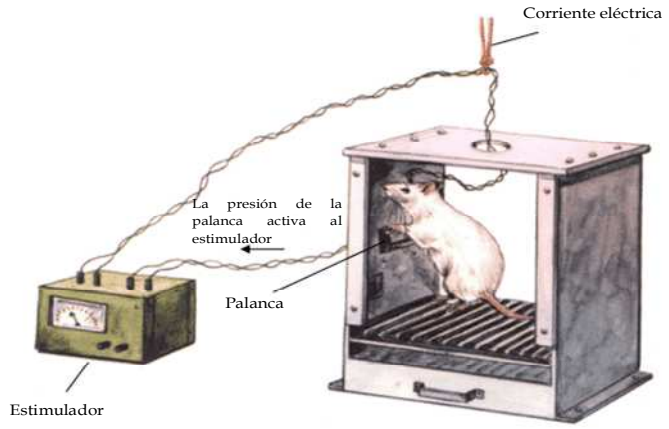


Figura 3. Modelo de autoestimulación intracraneal para el estudio de los efectos reforzantes de una droga.

1.4. Fases de la adicción

A continuación se resumirán las características generales de las diferentes fases que constituyen el proceso adictivo. Se han estipulado cuatro grandes fases de este proceso: estado de consumo agudo, estado de consumo crónico, abstinencia aguda y abstinencia a largo plazo (Nestler y Aghajanian, 1997).

1.4.1. Consumo agudo: efectos reforzantes

El consumo agudo se refiere a los primeros contactos con la droga, a través de los cuales se establece el conocimiento de sus efectos placenteros y el aprendizaje tendente a su consumo. Aunque las drogas adictivas presentan una gran diversidad respecto a sus mecanismos de acción, todas ellas tienen en común que son capaces de producir efectos reforzantes. Dichos efectos son debidos a la activación de la vía mesocorticolímbica dopaminérgica, la cual constituye el sistema de refuerzo del organismo y es crítica en la iniciación del proceso de adicción. Los cuerpos neuronales de esta vía cerebral están presentes en el área tegmental ventral (ATV) proyectando a centros límbicos y corticales tales como el núcleo accumbens (Nac), la amígdala incluyendo las estructuras de la amígdala extendida y la corteza prefrontal, entre otros. Su activación durante el consumo agudo induce el incremento en la tasa de liberación de dopamina (DA) en el Nac, aumento que se ha relacionado con los efectos reforzantes inducidos por todas las drogas de abuso (Pontieri y cols., 1996).

Aunque el sistema de transmisión dopaminérgico es esencial en la mediación del efecto reforzante, no es el único implicado en dicho efecto. Así, se ha observado que tanto el sistema endocannabinoide como el opioide endógeno participan modulando el efecto reforzante primario de las drogas de abuso. En el apartado 3.1.2.2 de esta introducción explicaremos el mecanismo por el cual el sistema opioide endógeno modula los efectos reforzantes de las drogas de abuso. Estudios focalizados en el sistema endocannabinoide han demostrado que este sistema endógeno regula los efectos reforzantes primarios de drogas como los cannabinoides, los opioides, la nicotina y el alcohol. Sin embargo, no participa de manera directa en los efectos reforzantes primarios de los psicoestimulantes. El origen de esta diferencia radica en los diferentes mecanismos de acción de dichas drogas. Así, para que se produzca la liberación de endocannabinoides y su consiguiente unión a los receptores CB1 es necesaria la despolarización de las neuronas dopaminérgicas. Los receptores CB1 se expresan en los terminales presinápticos de las neuronas GABAérgicas y glutamatérgicas del ATV modulando la activación de la neurona dopaminérgica que proyecta al Nac. Drogas tales como opiáceos, nicotina, cannabinoides o alcohol actúan en el ATV despolarizando las neuronas dopaminérgicas. Sin embargo, los psicoestimulantes

actúan directamente en la recaptación de DA en el Nac sin interferir en la activación de los receptores CB1 a nivel del ATV (Maldonado y cols., 2006).

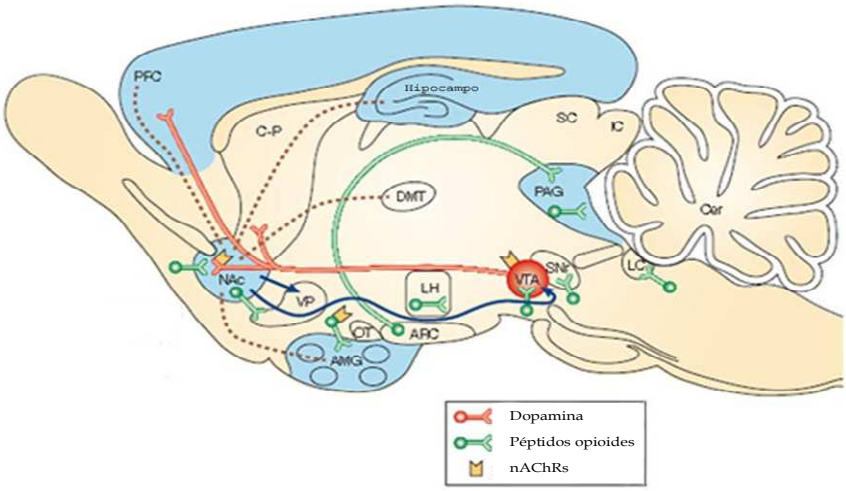


Figura 4. Circuito neuronal del sistema de refuerzo cerebral. Líneas de puntos indican las aferencias límbicas al Nac. Líneas azules representan eferencias desde el Nac. Líneas rojas muestran las proyecciones dopaminérgicas del sistema dopaminérgico mesolímbico-cortical. Líneas verdes indican neuronas que contienen péptidos opioides. Éstos incluyen el circuito local de las encefalinas (segmentos cortos) y el circuito de la β-endorfina del cerebro medio-hipotalámico (segmento largo). Sombras azules indican la distribución de los receptores GABAa. Estructuras amarillas representan los nAChRs supuestamente localizados en neuronas dopaminérgicas y neuronas que contienen péptidos opioides. Abreviaturas: ARC: núcleo arcuato; CER: cerebelo; DMT: tálamo dorso-medial; IC: colículo inferior; Nac: Núcleo accumbens; SNr: sustancia negra pars reticulata; VP: pálido ventral; VTA: área tegmental ventral (modificado de Nestler, 2001).

Por último, otro sistema relacionado con el efecto reforzante agudo de las drogas de abuso es el circuito del estrés. La administración aguda de drogas estimula el eje hipotálamo-hipofisario adrenal aumentando los niveles de corticoesteroides circulantes (Wilkins y cols., 1982; Sarnyai y cols., 2001). Se ha postulado que el estrés puede facilitar la toma inicial de las drogas, quizás por el aumento de las propiedades reforzantes de las mismas asociado al incremento de la tasa de liberación de DA en el Nac (Piazza y Le, 1998). Además, como se describirá más adelante, el estrés juega un papel fundamental en la fase de abstinencia y en la recaída al proceso adictivo.

1.4.2. Consumo crónico

Durante el consumo crónico tienen lugar fenómenos plásticos en el cerebro debidos a una reacción del organismo para adaptarse a la presencia de la droga con el objeto de retomar la homeostasis o equilibrio orgánico fundamental para la vida.

La vía mesocorticolímbica dopaminérgica participa a nivel fisiológico en la creación de hábitos de conducta tras reforzadores naturales como son la comida, la ingesta hídrica o el sexo modulando el circuito córtico-estriado-palidal donde se generan los patrones motores. Este circuito incluye la corteza prefrontal, Nac, estriado dorsal y globo pálido (figura 5) (Koob y Le Moal, 2006). Como hemos comentado anteriormente, la administración aguda de drogas aumenta los niveles de DA en los centros de las vías que nacen en el ATV. Sin embargo, cuando la administración de la droga se convierte en crónica aparecen fenómenos de plasticidad sináptica en las neuronas dopaminérgicas tanto del estriado dorsal como ventral. En estas áreas se producen fenómenos de potenciación a largo plazo y depresión a largo plazo relacionados con el aprendizaje motor y que podrían consolidar los hábitos motores patológicos (Hyman y Malenka, 2001; Mansvelder y McGehee, 2002)..

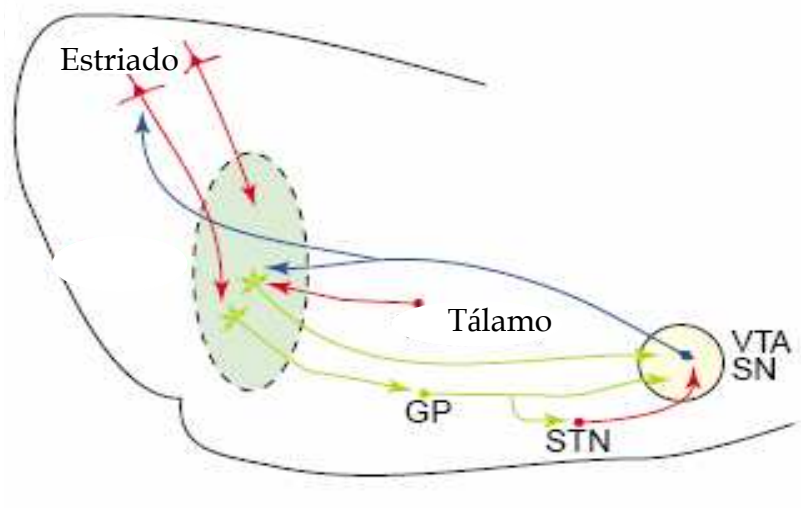


Figura 5. Representación esquemática de los sistemas de transmisión implicados en la vía córtico-estriato-palidal. Líneas rojas muestran proyecciones glutamatérgicas; Líneas verdes muestran proyecciones GABAérgicas; Líneas azules revelan proyecciones dopaminérgicas. GP: globo pálido; STN: núcleo sub-talámico; VTA: área tegmental ventral; SN: sustancia negra (modificado de Gerdeman y cols., 2003).

Estos procesos de plasticidad sináptica son considerados como un paso inicial fundamental en la adicción (Everitt y Wolf, 2002) ya que contribuyen al deseo, el consumo y la búsqueda de la droga (Hyman y Malenka, 2001).

Aparte de los fenómenos de plasticidad sináptica, las drogas producen una señal dopaminérgica excesiva y distorsionada en la corteza prefrontal, más concretamente en la región orbito-frontal, zona donde se integra la información emocional y motivacional. Se ha hipotetizado que esta distorsión producida por las drogas modifica el control de los comportamientos produciendo adaptaciones patológicas como la sobrevaloración del valor de las drogas frente a otros estímulos. Se ha observado en animales de experimentación que la destrucción de la corteza prefrontal facilita la búsqueda compulsiva de la droga (Weissenborn y cols., 1997). Además, en adictos a la cocaína y anfetaminas existe una hipoactividad prefrontocortical (Volkow y Fowler, 2000). Por lo tanto, la corteza prefrontal juega un papel decisivo tanto en la formación de hábitos patológicos en el adicto, debido a una interacción con el estriado dorsal que generaría hábitos de consumo anómalos, como en el mantenimiento de los mismos. (Kalivas y cols., 2005; Hyman y cols., 2006).

Dos fenómenos son comunes al consumo crónico de una droga: *fenómenos de sensibilización* y *fenómenos de tolerancia*. La sensibilización hace referencia al progresivo aumento en la respuesta comportamental que induce una droga tras su administración crónica mientras que la tolerancia es la pérdida de efecto que se produce cuando la droga se administra de manera crónica. La aparición de uno u otro fenómeno dependerá del efecto farmacológico analizado así como del régimen de administración. Si una droga se administra intermitentemente, será el fenómeno de sensibilización el más común, mientras que si se administra de manera continua predomina el fenómeno de tolerancia (Dougherty, Jr. y Ellinwood, Jr., 1981).

1.4.2.1. Fenómenos de Sensibilización

El fenómeno de sensibilización se define como un incremento progresivo de los efectos conductuales y de recompensa de una droga (*sensibilización conductual*) tras el consumo crónico de la misma (Kolta y cols., 1985; Kalivas y Duffy, 1993; De Vries y cols., 1998). Aparte del proceso de *sensibilización conductual*, hay un fenómeno paralelo a este, la *sensibilización dopaminérgica,* que no es más que el

incremento de la liberación de DA en el Nac tras el consumo repetido de una droga (Shippenberg y Elmer, 1998; Di Chiara y cols., 1999).

El efecto farmacológico más estudiado en animales de experimentación para demostrar el fenómeno de sensibilización es la respuesta locomotora (*sensibilización psicomotora*) (Itzhak y Martin, 1999). Esta *sensibilización psicomotora* ha sido demostrada con drogas tales como los psicoestimulantes (Dougherty, Jr. y Ellinwood, Jr., 1981; Hyman y cols., 2006), los opiáceos (Vezina y cols., 1987), la nicotina (Yoo y cols., 2004) y el THC (Rubino y cols., 2001). Como hemos comentado anteriormente, animales sensibilizados a los efectos locomotores también se encuentran sensibilizados a los efectos de recompensa y placenteros de las drogas. Dado el carácter persistente de estos fenómenos, se plantea un paralelismo entre la sensibilización conductual, los cambios neuroadaptativos en el sistema mesolímbico dopaminérgico y el deseo persistente hacia la droga (*craving*) que se desarrolla durante la abstinencia y que perdura incluso durante años tras la misma (Vanderschuren y cols., 1999). Teorías como la propuesta por Robinson y Berridge (1993) (ver apartado 1.5.1) sugieren que la sensibilización es un paso fundamental hacia la adicción y la recaída debido a que la sensibilización neuroquímica aumenta de manera selectiva la búsqueda de la droga o "wanting". Además, los estímulos asociados con el consumo de la droga, los cuales representan un factor importante en los procesos de recaída, también pueden sufrir un proceso de sensibilización. Por lo tanto, a través de un modelo de sensibilización psicomotora se podría valorar de manera indirecta la capacidad de la droga para producir abuso y recaída tras un periodo de abstinencia.

1.4.2.2. Fenómenos de Tolerancia

La tolerancia se define como el aumento de la dosis de la droga necesario para mantener un efecto estable e igual al inicial (Nestler y Aghajanian, 1997). Existen dos tipos de tolerancia: (1) farmacocinética y (2) farmacodinámica. La tolerancia farmacocinética es debida a una reducción de la cantidad de la droga en el organismo como consecuencia de una modificación de su metabolismo. La tolerancia farmacodinámica es debida a una disminución de la cantidad de receptores o de la sensibilidad de los mismos. También esta tolerancia se puede producir como consecuencia de la activación de sistemas biológicos que se oponen a las acciones farmacológicas de la droga. Aunque el metabolismo de la droga

puede estar modificado en animales tolerantes, la tolerancia farmacodinámica durante los procesos adictivos es más frecuente (Koob y Le Moal, 2006).

En relación al proceso adictivo, se considera que la tolerancia es una consecuencia directa de los intentos del organismo para compensar la inusual condición de presencia continua de la droga. Este proceso de tolerancia puede jugar un papel en el desarrollo y mantenimiento de la dependencia de drogas de abuso. El fenómeno de tolerancia se puede desarrollar para determinados efectos específicos de una droga y no tiene por qué afectar a todas las respuestas farmacológicas inducidas por la misma. Los mecanismos neurobiológicos responsables de la tolerancia son complejos y diferentes en función del tipo de droga. Así, este fenómeno se ha estudiado fundamentalmente para el caso de los opioides, cannabinoides y nicotina.

El fenómeno de tolerancia comienza con una desensibilización de los receptores, ya sean receptores acoplados a proteínas G o receptores ionotrópicos, debido a su constante activación por los agonistas. Esta desensibilización del receptor provoca un mecanismo compensatorio que puede dar lugar a variaciones del número de los mismos ensamblados en la membrana plasmática. Dependiendo del tipo de receptor que se trate y de los agonistas que induzcan su activación tendremos diferencias en las variaciones en la densidad del receptor. Por ejemplo, si el agonista es la nicotina, los receptores nicotínicos (nAChRs) incrementarán su número para compensar el estado desensibilizado del receptor (ver apartado 2.3.5.2.2). Sin embargo, si son agonistas cannabinoides u opioides se producirá una disminución en el número de los receptores. En el caso de la administración de opiáceos, el orden por el cual ocurre una bajada del número de los receptores es el siguiente: desacoplamiento a las proteínas G, internalización de los receptores a través de la actuación de las β-arrestinas y disminución del número de receptores ensamblados en la membrana plasmática (Koch y Hollt, 2008). Por otro lado, la tolerancia a opiáceos y cannabinoides también se caracteriza por alteraciones en los mecanismos de transducción de señales. De esta forma, la administración aguda de estas drogas disminuye la concentración de adenosina-5-aminofosfato cíclico (AMPc). Sin embargo, tras la administración repetida, la actividad de la adenilciclasa, de la proteína quinasa A (PKA) o de otros componentes de la vía de señalización se incrementa de manera progresiva y, como consecuencia, van aumentando también de forma progresiva las concentraciones intracelulares de

AMPc. Cuando cesa la administración del agonista o se administra un antagonista de los receptores metabotrópicos se produce un efecto de rebote y aumentan de manera importante las concentraciones del AMPc incrementándose la excitabilidad de las neuronas.

1.4.3. Abstinencia aguda

El síndrome de abstinencia se define como el conjunto de signos y síntomas que aparecen como consecuencia de la supresión o reducción del consumo de una droga y que son característicos de cada tipo de droga. Estos síntomas se alivian al volver a consumir la droga. El síndrome de abstinencia consta de dos componentes, uno físico y otro emocional, aunque no todas las drogas son capaces de generar un cuadro de dependencia física. Éste es el caso de la dependencia de psicoestimulantes en el que se genera un síndrome de naturaleza psíquica muy importante sin expresión de signos somáticos. La gravedad del síndrome de abstinencia física depende del tipo de droga. De esta forma, el síndrome de abstinencia de opiáceos y de alcohol es muy destacado, mientras que las manifestaciones físicas de la abstinencia de nicotina son más leves.

La cuantificación de la sintomatología física característica de un síndrome de abstinencia se puede determinar en animales de experimentación mediante la aplicación de un tratamiento crónico de la droga y la posterior inducción de la abstinencia tras la inyección de un antagonista de los receptores en los que actúa la misma. Existen escalas de puntuación para la cuantificación del síndrome de abstinencia de opiáceos (Maldonado y cols., 1997), nicotina (Castañé y cols., 2002), alcohol (Macey y cols., 1996) y cannabinoides (Hutcheson y cols., 1998). Como hemos comentado en el apartado de *consumo crónico,* los cambios neuroadaptativos derivados de un tratamiento continuo con la droga son los que inducen la dependencia de dicha sustancia. Así, la hiperactividad neuronal producida por un aumento del AMPc en el locus coeruleus y en la sustancia gris periacueductal es la responsable de la sintomatología física de la abstinencia de opiáceos, mientras que la inducida en el cerebelo la responsable de la abstinencia de cannabinoides (Romero y cols., 1999; Liu y Anand, 2001; Nestler, 2004; Castañé y cols., 2004).

El componente emocional negativo asociado a la abstinencia es más importante que los aspectos somáticos de la misma de cara al mantenimiento del proceso

adictivo (Markou y cols., 1998). Dicho componente puede ser analizado en el animal de experimentación mediante un modelo de condicionamiento espacial o bien mediante la AEIC (ver apartado 1.3.3). La disminución del interés hacia los estímulos reforzantes (anhedonia) constituye uno de los principales síntomas afectivos asociados con la abstinencia de las drogas de abuso. Al mismo tiempo, se manifiestan síntomas tales como ansiedad, irritabilidad y depresión (Asociación Americana de Psiquiatría, 1994). Esta sintomatología emocional negativa es consecuencia de las alteraciones en la actividad neuronal del sistema límbico producidas durante la abstinencia a las drogas. Así, uno de los cambios más importantes producidos durante esta fase es la disminución de la liberación de DA extracelular en áreas como el Nac, el núcleo central de la amígdala y la corteza prefrontal (Hughes y cols., 1991; Bassareo y cols., 1995; Hildebrand y cols., 1998; Hildebrand y cols., 1999). La menor actividad dopaminérgica en el Nac se ha relacionado con la disforia que caracteriza a esta etapa de la adicción. En el caso de drogas como los opiáceos y cannabinoides esta reducción en el contenido de DA es consecuencia de la hiperactividad neuronal producida por el aumento del AMPc anteriormente comentada (Nestler, 2004). Se ha postulado también que la disminución de DA en el Nac puede ser debida a un aumento de la actividad del sistema κ/dinorfina sobre los terminales dopaminérgicos del Nac que proceden del ATV (Nestler, 2001). Además de la disminución en la transmisión de DA en el Nac y en la corteza prefrontal, se ha observado una reducción de esta amina en el núcleo central de la amígdala. Esta reducción podría estar relacionada con el aumento de la ansiedad asociado a la abstinencia (Kenny y Markou, 2001).

Los síntomas afectivos negativos de la abstinencia como la ansiedad, depresión, irritabilidad o impulsividad también se han relacionado con alteraciones en el sistema mediador del estrés del organismo (Koob y Le Moal, 2006). Así, se ha comprobado la existencia de un aumento del factor de liberación de corticotropina (CRF) en el sistema límbico, más concretamente en el núcleo central de la amígdala, durante la abstinencia a todas las drogas de abuso (Sarnyai y cols., 2001).

1.4.4. Abstinencia a largo plazo: Recaída al proceso adictivo

Tras la superación de la fase aguda de abstinencia, comienza una fase asintomática de abstinencia a largo plazo. Durante dicha fase tienen lugar dos

fenómenos que suelen originar la recaída de un número importante de sujetos en el consumo de la droga: el "deseo intenso" por el consumo de la droga (*craving* en inglés) y la "abstinencia condicionada", periodo durante el cual aparece una sintomatología abstinente derivada de estímulos desencadenantes que ha continuación se detallan.

El restablecimiento de una conducta extinguida previamente, asociada al consumo de la droga, refleja la cronicidad del fenómeno adictivo. Tres son los estímulos que se han postulado como los causantes de provocar recaída en humanos y que también son utilizados en los modelos de experimentación animal: el nuevo contacto con la droga, la presentación de estímulos asociados a la toma de droga y el estrés. Las bases neurobiológicas de este fenómeno no se conocen con exactitud aunque se relacionan con los procesos de sensibilización y plasticidad sináptica producidos tras el consumo crónico de la droga.

1.4.4.1. Recaída por nuevo contacto con la droga

Estudios con animales que se autoadministran psicoestimulantes (Soria y cols., 2008), opiáceos (Spano y cols., 2007), alcohol (Le y cols., 1998) y nicotina (Chiamulera y cols., 1996) han demostrado la existencia de una recaída en la búsqueda de la droga, después de un periodo de extinción de esta respuesta, tras la administración sistémica o intracerebral de la droga. Además, muchos otros estudios han demostrado una "recaída-cruzada" tras la inyección de drogas diferentes de aquellas que se autoadministran los animales (Davis y Smith, 1976; De Vries y cols., 1999), aunque la restauración de la búsqueda de la droga fue menos efectiva en algunos de estos estudios (Gerber y Stretch, 1975). Así, tanto el alcohol como el agonista cannabinoide WIN 55,212-2 son capaces de inducir recaída en la búsqueda de nicotina en roedores (Biala y Budzynska, 2008).

Este tipo de recaída parece ser debida a una nueva activación del sistema dopaminérgico mesocorticolímbico que imita la activación ocurrida en el consumo agudo de la droga (Shalev y cols., 2002). Se ha estipulado que la activación de la vía dopaminérgica desde el Nac a la corteza prefrontal y de la vía glutamatérgica desde la corteza prefrontal al Nac son las más importantes en mediar este tipo de recaída (Kalivas y O'Brien, 2008). Además, se ha demostrado que la inhibición de la liberación de DA a nivel cortical, inhibe la liberación de glutamato en el Nac y la

consiguiente recaída por nuevo contacto con la droga (McFarland y cols., 2003; McFarland y cols., 2004).

1.4.4.2. Recaída por estímulos asociados al consumo de la droga

Estudios en humanos (Carter y Tiffany, 1999; Waters y cols., 2003; Payne y cols., 2006) y en el animal de experimentación (Liu y cols., 2006; Dravolina y cols., 2007) ponen de manifiesto las propiedades de los estímulos condicionados para inducir un deseo intenso por la droga y provocar recaídas en la búsqueda de la misma. Este tipo de recaída es debido a que estímulos ambientales, que de manera inicial carecen de valor motivacional, cuando se asocian de manera repetida con reforzadores primarios adquieren propiedades reforzantes por sí mismos mediante un proceso de aprendizaje clásico (McFarland y Ettenberg, 1997; Deroche-Gamonet y cols., 2004). Se ha postulado que estos refuerzos condicionados tienen la capacidad de inducir un estado subjetivo que contribuye al deseo por la droga y a la recaída. Un estímulo predictivo de la droga puede ser una señal de disponibilidad de la misma, y por tanto proporciona una motivación especial para comenzar un comportamiento que permita llegar a un contacto directo con la droga (Meyer y Mirin, 1979).

En modelos animales, los estímulos más utilizados son la luz o un tono sonoro que aparecen de manera contingente con la administración de la droga (*cues*). Dos hechos son importantes con el objeto de que la eficacia sobre la recaída por parte de estos estímulos aumente: en primer lugar, la presencia de dos estímulos (tono y luz a la vez) es más efectiva en la inducción de la recaída que la presencia de sólo uno de ellos. En segundo lugar, los estímulos deben ser presentados de manera contingente (Shalev y cols., 2002). En general, podemos diferenciar dos clases distintos de estímulos ambientales asociados a la recaída en la búsqueda de la droga en el animal de experimentación: los estímulos discriminativos y los estímulos contextuales. Entre los primeros se incluyen la luz y el tono sonoro que aparecen de forma contingente con la infusión de la droga, mientras que los segundos incluyen el lugar donde el animal recibe la droga, en este caso la caja de autoadministración. Esta distinción es importante ya que estudios previos indican que los circuitos neuronales que median los efectos comportamentales asociados a ambos tipos de estímulos son diferentes (Shalev y cols., 2002).

Al igual que ocurre en la recaída por contacto con la droga, los estímulos asociados al consumo de la misma inducen la activación de la corteza prefrontal (Goldstein y Volkow, 2002; Brody y cols., 2002). Además de este área, la amígdala basolateral y la cubierta (shell) del Nac también están involucradas en este tipo de recaída (Balfour, 2004; McClernon y cols., 2007). En el estriado dorsal, la transmisión dopaminérgica y glutamatérgica son esenciales para que los estímulos asociados a la toma de la droga induzcan una recaída, al menos para drogas como la cocaína (Vanderschuren y cols., 2005). Dentro de la transmisión dopaminérgica, los receptores D3 se han involucrado recientemente en la mediación de este tipo de recaída (Fagerstrom y Balfour, 2006).

1.4.4.3. Recaída por estrés

Una situación de estrés causa recaída tanto en humanos (Sinha y cols., 2000) como en animales entrenados a autoadministrarse diferentes drogas de abuso (heroína, cocaína, nicotina o alcohol) (Shalev y cols., 2002). Se han empleado diferentes metodologías para inducir recaída de la búsqueda de la droga por estrés en modelos animales. Así, la aplicación de una descarga eléctrica en las patas del animal, la deprivación de comida o la administración de CRF o yohimbina constituyen los métodos más comúnmente utilizados (Shalev y cols., 2002; Epstein y cols., 2006).

Se han sugerido varias hipótesis acerca de las causas por las que el estrés induce la recaída. La primera sugiere que el CRF liberado a causa del estrés activa la vía mesocorticolímbica dopaminérgica imitando el efecto reforzante agudo de una droga y produciendo el restablecimiento de la búsqueda de la misma (Robinson y Berridge, 1993; Shaham y Stewart, 1995). Una segunda hipótesis sugiere que una situación de estrés induce un estado emocional negativo similar al estado de abstinencia aguda de una droga (Whitehead, 1974).

Al igual que en el restablecimiento de la búsqueda de la droga por re-exposición a la misma, las proyecciones dopaminérgicas y glutamatérgicas del Nac y la corteza prefrontal parecen mediar este fenómeno (Shalev y cols., 2002; McFarland y cols., 2003; McFarland y cols., 2004). Otra área íntimamente relacionada con este tipo de recaída es la amígdala extendida (Shalev y cols., 2002; Kalivas y Volkow, 2005), más concretamente la activación de los receptores CRF1 a nivel del núcleo de la estria terminal (Shalev y cols., 2002). En este tipo de recaída

también se ha observado la participación de las neuronas noradrenérgicas centrales puesto que su activación parece necesaria para que se produzca el fenómeno de recaída inducido por estrés (Shalev y cols., 2002).

1.5. Teorías de la adicción

La adicción ha sido abordada por la literatura científica desde múltiples puntos de vista incluyendo tanto los aspectos psicológicos como biológicos. Diversas teorías han sido postuladas con el objeto de explicar los mecanismos que conducen al inicio y mantenimiento de la adicción. En este apartado únicamente se detallan dos de las principales teorías neurobiológicas de la adicción: la teoría de la sensibilización del incentivo (Robinson y Berridge, 1993) y la teoría motivacional de la adicción (Koob y Le Moal, 1997). Como explicaremos a continuación, dichas teorías no son excluyentes ya que la motivación que induce al consumo de una droga es un hecho común en ambas teorías. Sin embargo, el tipo de refuerzo que conduce a este consumo difiere significativamente entre ellas.

1.5.1. Teoría de la sensibilización del incentivo (Robinson y Berridge, 1993)

El término "sensibilización" es utilizado en farmacología para expresar el aumento del efecto de una droga tras su administración repetida (ver apartado 1.4.2.1). La exposición repetida a las drogas de abuso provoca un aumento progresivo y duradero de determinados efectos conductuales de dichas drogas. Diversos estudios han demostrado este proceso evaluando los efectos psicomotores de las drogas de abuso, tales como su capacidad de aumentar la actividad locomotora, el comportamiento rotacional o comportamientos de tipo estereotipia (Robinson y Berridge, 1993). Estos hallazgos han sido relacionados con el proceso adictivo, ya que los sustratos neuronales que median los efectos psicomotores de las drogas se solapan con los sustratos neuronales responsables de las propiedades reforzantes de las mismas (Wise y Bozarth, 1987). El sustrato neuronal referido es el sistema dopaminérgico mesolímbico, especialmente las proyecciones dopaminérgicas del ATV hacia el NAc. Esta teoría separa en dos conceptos la asociación entre el valor incentivo de la droga ("wanting") y el efecto placentero o hedónico ("liking"). Durante la administración repetida de la droga,

se observa el fenómeno de sensibilización a determinadas acciones farmacológicas. En el animal de experimentación, este fenómeno se manifiesta sobretodo por un incremento progresivo de los efectos hiperlocomotores de la droga. La sensibilización ha sido interpretada como una manifestación del incremento progresivo del estado de expectación a los efectos producidos por la droga, que ocurre tras su administración repetida en humanos ("wanting") (Robinson y Berridge, 1993). Así pues, los efectos placenteros subjetivos ("liking") no parecen estar sensibilizados durante la adicción. Al contrario, el componente de la adicción sujeto a la sensibilización y mediado por la dopamina es la motivación por la droga *per se* ("wanting"), también llamada "saliencia incentiva". Sin embargo, estudios animales también han demostrado una sensibilización a los efectos de recompensa y placenteros de las drogas de abuso (De Vries y cols., 1998). El mecanismo cerebral implicado en conceder propiedades motivacionales a los estímulos asociados al consumo de las drogas de abuso llega a estar hipersensibilizado. Esta hipersensibilización produce deseo patológico, o "craving", y conduce a una búsqueda y comportamiento compulsivo del consumo de la droga. La continuada sensibilización de este sistema provoca en última instancia que los adictos sean muy vulnerables a los fenómenos de recaída.

1.5.2. Teoría motivacional de la adicción: neuroadaptación y alostasis (Koob y Le Moal, 1997)

Una de las teorías más aceptadas en la actualidad para explicar el proceso de inicio y mantenimiento de la adicción a las drogas de abuso es la teoría de la espiral de desregulación del sistema de recompensa cerebral (figura 7) (Koob y Le Moal, 1997). Esta teoría propone el desarrollo de una adaptación alostática de los sistemas motivacionales del cerebro para explicar los cambios asociados al proceso adictivo y se encuentra basada en la teoría de los procesos oponentes (figura 6) (Solomon y Corbit, 1974). Esta teoría parte de la base de que el cerebro contiene diferentes mecanismos de control capaces de equilibrar cualquier estado afectivo que se aleje de la estabilidad, ya sea éste placentero o aversivo. Los efectos reforzantes agudos de las drogas de abuso parecen ser responsables del inicio del fenómeno adictivo (proceso "a") (Koob, 1992). Posteriormente y como consecuencia de estos efectos reforzantes se dispara un proceso negativo, opuesto

al inicial (proceso "b"). Cuando el proceso "a" es mayor que el proceso "b" el individuo se encuentra en una situación placentera (estado A). En caso contrario, si el proceso "b" es mayor que el proceso "a" el individuo siente un efecto desagradable o disfórico (estado B). A medida que el consumo de la droga se repite la intensidad del proceso "a" disminuye al mismo tiempo que aumenta el proceso "b". Cuando el proceso de adicción se encuentra en una fase avanzada, el estado emocional negativo se encuentra sensibilizado y predomina sobre el positivo produciendo una tolerancia a los efectos eufóricos iniciales de la droga. La sensibilización del proceso "b" equivale al desarrollo de un estado afectivo negativo, en oposición al efecto hedónico de la droga, y a la aparición de un cuadro disfórico/aversivo en el momento de la interrupción del consumo de la droga. Por tanto, el individuo hará todo lo posible para evitar o acortar ese efecto negativo (Koob y Le Moal, 2005).

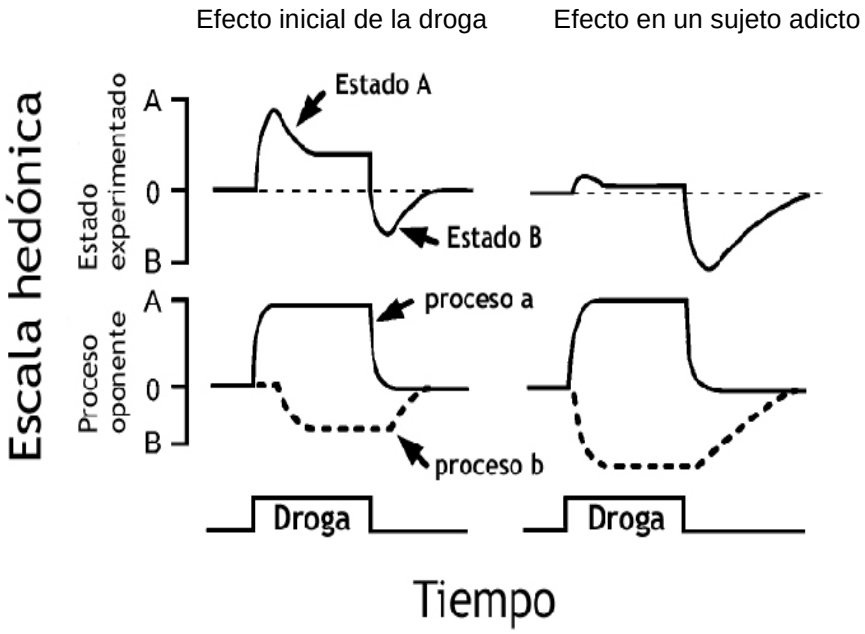


Figura 6. Modelo de adicción del proceso oponente (Solomon, 1980).

Según esta teoría, la adicción estaría sustentada por tres pilares básicos: la preocupación/anticipación por obtener la droga, la intoxicación por el consumo de dosis gradualmente más elevadas y la abstinencia física o emocional debida a la ausencia de la droga. El estado de preocupación por la droga y/o anticipación a

sus efectos se relaciona con el fenómeno de sensibilización psicomotora. Los cambios neuroadaptativos que ocurren en el SNC tras el consumo repetido de una droga son en mayor medida los causantes del estado disfórico asociado a la abstinencia de la droga. Según este modelo, el individuo se inicia en el consumo de la droga por las propiedades reforzantes de ésta. El efecto motivacional de la droga junto con los efectos reforzantes de los estímulos condicionados al consumo de la misma le lleva a un consumo cada vez mayor que deriva a un deseo persistente por volver a consumir la droga. Progresivamente, este deseo se convierte en una preocupación prioritaria por obtener la droga lo que conlleva a problemas físicos y psíquicos persistentes. El individuo, bajo esta situación, continúa consumiendo de manera gradual dosis más elevadas de la droga. El aumento en el consumo y la intoxicación originan a su vez el desarrollo del fenómeno de la tolerancia a los efectos reforzantes de la droga. Cuando el individuo cesa el consumo de la droga aparecen signos disfóricos característicos de la abstinencia. El deseo de evitar esta abstinencia intensifica la preocupación por conseguir la droga a la vez que origina problemas personales y sociales derivados de la prioridad que el consumo de la droga supone para el individuo. La progresión de esta situación de círculo vicioso hace intensificar todos los síntomas negativos que estamos describiendo y provoca la pérdida de control del consumo de la droga. Por tanto se convierte en un consumo compulsivo, característica esencial del proceso adictivo.

Figura 7. Diagrama de la espiral de desregulación del sistema de recompensa cerebral (modificado de Koob y Le Moal, 1997).

Desde un punto de vista neuroquímico, la fase de intoxicación está reflejada por la activación de los sistemas dopaminérgico y opioide, y la fase de abstinencia

y de estado emocional negativo se encuentra dominada por la sobreactivación del eje hipotálamo-hipofisario-adrenal (HPA), el incremento de la síntesis de CRF (Koob y Le Moal, 2001) y la disminución de la actividad dopaminérgica. De esta manera, esta teoría propone una visión de la adicción más real, capaz de identificar los factores neurobiológicos responsables de la vulnerabilidad a la adicción y a la recaída en individuos con una historia previa de drogodependencia.

Si relacionamos ambas teorías podemos observar una analogía según la cual el componente hedónico de la adicción sujeto a tolerancia equivale al "liking", mientras que el componente sujeto a sensibilización equivale al "wanting". En el modelo de Robinson y Berridge la aumentada actividad dopaminérgica en el Nac produce una sensibilización neuronal lo cual facilita la "saliencia incentiva" que aumentaría la búsqueda y el consumo de la droga. En el modelo de Koob y Le Moal la disminución del estado hedónico conduce a aumentar la búsqueda de la droga por el mecanismo del refuerzo negativo. Por lo tanto, un elemento común de ambas teorías es la motivación incrementada por la búsqueda de la droga pero su mayor diferencia es el papel desempeñado por el sistema dopaminérgico mesolímbico. En la teoría de Robinson y Berridge un aumento de la actividad dopaminérgica en el Nac conduce a una búsqueda y comportamiento compulsivo de consumo de la droga mientras que en la teoría de Koob y Le Moal una disminución de la actividad dopaminérgica conduce al continuo consumo de la misma para evitar las consecuencias negativas asociadas a la abstinencia.

2. Nicotina

La adicción al tabaco es uno de los problemas socio-económicos y sanitarios más importantes de los países civilizados y la prevalencia de esta enfermedad está aumentando de manera significativa en los países en vía de desarrollo. Según la Organización Mundial de la Salud, más de 1000 millones de personas fuman tabaco en todo el mundo y su consumo produce más de 5 millones de muertes cada año. Además, el consumo de tabaco constituye un factor de riesgo para 6 de las 8 principales causas de mortalidad en el mundo (WHO, 2008). La nicotina es el principal componente psicoactivo del tabaco y la responsable de la adicción al mismo.

2.1. Características generales

La nicotina es un alcaloide que se encuentra en la planta *Nicotiana Tabacum* en cantidades que varían entre el 0.3% y el 5% siendo en las hojas donde se localiza la mayor concentración de dicha droga. La nicotina toma su nombre de Jean Nicot, (embajador francés en Portugal, 1559), que usaba el tabaco para curar las migrañas de la reina Catalina de Médicis. Se le llama entonces "hierba santa" o "hierba para todos los males" por su empleo casi indiscriminado: se recetaba, entre otros, para el dolor, la cefalea o la flatulencia. La nicotina se aisló por primera vez de la planta del tabaco en 1828 por los químicos alemanes Posselt & Reimann (Koob y Le Moal, 2006).

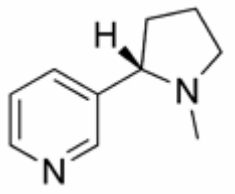


Figura 8. Estructura química de la nicotina ($C_{10}H_{14}N_2$, 3-(1-Metilpirrolidin-2-il)piridina). Masa molecular relativa: 162

La nicotina es una amina terciaria que existe en sus dos formas isoméricas, pero el tabaco contiene sólo la forma más activa desde el punto de vista farmacológico, el isómero L-nicotina. Ésta es una base débil cuya absorción va a depender del pH. Así, la nicotina presente en los cigarrillos con un pH de 5.5 se absorbe en el pulmón, de un 79 a un 90%, y en menor medida a través de la mucosa bucal, plexos sublinguales y piel, mientras que la nicotina presente en pipas, puros, tabaco de mascar y rapé con un pH de 8.5 se absorbe de manera más importante en las mucosas nasal y oral (Koob y Le Moal, 2006).

Una vez absorbida en el organismo, la nicotina se distribuye rápidamente por los tejidos del cuerpo y tarda entre 10-19 segundos en llegar al cerebro (Benowitz, 1996) donde ejerce su acción psicoactiva a través de su unión a los nAChRs. La vida media de la nicotina es de 2-3 horas. El 80% de la droga se metaboliza en el hígado convirtiéndose en cotinina que constituye su principal metabolito. El 90% de la metabolización de la droga se realiza principalmente a través del citocromo CYP2A6 aunque otros enzimas como el CYP2B6, el UGT (UDP-glucoronosiltransferasa) o el FMO (monooxigenasa contenedora de flavina) pueden también metabolizarla. Un porcentaje bajo de la nicotina es eliminado sin metabolizar por vía urinaria. Es importante resaltar que variaciones en la metabolización de la nicotina afectan al patrón del consumo del tabaco (Wall y cols., 2007).

2.2. Mecanismo de acción

2.2.1. nAChRs

Las acciones farmacológicas de la nicotina son debidas a la activación de unos receptores pertenecientes al sistema acetilcolinérgico, los nAChRs.

2.2.1.1. Clasificación y estructura

Los nAChRs pertenecen a la superfamilia de los receptores ionotrópicos activados por ligando, siendo la acetilcolina su ligando endógeno. La acetilcolina también activa otro tipo de receptores, los muscarínicos, perteneciente a la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G. Los nAChRs son pentámeros de combinaciones homo o heteroméricas de diferentes subunidades (α, β, γ, δ)

cada una con cuatro dominios transmembrana (Le Novere y Changeux, 1995). Se conoce la existencia de 10 subunidades α (α1-α10), 3 subunidades β (β2-β4), una γ y otra δ. Estas subunidades se agrupan alrededor de un poro central permeable a cationes (Na^+, K^+, Ca^{2+}). Las posibles combinaciones de estas subunidades y su extensa localización en el organismo hacen que el receptor tenga multitud de funciones fisiológicas (Gotti y Clementi, 2004).

Como podemos observar en la figura 9, estos receptores contienen una porción extracelular amino-terminal hidrofílica, que constituye el sitio de unión de los ligandos a dicho receptor. A continuación le siguen 3 dominios transmembrana hidrofóbicos (M1-M3), una larga cadena intracelular y un cuarto dominio transmembrana también hidrofóbico (M4). La región transmembrana M2 es la que se cree responsable de la formación del poro. Esta subunidad está compuesta por aminoácidos cargados negativamente que facilitan el paso de cationes a través del poro. Los diferentes posibles sitios de fosforilación y la secuencia aminoacídica divergente de la cadena intracelular que une a M3 y M4 son los que determinan las diferencias funcionales del nAChR (Freedman y cols., 1997; Picciotto y cols., 2001).

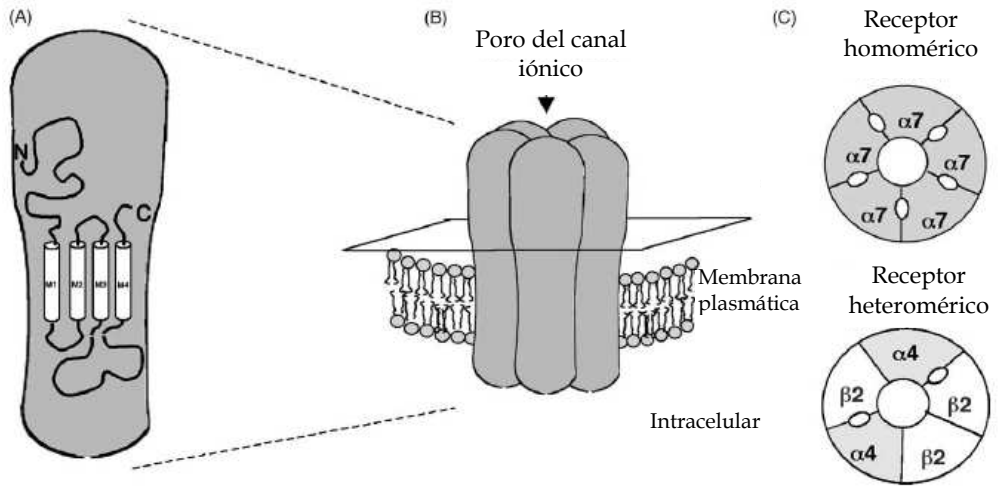


Figura 9. (A) Organización y estructura de las subunidades de los nAChRs. (B) Representación esquemática del nAChR ensamblado en la membrana celular. (C) Receptor homo y heteropentamérico y el sitio de unión de sus ligandos (modificado de Gotti y Clementi, 2004).

Desde el punto de vista funcional existen 4 formas en el estado conformacional del receptor: reposo, abierto, desensibilizado e inactivo. Los nAChRs se encuentran

principalmente en estado de reposo antes de la llegada del agonista. Una vez que el agonista se une al receptor cambia al estado abierto. Durante este estado el canal está conduciendo cationes durante sólo unos milisegundos. Estos dos estados son los que poseen menor afinidad por el ligando. Inmediatamente después, el receptor cambia a un estado desensibilizado o inactivo dependiendo del tiempo en el que se encuentre cerrado el canal. Estos dos estados son refractarios y vuelven al estado de reposo en cuestión de milisegundos o minutos. Bajas concentraciones de agonistas en el medio pueden inducir estados desensibilizados del receptor sin pasar por el estado abierto debido a la gran afinidad del receptor por el agonista en el estado desensibilizado (Dani y Heinemann, 1996). La transición de los distintos estados conformacionales puede ser regulado por la fosforilación del receptor (Changeux y Edelstein, 1998). El porcentaje de tiempo que los nAChRs pasan en cada uno de estos estados depende, entre otras cosas, del tipo de subunidades que lo formen y de la concentración de agonista que haya en el medio (Dani y Heinemann, 1996).

Se han identificado dos subfamilias principales de receptores: los sensibles a la α-bugarotoxina (α-Bgt), menos afines a la nicotina, y los α-Bgt-insensibles, que poseen una mayor afinidad por la misma. Los receptores α-Bgt-sensibles pueden ser homopentaméricos (α7, α8, α9) o heteropentaméricos (α7α8, α9α10 ó α1γ, α1β1δ) mientras que los receptores α-Bgt-insensibles son heteropentaméricos formados por subunidades α (α2-α6) y β (β2-β4) (Gotti y cols., 2006). Los receptores homopentaméricos tienen 5 sitios de unión idénticos al ligando por molécula (uno en cada subunidad) mientras que los heteropentaméricos solamente disponen de dos sitios de unión al ligando por molécula y se localizan en la interfase entre las subunidades α y β (Gotti y cols., 2006). Cada interfase de estos receptores heteropentaméricos tiene diferente afinidad para los agonistas o antagonistas, mientras que en los homopentaméricos la afinidad por las moléculas es idéntica (Sine y cols., 1995; Sine, 1997).

2.2.1.2. Distribución en el organismo

Los nAChRs se encuentran en el SNC, sistema nervioso periférico, músculo esquelético, tejido linfoide, macrófagos, piel, células del pulmón, tejido vascular, células cromafines de la médula adrenal y órganos sensoriales (Gotti y Clementi, 2004). En el sistema nervioso periférico se localizan en los ganglios autonómicos

tanto simpáticos como parasimpáticos y en la placa neuromuscular. El músculo esquelético es el único órgano donde se expresa el receptor formado por la combinación de las cuatros subunidades (2α, β, γ, δ).

En el SNC, los nAChRs están compuestos únicamente por las subunidades heteropentaméricas α (α_2-α_{10}) y β (β_2- β_4) o por la combinación de las 5 subunidades α7 formando un receptor homopentamérico. Los nAChRs presentan una amplia distribución (figura 10) de acuerdo con la extensa localización de las vías colinérgicas (Gotti and Clementi, 2004). Estos receptores están localizados de manera preferente a nivel presináptico tanto en médula como en cerebro, donde modulan la liberación de diversos neurotransmisores, mientras que con menor frecuencia se encuentran en cuerpos celulares o dendritas, ejerciendo efectos postsinápticos (Gotti and Clementi, 2006). Los nAChRs formados por las subunidades α4β2 constituyen el principal subtipo localizado en el SNC. Se expresan en áreas tales como el tálamo, la corteza, el estriado, el hipotálamo y el hipocampo (Sher y cols., 2004). Así, en el estriado forman el 70% de los nAChRs de ese área mientras que la combinación α6β2 sólo constituye el 20% (Gotti and Clementi, 2006).

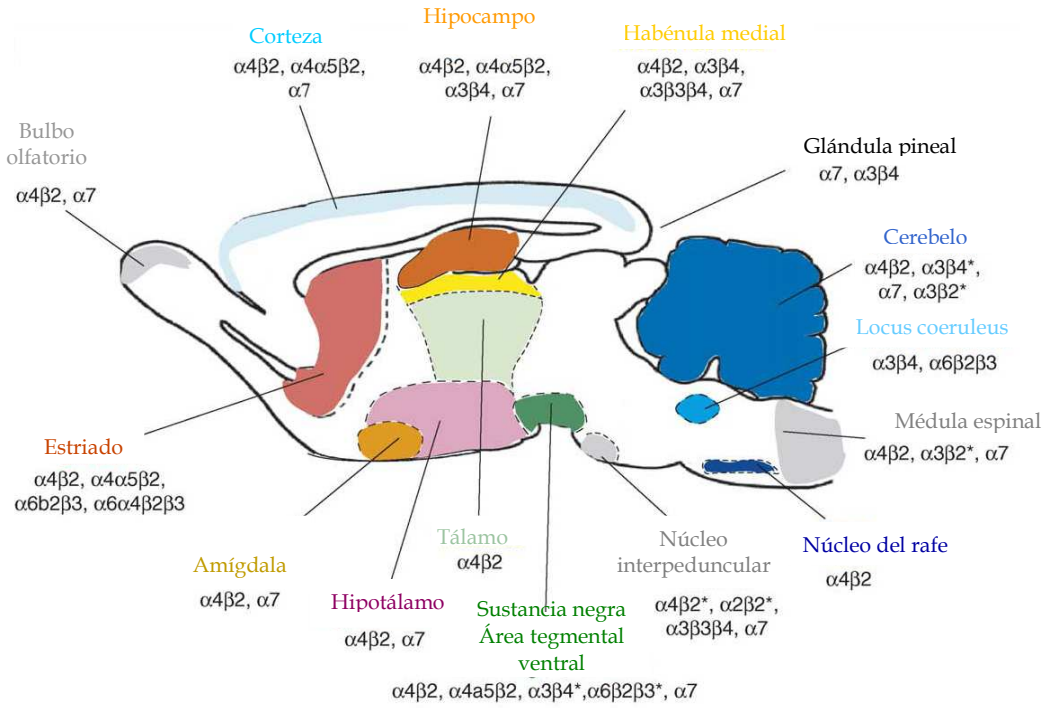


Figura 10. Distribución regional de los principales tipos de nAChRs en el SNC del roedor (modificado de Gotti y cols., 2006).

Los receptores que contienen las 5 subunidades α7 se localizan en corteza, hipocampo y regiones límbicas subcorticales expresándose en menor medida en tálamo y ganglios basales (Gotti y cols., 2006).

Los receptores formados por las combinaciones de las subunidades α3, α6, β3 ó β4 tienen una menor distribución en el cerebro (figura 10) (Gotti y cols., 2006).

Tabla 1. Papel de los nAChRs *en la liberación de neurotransmisores.*

	Glu	**ACh**	**DA**	**GABA**	**NA**
Cerebelo	α7 (R)				
Corteza	α7(R) β2(R)	α4β2(R) αxβ4(R)	α3β2(h) α4β2 (R) α3 y/o α6β2 (R)		
Hipocampo	α7 (R)	α4β2 (R) αxβ4 (R)	α3β4 (R)	α7 (R) α4β2 (R)	α3β2 (R) α4β2(R) α3β4 (R) α7 (R)
Núcleo interpeduncular		β4 (r)		αxβ2 (r)	
Hipotálamo					xβ2 (r)
Cerebro medio			α4β2 (r, R)	α4β2 (r, R)	
Núcleo lateral geniculado	α7 (p)				
Tubérculo olfatorio	α7 (r)		α4β2 (r), α3 y/o α6β2 (r)		
Colículo superior	α7 (r)			α3β2 y/o α6β2 (r)	
Estriado	α7 (r)		α4β2 (r) α4 α5β2 (r) α6α 4β2β3 (r) α6β2β3 (R) α7 (r)		
Tálamo			α4β2 (r)	α4β2 (r)	

Abreviaturas: Glu: glutamato; ACh: acetilcolina; DA: dopamina; GABA: Ácido γ-aminobutírico; NA: noradrenalina; p: pollo; h: humanos; r: ratón; R: rata (modificado de Gotti y cols., 2006).

Como se ha comentado anteriormente, los nAChRs se encuentran principalmente localizados a nivel presináptico. La activación de los mismos facilita la liberación de diferentes neurotransmisores. Receptores formados fundamentalmente por las subunidades α7, α4β2 y α3β4 se encuentran también a

nivel postsináptico en varias regiones del SNC. En la tabla 1 se describen las diferentes subunidades de los nAChRs involucradas en la liberación específica de diferentes neurotransmisores cerebrales (Gotti y Clementi, 2004).

2.2.1.3. Procesos fisiológicos en los que intervienen

El uso de la ingeniería genética, gracias a la cual se generan ratones knockout o knockin mediante la eliminación o mutación de uno o más genes, proporciona una herramienta única para analizar el papel funcional de los nAChRs. Los experimentos con animales knockout han mostrado que algunas subunidades de nAChRs como la subunidad α3 y la combinación β2-β4 son esenciales para la supervivencia o para la ejecución de comportamientos básicos, ya que los animales deficientes de estas subunidades mueren en la primera semana de vida debido a una disfunción multiorgánica (Xu y cols., 1999a; Xu y cols., 1999b). A continuación, se indican algunos ejemplos de procesos fisiológicos en los que participan dichos receptores:

- Como se acaba de comentar, tanto la subunidad α3 como la combinación β2-β4 son esenciales para la supervivencia del ratón ya que los animales knockout de estas subunidades presentan alteraciones tanto en el tracto urinario como gastroinstentinal además de padecer un crecimiento postnatal retardado. Ambas disfunciones producen una elevada mortalidad perinatal (Xu y cols., 1999a; Xu y cols., 1999b). Recientemente, se ha comprobado que la subunidad α3, en combinación con la subunidad β2, inhibe de manera tónica la transmisión nociceptiva a nivel espinal (Young y cols., 2008).

- Estudios con ratones knockout α5 han revelado una disfunción de la transmisión parasimpático-ganglionar cardíaca (Wang y cols., 2002).

- Los ratones deficientes en la subunidad α4 muestran niveles elevados de ansiedad confirmando que dicha subunidad participa en este proceso (Ross y cols., 2000; Labarca y cols., 2001). Por otro lado, la presencia de una mutación en el dominio transmembrana M2 de la subunidad α4 se relaciona con un determinado tipo de epilepsia autosómica dominante (Gotti y cols., 2006).

- La subunidad β2 de los nAChRs contribuye a la supervivencia neuronal, al mantenimiento de los procesos cognitivos, al desarrollo normal del sistema visual de los organismos y a la organización del sueño modulando el comienzo y duración de la fase REM (Rápido Movimiento de Ojos) (Gotti y Clementi, 2004).

Esta subunidad está también relacionada con la neurodegeneración producida por la edad. Estudios post-mortem de cerebros de pacientes que padecían la enfermedad de Alzheimer han demostrado una pérdida de la subunidad β2 en combinación con la subunidad α4 (Perry y cols., 1995).

- El receptor formado por la combinación de las subunidades α4β2 interviene de manera tónica en procesos cognitivos como memoria (Levin, 2002) y atención (Wilens y Decker, 2007). Al igual que la combinación α3β2, los receptores formados por las subunidades α4β2 inhiben de manera tónica la información nociceptiva a nivel espinal (Rashid y cols., 2006). Sin embargo, estudios realizados con animales deficientes en estas subunidades no muestran diferencias con sus correspondientes wild-type en la transmisión nociceptiva realizadas mediante un ensayo de nocicepción espinal (ensayo de retirada de la cola ante un estímulo térmico) (Marubio y cols., 1999).

- Contrariamente a la subunidad α4, los animales deficientes de la subunidad α7 han mostrado una disminución de los niveles de ansiedad evaluados mediante el ensayo del campo abierto (Paylor y cols., 1998). Al igual que el receptor formado por las subunidades α4β2, esta subunidad está involucrada en la memoria y la atención (Wilens y Decker, 2007). Apoyando este último dato, varios estudios demuestran la relación de esta subunidad con los problemas de atención que se producen en la esquizofrenia (Freedman y cols., 1995; Leonard y cols., 1998; Young y cols., 2007). La subunidad α7 también media los efectos pronociceptivos de agonistas nicotínicos como la epibatidina. Sin embargo, esta subunidad no interviene en los efectos antinociceptivos de dicho agonista (Khan y cols., 1997; Khan y cols., 2001).

- Estudios con animales deficientes de la subunidad β3 muestran cambios en la locomoción, evaluados mediante el test del campo abierto, y alteraciones en la atención analizadas a través del ensayo de inhibición por prepulso (Cui y cols., 2003). Además, estos animales knockout manifiestan menor índice de ansiedad que sus correspondientes controles, mostrando la participación de esta subunidad en dicho fenómeno (Booker y cols., 2007).

- Estudios realizados en animales deficientes de la subunidad β4 muestran una disminución de la ansiedad al compararse con sus controles (Salas y cols., 2003).

- La subunidad α9 interviene en la respuesta coclear (Cordero-Erausquin y cols., 2000). Estudios previos indican una posible co-localización de la subunidad α9 con la subunidad α10 en las células de la cóclea (Elgoyhen y cols., 2001).

2.3. Acciones farmacológicas de la nicotina

Las acciones farmacológicas de la nicotina son muy diversas dada la amplia distribución de los nAChRs en el organismo. Esta sustancia puede provocar, entre otros efectos, taquicardia, vasoconstricción periférica, activación y/o depresión del SNC, menor capacidad funcional cardíaca, aumento de la presión arterial, incremento de plaquetas en sangre y apoplejía (Wang y cols., 2001). Entre estas acciones destacaremos los efectos sobre la cognición, ansiedad, locomoción, transmisión nociceptiva así como las propiedades adictivas de la misma.

2.3.1. Efectos sobre los procesos cognitivos

Diversos estudios en rata (Levin y cols., 1997), conejo (Woodruff-Pak, 2003), mono (Buccafusco y cols., 1999), ratón (Picciotto y cols., 1995), pez zebra (Levin y Chen, 2004) e incluso en humanos (Kumari y cols., 2003) revelan la capacidad que posee la nicotina para mejorar el aprendizaje y la memoria, fundamentalmente la memoria de trabajo y en menor medida la memoria de referencia. El uso de animales deficientes en la subunidad β2 ha confirmado el importante papel que desempeña esta subunidad en la mejora de los procesos cognitivos inducidos por la nicotina. Los ratones knockout de esta subunidad manifiestan una disminución de la memoria en ensayos de evitación pasiva tras la administración de la nicotina (Picciotto y cols., 1995). Con respecto a la atención, se ha evidenciado que la nicotina puede promover mejoras en la misma tanto en humanos (Warburton y cols., 1992) como en animales de experimentación (Mirza y Bright, 2001). Así, se ha observado que la nicotina, a través de la activación de los receptores α4β2 de la corteza prefrontal, mejora la atención en ratas (Hahn y cols., 2003). Debido al papel que juega la nicotina en los procesos de memoria, aprendizaje y atención se ha postulado un papel terapéutico de dicha droga en el trastorno de déficit atencional por hiperactividad o en procesos neurodegenerativos tales como la enfermedad de Alzheimer (Zoli y cols., 1999; Wilens y Decker, 2007).

2.3.2. Efectos sobre la ansiedad

Un hecho bien documentado es el alivio de la ansiedad que sienten los fumadores que se encuentran bajo una situación de estrés tras el consumo de un cigarrillo (Pomerleau, 1986; O'Neill y Parrott, 1992). Además, el aumento de la ansiedad es un síntoma típico que se produce tras el cese del tabaco y que contribuye al mantenimiento del tabaquismo (Koob y Le Moal, 2006). No obstante y sin relacionarse con la abstinencia al tabaco, el uso crónico de la droga también aumenta los niveles de ansiedad del individuo (Picciotto y cols., 2002). La capacidad de la droga para actuar sobre la ansiedad depende del régimen de administración (agudo o crónico), de la ruta de administración (subcutánea, intraperitoneal, intravenosa o inhalada) y del estado en el que se encuentra el sujeto (relajado, estresado o abstinente). En el caso de animales de experimentación también depende de la cepa así como de la dosis de nicotina administrada (Picciotto y cols., 2002). En este sentido, se ha observado que la nicotina produce un efecto ansiolítico a dosis bajas y ansiogénico a dosis más elevadas en ratones (Balerio y cols., 2005). Los factores responsables de la complejidad de este fenómeno son numerosos. De esta forma, los diferentes subtipos de nAChRs existentes, los distintos tiempos de activación y desactivación del receptor y/o la intervención de diferentes neurotransmisores parecen modular esta respuesta. Estudios farmacológicos sugieren que las vías serotonérgicas cerebrales son particularmente importantes en la regulación de las propiedades ansiogénicas de la nicotina mientras que las vías GABAérgicas parecen estar involucradas en los efectos ansiolíticos de la droga (Picciotto y cols., 2002).

2.3.3. Efectos sobre la actividad locomotora

La nicotina es una droga estimulante debido a sus efectos activadores sobre el SNC. De esta forma la nicotina, entre otros efectos, aumenta la frecuencia cardíaca, la liberación de noradrenalina y las capacidades cognitivas (atención, memoria, aprendizaje) (Parrott, 1998). Aunque los estudios en animales muestran que la nicotina induce efectos sobre la actividad locomotora, los estudios realizados en humanos no revelan la capacidad de la nicotina de modificar la locomoción.

La acción de la nicotina sobre la actividad locomotora en el animal de experimentación depende de múltiples factores. Así, la dosis, la especie y cepa de animal, el régimen de administración y la habituación al ambiente de experimentación influyen en el resultado final de este efecto (Picciotto, 2003). La nicotina produce hiperactividad locomotora a dosis bajas en ratones mientras que un tratamiento intermitente a estas mismas dosis induce sensibilización a tal efecto. Sin embargo, dosis más altas producen hipolocomoción y tolerancia a dicho efecto tras su administración crónica en esta misma especie animal (Sparks y Pauly, 1999; Yoo y cols., 2004). Se ha postulado que la DA interviene en los efectos locomotores inducidos por la nicotina (Clarke y cols., 1988).

Las subunidades α4 (Ross y cols., 2000; Labarca y cols., 2001) y α6 (Le y cols., 1999) participan en los efectos locomotores inducidos por la nicotina. Dado que tales subunidades se encuentran en los terminales dopaminérgicos límbicos y estriatales modulando la liberación de DA y regulando el comportamiento motor, se ha postulado que constituyen una diana terapéutica para enfermedades que producen degeneración dopaminérgica como es el caso de la enfermedad de Parkinson (Quik y McIntosh, 2006).

2.3.4. Efectos antinociceptivos

El efecto antinociceptivo de la nicotina se ha demostrado tanto en estudios preclínicos realizados en diversas especies animales (gato, rata y ratón entre otros) como en estudios clínicos (Pomerleau y cols., 1984; Flores, 2000). Debido a la amplia distribución de los nAChRs, la nicotina ejerce su acción antinociceptiva en todos los niveles del sistema de control del dolor. A nivel periférico, estos receptores se localizan en los terminales y en los ganglios de la raíz dorsal de las fibras periféricas tipo C (Genzen y cols., 2001; Young y cols., 2008). A nivel espinal, tanto las interneuronas de la sustancia gelatinosa (láminas II-III) como las interneuronas excitadoras o inhibidoras presentes en láminas más ventrales expresan en su superficie nAChRs (Cordero-Erausquin y cols., 2004; Rashid y cols., 2006). Por otra parte, a nivel supraespinal, encontramos nAChRs en áreas involucradas en la transmisión e integración del dolor tales como el tálamo, la amígdala, la corteza y el hipotálamo. Por último, el núcleo tegmental pedúnculo-pontino, el núcleo del rafe magnus y el locus coeruleus, estructuras que modulan la

actividad del sistema inhibidor descendente del dolor, expresan también nAChRs en sus neuronas (Gotti y cols., 2006). La nicotina ejerce su efecto antinociceptivo en estas estructuras debido a la activación conjunta de diversos sistemas de neurotransmisión tales como el noradrenérgico, GABAérgico, serotonérgico, muscarínico, y opioide entre otros (Iwamoto y Marion, 1993; Berrendero y cols., 2002; Decker y cols., 2004; Cordero-Erausquin y cols., 2004; Rashid y cols., 2006).

Se ha demostrado que la subunidad α4 juega un papel importante en la mediación de los efectos antinociceptivos de la nicotina. Una lesión en las neuronas serotonérgicas del núcleo del rafe magnus provoca una disminución en la densidad de esta subunidad, disminuyendo el efecto antinociceptivo de la droga (Bitner y cols., 1998). Esta función se ha confirmado mediante el uso de ratones knockout de dicha subunidad ya que el efecto antinociceptivo de la nicotina se bloquea en el ensayo de la placa caliente y se reduce en el ensayo de inmersión de la cola en estos animales mutantes (Marubio y cols., 1999). Además, la subunidad β2 también participa del efecto antinociceptivo de la nicotina, como se ha demostrado en estudios realizados en ratones knockout de dicha subunidad (Marubio y cols., 1999). Por tanto, la combinación α4β2 parece ser crucial en la mediación de los efectos antinociceptivos de la nicotina.

Estudios realizados en humanos muestran que la nicotina, administrada en forma de cigarrillos o en parches transdérmicos, aumenta el umbral y la tolerancia al dolor (Pomerleau y cols., 1984; Pauli y cols., 1993; Jamner y cols., 1998; Girdler y cols., 2005). Por otra parte, los fumadores soportan mejor el dolor tras el consumo de un cigarrillo cuando éste no esta desnicotinizado (Pomerleau y cols., 1984). No obstante, el posible uso clínico de la nicotina como analgésico es limitado y presenta muchos inconvenientes tales como: la presencia de un efecto modesto y de corta duración, la manifestación de efectos secundarios (fundamentalmente convulsiones a dosis altas) y el desarrollo de tolerancia tras la administración crónica de la droga. Debido a la existencia de varios subtipos de nAChRs y a la creación de nuevos agonistas sintéticos, existen buenas perspectivas futuras para el desarrollo de compuestos que podrían ser una buena alternativa para su uso clínico como analgésicos (Decker y cols., 2004).

2.3.5. Efectos sobre enfermedades neurológicas psiquiátricas

En diversas enfermedades del SNC se ha demostrado la existencia de alteraciones del sistema colinérgico (Gotti y cols., 2006). Por lo tanto, se ha postulado que la nicotina y otros agonistas nicotínicos pueden ejercer efectos neuromoduladores sobre este tipo de enfermedades al poder facilitar la recuperación de la normalidad en el sistema colinérgico (Gotti y cols., 2006). A continuación exponemos algunos ejemplos sobre este papel de la nicotina en determinados trastornos neurológicos y psiquiátricos:

- *Síndrome de Tourette:* Aunque no se ha demostrado un papel directo de los nAChRs en este síndrome se sabe que la administración de nicotina en forma de goma de mascar o parches mejora el desorden motor y otros síntomas característicos de esta enfermedad. Además, también incrementa la respuesta a los neurolépticos cuando éstos se administran conjuntamente con la nicotina (Gotti y Clementi, 2004).

- *Síndrome de déficit atencional por hiperactividad:* Esta enfermedad se relaciona con un comienzo temprano en el hábito tabáquico al igual que con procesos adictivos a otras drogas. El hecho de que la madre fume durante el embarazo constituye un factor de riesgo para el futuro recién nacido (Gotti y Clementi, 2004). Se ha demostrado que la nicotina administrada en forma de parches produce una modesta reducción de los síntomas de esta enfermedad debido, al parecer, a su capacidad para mejorar procesos cognitivos como la memoria y el aprendizaje así como para mejorar la atención (Wilens y Decker, 2007).

- *Esquizofrenia*: Es conocida la alta prevalencia de consumo de tabaco que existe entre los pacientes esquizofrénicos. Además, los efectos secundarios de los neurolépticos son menores entre la población fumadora. También se sabe que la nicotina modifica algunos síntomas de la enfermedad tales como las alteraciones auditivas (Gotti y Clementi, 2004; Gotti y cols., 2006).

- *Depresión y ansiedad*: Aunque no tan extendido como en pacientes esquizofrénicos, hay evidencias que indican que la prevalencia del consumo de

tabaco es mayor en individuos con depresión que en la población general. Se ha sugerido que la nicotina puede tener cierta acción antidepresiva y estabilizadora del humor en humanos (Gotti y Clementi, 2004). Además, un estudio piloto clínico ha sugerido que la administración transdérmica de la nicotina produce efectos antidepresivos en no fumadores (Salin-Pascual y Drucker-Colin, 1998), aunque dicho efecto no se ha confirmado con posterioridad.

- *Enfermedades neurodegenerativas relacionadas con la edad:* Datos epidemiológicos han sugerido que el tabaco reduce el riesgo de desarrollar la enfermedad de Parkinson y que podría retrasar la aparición de la enfermedad de Alzheimer (Gotti y Clementi, 2004). Debido a las características de la enfermedad de Parkinson, los agonistas nicotínicos pueden proteger contra la degeneración que causa esta enfermedad. Además, la administración de nicotina es capaz de aliviar la sintomatología aguda de la enfermedad (Decker y cols., 2000). Por otro lado, la nicotina puede mejorar los déficits de percepción y de atención visual así como la interpretación de la memoria semántica en pacientes de Alzheimer (Gotti y Clementi, 2004).

2.3.6. Propiedades adictivas de la nicotina

Las propiedades adictivas de la nicotina han sido estudiadas ampliamente en animales de experimentación tales como monos (Sannerud y cols., 1994; Le Foll y cols., 2007), ratas (Corrigall y Coen, 1989; Markou y Paterson, 2001) o ratones (Berrendero y cols., 2002; Bilkei-Gorzo y cols., 2008) mediante las técnicas del condicionamiento espacial, la autoadministración intravenosa o la AEIC. Una clara indicación del potencial adictivo de la droga en humanos es el gran porcentaje de fumadores que continúa fumando aún conociendo las consecuencias negativas de su consumo y el elevado porcentaje de recaída (77%) que aparece en los primeros días de abstinencia al tabaco (Hughes y cols., 1992; Hughes y cols., 2004).

2.3.6.1. Consumo agudo: efectos reforzantes agudos

La nicotina ejerce sus efectos reforzantes a través de la activación de los nAChRs distribuidos a lo largo del sistema mesocorticolímbico. Un factor común

de todas las drogas de abuso es la activación de este sistema, que es crítica en el proceso de adicción (Di Chiara, 2000). Este sistema proyecta desde el ATV al Nac y a la corteza prefrontal como áreas de mayor interés, pero también incluye áreas como la amígdala, caudado-putamen, pálido ventral entre otras (Corrigall y cols., 1992). Aparte del sistema dopaminérgico, otros sistemas de neurotransmisión tales como el colinérgico, glutamatérgico, GABAérgico, opioide, cannabinoide y en menor medida el noradrenérgico y serotonérgico modulan las propiedades reforzantes de la nicotina (Picciotto y cols., 1998; Castañé y cols., 2002; Berrendero y cols., 2002; Picciotto y Corrigall, 2002). Respecto a las subunidades implicadas en este efecto, se ha demostrado que el receptor heteropentamérico formado por la combinación de las subunidades α4β2 media el efecto reforzante de la nicotina (Picciotto y cols., 1998; Marubio y cols., 2003; Walters y cols., 2006). Sin embargo, no se ha llegado a un acuerdo acerca del papel que desempeña la subunidad α7 en este efecto (Schilstrom y cols., 1998b; Grottick y cols., 2000; Markou y Paterson, 2001; Walters y cols., 2006). De hecho, hay autores que indican que este receptor homopentamérico estaría más implicado en el refuerzo agudo que produce la droga que en el proceso adictivo de la misma (Laviolette y Van der Kooy, 2004).

Como hemos comentado anteriormente, la nicotina induce refuerzo debido a la capacidad que posee de liberar DA en el Nac. La liberación final de este neurotransmisor en el Nac es el resultado de un balance entre las proyecciones excitatorias e inhibitorias que hacen sinapsis con las neuronas dopaminérgicas del ATV y de los efectos directos de la droga sobre esas mismas neuronas (Mansvelder y McGehee, 2002). Se han identificado nAChRs en los cuerpos celulares y dendritas de las neuronas dopaminérgicas del ATV, formados mayoritariamente por las subunidades α7 y en menor medida por la combinación α4β2 (Laviolette y Van der Kooy, 2004). El área de mayor importancia en el efecto reforzante inducido por la nicotina es el ATV ya que se ha demostrado que la infusión de mecamilamina en este área bloquea el aumento de los niveles extracelulares de DA inducidos por la droga, efecto que no se produce cuando el antagonista nicotínico se infunde en el Nac (Nisell y cols., 1994).

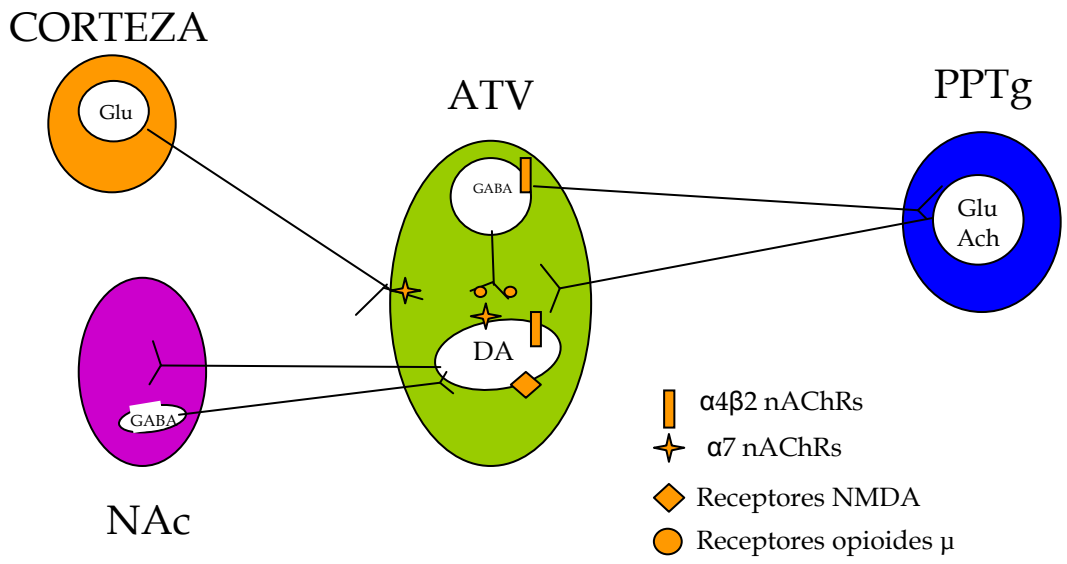


Figura 11. Representación esquemática de las áreas involucradas en el efecto reforzante inducido por la nicotina. CPF: Corteza prefrontal. Nac: Núcleo accumbens. ATV: Área tegmental ventral. PPTg: Núcleo tegmental pedúnculo-pontino. Glu: Neurona glutamatérgica. Ach: Neurona acetilcolinérgica. DA: Neurona dopaminérgica.

Las proyecciones excitatorias que hacen sinapsis con las neuronas dopaminérgicas del ATV provienen tanto de la corteza prefrontal como del núcleo tegmental pedúnculo-pontino. Así, la nicotina activa a los receptores α7 localizados en las aferencias glutamatérgicas procedentes de la corteza prefrontal produciendo un aumento de glutamato y la consecuente estimulación de receptores NMDA localizados en las neuronas dopaminérgicas del ATV (Schilstrom y cols., 1998a; Nomikos y cols., 2000). El bloqueo de los receptores NMDA por el antagonista MK-801 impide la liberación de DA inducida por nicotina en el Nac (Sziraki y cols., 1998). Las aferencias colinérgicas y glutamatérgicas procedentes del núcleo tegmental pedúnculo-pontino también parecen estar participando en el efecto reforzante de la nicotina ya que lesiones del núcleo tegmental pedúnculo-pontino (Picciotto y Corrigall, 2002) o la administración directa del antagonista de las subunidades α4β2 nicotínicas dihidro-beta-eritroidina en esta región (Lanca y cols., 2000) bloquea la autoadministración de nicotina. Además de estas proyecciones excitatorias, la nicotina también estimula directamente las neuronas dopaminérgicas del ATV a través de los receptores α7 y α4β2 (Laviolette y Van der Kooy, 2004).

Las neuronas dopaminérgicas del ATV también se encuentran bajo control inhibitorio, preferentemente por la acción de interneuronas GABA dentro del ATV así como de las proyecciones GABAérgicas procedentes del Nac. Las neuronas

GABAérgicas del ATV son activadas por la nicotina a través de los receptores compuestos por las subunidades α4β2. Sin embargo, estos receptores tienden a desensibilizarse rápidamente durante la exposición repetida de la droga (Mansvelder y McGehee, 2002). Estas mismas neuronas GABAérgicas poseen en su terminal presináptico receptores opioides μ (Bergevin y cols., 2002) que al ser estimulados inhiben la liberación de GABA participando en las propiedades reforzantes de la nicotina. Así, se demostró que los animales deficientes de este receptor opioide no desarrollaban un condicionamiento de plaza a la nicotina (Berrendero y cols., 2002). Al mismo tiempo, las neuronas GABAérgicas del ATV también proyectan al núcleo tegmental pedúnculo-pontino interviniendo en el refuerzo de la droga. Inyecciones sistémicas de γ-vinil GABA (inhibidor de la GABA transaminasa) (Paterson y Markou, 2002) y microinfusiones del agonista GABAB baclofen directamente en el ATV y en el núcleo tegmental pedúnculo-pontino (Corrigall y cols., 2000; Corrigall y cols., 2001) disminuyen la autoadministración de la droga.

Otro sistema que recientemente también se ha visto involucrado en las propiedades reforzantes de la nicotina es el sistema endocannabinoide. Así, el antagonista CB1 rimonabant bloquea la autoadministración de nicotina en ratas (Cohen y cols., 2002). Además, animales deficientes del receptor CB1 (Castañé y cols., 2002) no exhiben un condicionamiento de plaza inducido por nicotina. Diversos estudios clínicos, incluidos en el programa STRATUS, fueron diseñados para evaluar la eficacia de los efectos del rimonabant sobre el cese del consumo del tabaco y su posterior recaída (Cahill y Ussher, 2007). En el programa STRATUS se han reclutado más de 6.500 pacientes en tres ensayos clínicos de fase III a escala mundial. Estos estudios están diseñados para aportar evidencia que respalde su indicación para dejar de fumar y evitar la recaída al proceso adictivo así como para evaluar la reducción en el aumento de peso posterior al abandono del consumo de tabaco. STRATUS-Estados Unidos (EEUU) y STRATUS-Unión Europea (UE) investigan el cese del consumo del tabaco mientras STRATUS-World Wide (WW) incluyeron también el fenómeno de recaída al tabaquismo. STRATUS-EEUU fue el primero de los tres estudios en llevarse a cabo. Sus resultados demuestran eficacia significativa del rimonabant sobre el cese del consumo de tabaco. STRATUS-EU se realizó en 32 centros de Europa y su resultado no revela eficacia significativa del rimonabant. STRATUS-WW se llevó a cabo en 54 centros de todo el mundo y

demuestra eficacia significativa del fármaco en el proceso de recaída al tabaco (Cahill y Ussher, 2007).

2.3.6.2. Consumo crónico

Como ocurre en el caso de otras drogas de abuso, la nicotina administrada de manera crónica desarrolla fenómenos de sensibilización y tolerancia.

2.3.6.2.1. Fenómenos de sensibilización:

La sensibilización, ya sea conductual o bioquímica, inducida por la nicotina es un fenómeno que ha sido objeto de menor estudio si lo comparamos con la sensibilización producida por psicoestimulantes. No obstante, existen datos acerca del desarrollo de una sensibilización psicomotora (Ferrari y cols., 2002; Yoo y cols., 2004) y de una sensibilización bioquímica dopaminérgica (Ferrari y cols., 2002; Picciotto y cols., 2008). El fenómeno de sensibilización involucra múltiples neurotransmisores, receptores y estructuras y no puede ser atribuido a un simple mecanismo (Kalivas y cols., 1993). Algunos estudios indican que para que la nicotina produzca este fenómeno necesita de la participación de los nAChRs, los corticoesteroides, el calcio, las endorfinas y la activación de los receptores NMDA (DiFranza y Wellman, 2007). Hay autores que demuestran que la sensibilización locomotora es producto de una sensibilización dopaminérgica (Ferrari y cols., 2002), mientras que otros autores proponen que son mecanismos independientes (DiFranza y Wellman, 2007). La sensibilización bioquímica a nivel del sistema dopaminérgico es dependiente de la desensibilización que desarrollan las subunidades β2 de los nAChRs localizados en el ATV (Picciotto y cols., 2008). Esta subunidad se expresa principalmente en interneuronas GABAérgicas del ATV que hacen sinapsis con las neuronas dopaminérgicas que proyectan al Nac. Por tanto, la desensibilización de esta subunidad conlleva a una disminución en la liberación de GABA lo que implica un aumento en la actividad de la neurona dopaminérgica (Picciotto y cols., 2008).

2.3.6.2.2. *Fenómenos de tolerancia:*

La nicotina desarrolla tolerancia a respuestas tales como los efectos hipolocomotores, la disminución en la temperatura corporal, la sensibilidad a las convulsiones (Marks y cols., 1986; Miner y Collins, 1988; Collins y cols., 1988;

Benowitz, 2008) y la antinocicepción (Damaj y Martin, 1996), entre otros efectos farmacológicos. Sin embargo, esta tolerancia no se pone de manifiesto para los efectos sobre la memoria y la atención. Además, no todas las respuestas de la nicotina que son susceptibles de desarrollar tolerancia lo hacen de igual modo. En el caso de los humanos se produce tolerancia rápida a la disforia, las náuseas y los vómitos que ocurren tras el primer cigarrillo fumado mientras que los efectos subjetivos y la aceleración cardíaca tardan más tiempo en desarrollar dicho fenómeno (Benowitz, 2008).

Respecto a los mecanismos moleculares responsables de la tolerancia a la nicotina, éstos se caracterizan por dos hechos: la desensibilización y la regulación al alza de los nAChRs. Como hemos comentado anteriormente, los nAChRs se encuentran en 4 estados conformacionales diferentes (ver apartado 2.2.1.1). Cuando los niveles de nicotina son estables en sangre, los nAChRs permanecen en el estado desensibilizado de manera constante debido a la persistente unión del receptor con el agonista. Para compensar esa desensibilización se produce un aumento de los niveles de los nAChRs. Una cuestión todavía controvertida es si el aumento de los sitios de unión de la nicotina tiene como consecuencia un aumento de su actividad o si refleja simplemente un incremento en su estado de desensibilización (Picciotto y cols., 2008).

Los nAChRs poseen diferentes grados de desensibilización y regulación al alza en función de las combinaciones de las subunidades que los forman Así, se ha demostrado que la subunidad β2 es la más susceptible a desensibilizarse y a incrementar su número, fundamentalmente cuando está ensamblada con la subunidad α4 (Giniatullin y cols., 2005). Este dato es de suma importancia ya que la combinación α4β2 es la que media la mayoría de los efectos agudos de la nicotina, incluido sus efectos reforzantes.

Los mecanismos fisiológicos responsables del desarrollo de la tolerancia son claramente reversibles. De esta manera, el primer cigarrillo de la mañana resulta ser el más reforzante para los fumadores, debido a que todos los nAChRs se encuentran en estado activo tras su recuperación a lo largo de la noche (Russell, 1989).

2.3.6.3. Abstinencia aguda

El síndrome de abstinencia a la nicotina posee un componente tanto somático como emocional y se ha descrito en humanos (Hughes y cols., 1991), en ratas (Hildebrand y cols., 1997) y en ratones (Berrendero y cols., 2002). En humanos, la abstinencia física de la nicotina se caracteriza por síntomas somáticos tales como la bradicardia, alteraciones gastrointestinales, hiperalgesia y aumento del apetito. Con respecto a los síntomas motivacionales negativos, fundamentalmente se ha descrito depresión, disforia, irritabilidad, ansiedad, frustración, dificultad de concentración y reactividad a los estímulos ambientales (Hughes y cols., 1991; Kenny y Markou, 2001). Estos síntomas aparecen en las 6-12 primeras horas después del cese del consumo, alcanzando el pico máximo a los 1-3 días, y regresando a valores normales dentro de los 7-30 días tras el cese en el consumo de tabaco (Hughes, 1992). Con respecto a los roedores, los principales signos somáticos observados son: constricciones abdominales, ptosis, piloerección, lamido de genitales, intento de huida, temblor de patas y castañeteo de dientes (Malin y cols., 1992). El componente emocional negativo asociado a la abstinencia a la nicotina se ha demostrado claramente en animales de experimentación mediante la AEIC, y el condicionamiento espacial (Kenny y Markou, 2001).

Los nAChRs localizados tanto a nivel periférico como a nivel central median los signos somáticos y motivacionales de la abstinencia de nicotina, siendo los expresados a nivel del SNC los que participan en las manifestaciones emocionales negativas de la misma (Kenny y Markou, 2001). Con respecto a las subunidades que componen los nAChRs se ha demostrado que la α4, β4 y α7 están involucradas en mediar la fase de abstinencia de nicotina mientras que las β2 no participan en ningún aspecto de la misma (Kenny y Markou, 2001; Salas y cols., 2004; Grabus y cols., 2005).

Como ocurre con otras drogas de abuso, la disminución de la actividad dopaminérgica tanto en el Nac, la corteza prefrontal y la amígdala son las responsables de la disforia y ansiedad característica de este periodo (Kenny y Markou, 2001). También, se ha observado una disminución de la actividad serotonérgica en áreas como el núcleo del rafe medial (Benwell y Balfour, 1979; Benwell y cols., 1990) y un aumento del CRF en el núcleo central de la amígdala (Sarnyai y cols., 2001). Todas estas modificaciones parecen relacionarse con el

estado disfórico, la impulsividad, la irritabilidad y la ansiedad que se manifiestan durante la abstinencia nicotínica (Koob y Le Moal, 2006).

2.3.6.4. Abstinencia a largo plazo: recaída al proceso adictivo

El tabaquismo, al igual que otras adicciones es una enfermedad crónica recurrente caracterizada por frecuentes recaídas después de periodos más o menos largos de abstinencia. Se considera que un 95-97% de fumadores recae en los 6-12 primeros meses después del cese del consumo de tabaco, aunque el mayor porcentaje de recaídas (77%) aparece en los 2 primeros días de abstinencia (Hughes y cols., 1992; Hughes y cols., 2004).

En modelos animales se ha demostrado ampliamente que los tres estímulos que inducen recaída al proceso adictivo de una droga (estímulos asociados a la toma de la droga, nuevo contacto con la droga y estrés), también producen recaída cuando el animal ha sido entrenado a autoadministrarse nicotina (Chiamulera y cols., 1996; Dravolina y cols., 2007; Bilkei-Gorzo y cols., 2008). Sin embargo, de estos tres factores, los estímulos asociados a la toma de nicotina ha sido el factor más eficaz para inducir una recaída a la búsqueda de la droga. No obstante, algunos estudios han demostrado también recaída a la nicotina por nuevo contacto con la droga (Shaham y cols., 1997; Dravolina y cols., 2007) y por estrés (Bilkei-Gorzo y cols., 2008).

El motivo por el cual se postula una mayor eficacia de los estímulos asociados al consumo de la nicotina para inducir recaída es debido a la hipótesis de que el mantenimiento de la adicción y la posterior búsqueda de la droga después de la extinción del comportamiento adictivo se deben mayoritariamente a factores no relacionados de manera directa con la droga, y en menor proporción, a las propiedades reforzantes de la nicotina (Butschky y cols., 1995; Caggiula y cols., 2001). Este hecho ha sido demostrado en diversos estudios en humanos (Butschky y cols., 1995; Shahan y cols., 1999; Ross y cols., 2000) y en animales de experimentación (Caggiula y cols., 2001; Lesage y cols., 2004; Liu y cols., 2006). En la figura 12 podemos observar que los estímulos asociados al consumo de la nicotina, después de la extinción de un comportamiento de autoadministración, provocan una mayor recaída a dicho comportamiento que cuando el animal vuelve a tener contacto únicamente con la nicotina (Caggiula y cols., 2001). La recaída es

aún mayor cuando se presentan conjuntamente los estímulos asociados y la nicotina tras el periodo de extinción.

Para que los factores no nicotínicos induzcan un proceso de recaída es necesario la participación de los nAChRs (Liu y cols., 2007). Se ha demostrado que la desensibilización de la subunidad β2 contribuye a que los estímulos asociados al consumo de nicotina adquieran un valor motivacional que por sí mismos no poseen, base esencial para que pueda producirse el proceso de recaída (Brunzell y cols., 2006; Picciotto y cols., 2008). Además de los nAChRs, también participan en el proceso de recaída por la presentación de estímulos los receptores GABAB y los receptores cannabinoides CB1 (Cohen y cols., 2005; Paterson y cols., 2005).

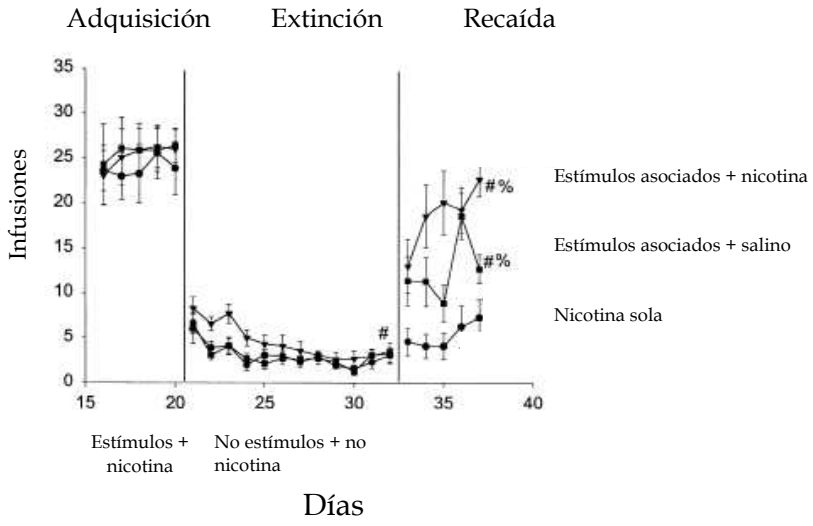


Figura 12. Media del número de infusiones realizado por ratas en el periodo de entrenamiento de la conducta operante de autoadministración de nicotina, en el periodo de extinción de dicha conducta y en la recaída de la búsqueda de la droga. # Indica cambios significativos entre sujetos con su fase anterior ($p < 0.05$). % Indica diferencias significativas con respecto al grupo de nicotina sola ($p < 0.05$) (modificado de Caggiula y cols., 2001).

3. Participación del sistema opioide en los efectos farmacológicos de la nicotina

3.1. Sistema opioide endógeno

Este sistema endógeno consiste en una serie de familias de péptidos opioides que actúan sobre tres tipos diferentes de receptores opioides.

3.1.1. Receptores opioides y sus ligandos

3.1.1.1. Clasificación y estructura

Se han clonado tres tipos distintos de receptores opioides en animales de experimentación y en humanos: mu (MOR o μ), delta (DOR o δ) y kappa (KOR o κ) (Kieffer, 1999). Se han definido al menos dos subclases de receptores μ (μ1, μ2) y δ (δ1, δ2) y tres subclases de receptores κ (κ1, κ2, κ3) generados por modificaciones post-transcripcionales (Minami y Satoh, 1995), aunque la relevancia de dichos subtipos no ha podido ser clarificada. También se ha descrito la formación de heterodímeros, más concretamente la existencia de heterodímeros de tipo δ/κ y μ/δ. Estas variantes y asociaciones representan una nueva estructura funcional con unas propiedades diferentes a la de los receptores originales que podrían explicar algunas de las respuestas farmacológicas de los opioides que no se corresponden con la activación clásica de los receptores μ, δ o κ (Jordan y Devi, 1999; Gomes y cols., 2000). Dentro de esta misma familia de receptores, se ha descubierto la presencia en nuestro organismo del receptor nociceptina/orfanina (NOP o ORL1), pero se le considera que pertenece a un sistema antiopioide por las acciones farmacológicas derivadas de su activación (Anton y cols., 1996).

Los receptores opioides pertenecen a la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G que se caracterizan por la presencia de siete dominios transmembrana. Los receptores opioides, fundamentalmente a través de la activación de proteínas G_i/G_o, inhiben la actividad adenilciclasa con la consiguiente reducción de los niveles de AMPc y de la actividad PKA, lo que resulta en una disminución de la fosforilación de efectores intracelulares. También inducen una modificación de la actividad de las vías de señalización de la fosfolipasa C y de las MAP quinasas. Debido a sus acciones sobre estas proteínas G y sistemas de señalización

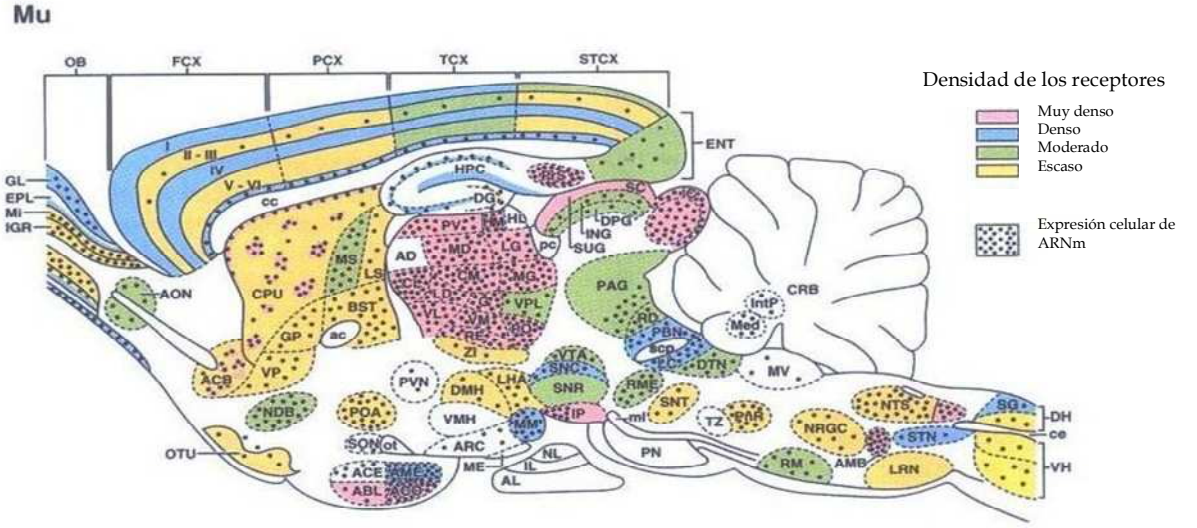
intracelular se produce seguidamente una facilitación del cierre de los canales de calcio, con lo cual se reduce la liberación de neurotransmisores a nivel presináptico, o la apertura de canales de potasio. Este último hecho provoca una hiperpolarización de la membrana y como consecuencia una reducción de la actividad de la neurona. Por tanto, son receptores que median sobretodo acciones inhibitorias (Gutstein y Akil, 2001; Álvarez y Farré, 2005).

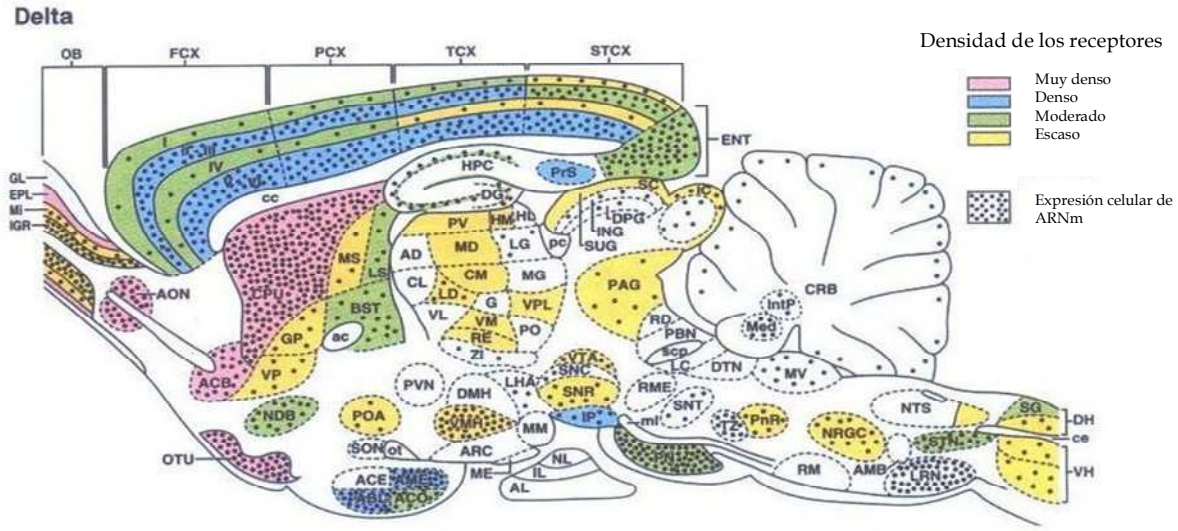
3.1.1.2. Distribución en el organismo

Los receptores opioides se encuentran de manera amplia distribuidos tanto en el SNC como en los tejidos periféricos. Estudios autorradiográficos han esclarecido la localización de estos receptores en nuestro organismo (figura 13).

Los receptores μ son los que presentan una distribución más amplia en el cerebro, principalmente en estructuras relacionadas con el control nociceptivo, la motricidad y la motivación. Estos receptores se localizan en caudado putamen, globo pálido y pálido ventral, núcleo del lecho de la estría terminal, tálamo, amígdala medial y cortical, núcleo interpeduncular, núcleo del rafe y locus coeruleus, entre otras estructuras. En el estriado estos receptores se distribuyen en forma de agrupaciones o parches. En comparación con los receptores μ, los receptores δ tienen una distribución más restringida en el cerebro. Así, se localizan en regiones tales como la neocorteza, estriado (donde se distribuyen de manera densa y homogénea), tubérculo olfatorio, globo pálido y pálido ventral, núcleo septal, amígdala, núcleo pontino y banda diagonal de broca. Finalmente, los receptores κ se encuentran fundamentalmente en el estriado, tubérculo olfatorio, núcleo del lecho de la estría terminal, hipotálamo dorso y ventromedial, amígdala, sustancia gris periacueductal, núcleo del rafe y locus coeruleus (Mansour y cols., 1995).

A nivel de la médula espinal, aproximadamente el 60% de los receptores opioides que se expresan son μ, mientras que el 21% son δ y el 19% κ. Los receptores opioides μ se expresan mayoritariamente en la sustancia gelatinosa y en menor proporción en láminas más profundas (láminas III, IV, V y VIII). Los receptores δ se localizan preferentemente en la lámina I del asta dorsal de la médula espinal. Los receptores κ, al igual que los receptores μ, se expresan en su mayoría en la sustancia gelatinosa.


Mu
OB
FCX
PCX
TCX
STCX
Densidad de los receptores
Muy denso
Denso
Moderado
Escaso
Expresión celular de ARNm
ENT
GL
EPL
Mi
IGR
AON
OTU
CPU
CRB
PAG
HPC
DG
PV
MD
LG
AD
CM
MG
VPL
VL
VM
RE
ZI
PO
BST
GP
ac
VP
ACB
NDB
POA
PVN
DMH
LHA
VMH
MM
ARC
ME
SON
ot
ACE
ABL
AL
NL
IL
VTA
SNC
SNR
IP
RME
SNT
TZ
PnR
PN
NRGC
NTS
SG
STN
RM
AMB
LRN
DH
ce
VH
IntP
Med
PBN
scp
LC
DTN
MV
SC
IC
DPG
ING
SUG
PrS
cc
I
II - III
IV
V - VI


Delta
OB
FCX
PCX
TCX
STCX
Densidad de los receptores
Muy denso
Denso
Moderado
Escaso
Expresión celular de ARNm
ENT
GL
EPL
Mi
IGR
AON
OTU
CPU
CRB
PAG
HPC
DG
PrS
PV
MD
LG
AD
CL
CM
MG
VPL
VL
VM
RE
ZI
PO
BST
GP
ac
VP
ACB
NDB
POA
PVN
DMH
LHA
VMH
MM
ARC
ME
SON
ot
ACE
ABL
AL
NL
IL
VTA
SNC
SNR
IP
RME
SNT
TZ
PnR
PN
NRGC
NTS
SG
STN
RM
AMB
LRN
DH
ce
VH
IntP
Med
PBN
scp
LC
DTN
MV
SC
IC
DPG
ING
SUG
cc
I
II - III
IV
V - VI

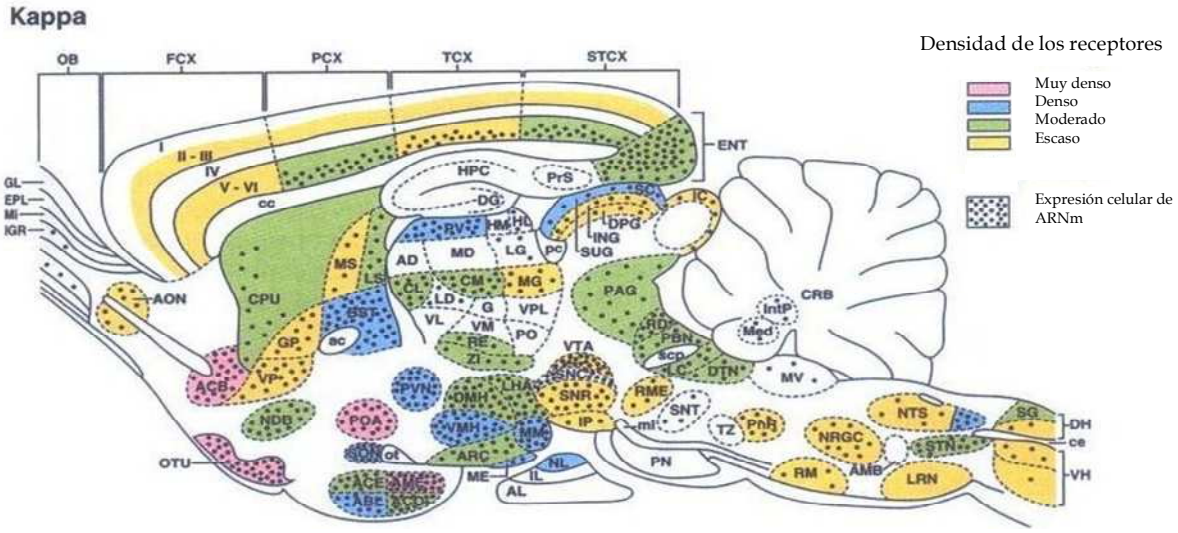

Kappa
OB
FCX
PCX
TCX
STCX
Densidad de los receptores
Muy denso
Denso
Moderado
Escaso
Expresión celular de ARNm
ENT
GL
EPL
Mi
IGR
AON
OTU
CPU
CRB
PAG
HPC
DG
PrS
RV
AD
MD
LG
CL
LD
CM
MG
VPL
VL
VM
RE
ZI
PO
BST
GP
ac
VP
ACB
NDB
POA
PVN
DMH
LHA
VMH
MM
ARC
ME
SON
ot
ACE
ABL
AL
NL
IL
VTA
SNC
SNR
IP
RME
SNT
TZ
PnR
PN
NRGC
NTS
SG
STN
RM
AMB
LRN
DH
ce
VH
IntP
Med
PBN
scp
LC
DTN
MV
SC
IC
DPG
ING
SUG
cc
I
II - III
IV
V - VI

Figura 13. Distribución regional de los receptores opioides endógenos en el cerebro de rata. Abreviaturas: ABL, amígdala basolateral; ac, comisura anterior; ACB, núcleo accumbens; ACE, amígdala central; amígdala cortical; AD, tálamo anteriodorsal; AL, lóbulo anterior, pituitaria; AMB, núcleo ambiguo; AME, amígdala medial; AON, núcleo olfatorio anterior; ARC, núcleo arcuato, hipotálamo; BST, núcleo de la estría terminalis; cc, cuerpo calloso; ce, canal central; Cl, tálamo centro lateral; CM, tálamo medial; CP, caudado putamen; CRB, cerebelo; DG, giro dentado; DH, asta dorsal de la médula espinal; DMH, hipotálamo mediodorsal; DPG, lámina profunda gris, superior colículo; DTN, núcleo tegmental dorsal; ENT, entorinal corteza; EPL, lámina plexiforme externa, bulbo olfatorio; FCX; corteza frontal; G núcleo del tálamo gelatinoso; GL, lámina glomerular, bulbo olfatorio; GP, globo pálido; HL, habénula lateral; HM, habénula medial; HPC, hipocampo; IC, colículo inferior; IGR, lámina intermedio granular, bulbo olfatorio; IL, lóbulo intermedio, pituitaria; ING, lámina gris intermedia, colículo superior; IntP; núcleo cerebelar interpuesto; IP, núcleo interpeduncular; LC, locus coeruleus; LD, tálamo laterodorsal; LG, tálamo genuculado lateral; LHA, área hipotalámica lateral; LRN; núcleo lateral reticular; LS, septum lateral; MD, tálamo dorsomedial; ME, eminencia media; Med, núcleo cerebelar medial; MG; geniculado medial; Mi, capa celular mitral, bulbo olfatorio; ml, medial leminisculo; MM, núcleo mamilar medial; MS; septum medial; MV; núcleo vestibular medial; NDB, núcleo banda diagonal; NL, lóbulo neurona pituitaria; NRGC, núcleo reticular gigantocelular; NST, núcleo del tracto solitario; OB, bulbo olfatorio; ot, tracto óptico; OTU, tubérculo olfatorio; PaG sustancia gris periacueductal; PBN, núcleo parabranquial, pc, comisura posterior; PCX, corteza parietal; PN, puente; PnR, puente reticular; PO, tálamo posterior; POA, área preóptica; PrS, presubiculum; PV, tálamo paraventricular; PVN, hipotálamo paraventricular; RD, rafe dorsal; RE, tálamo reuniens; RM, rafe magnus; RME, rafe medial; SC, colículo superior; scp, pedúnculo cerebelar superior; SG, sustancia gelatinosa; SNC, sustancia negra pars compacta; SNR, sustancia negra pars reticulata; SNT, núcleo trigémino sensorial; SON, núcleo supraóptico; STCX, corteza estriada; SNT, núcleo trigémino espinal, SUG, lámina gris superficial, cotículo superior; TCX, corteza temporal; TZ, núcleo trapezoide; VH, asta ventral, espina dorsal; VL, tálamo ventrolateral, VM, tálamo ventromedial; VMH, hipotálamo ventromedial; VP, pálido ventral; VPL, tálamo ventroposterior lateral; VTA, área tegmental ventral; ZI, zona incierta (modificado de Mansour y cols., 1995).

Los receptores μ, δ y κ se expresan en un 76%, 61% y 53% a nivel presináptico en la médula espinal. No obstante, estos receptores opioides también se localizan a nivel postsináptico en las láminas de la región ventral de la médula espinal. El significado fisiológico de esta localización parece ser la diferente mediación de estímulos nociceptivos, Así, los receptores μ median los estímulos dolorosos mecánicos, térmicos y químicos de alta intensidad, los receptores δ el dolor de tipo térmico y químico mientras que no se conoce de manera precisa la naturaleza de los estímulos dolorosos que median los receptores κ (Yaksh T.L., 1993; Mansour y cols., 1994; Schafer y cols., 1994; Maekawa y cols., 1994).

Los receptores opioides se expresan también a nivel del sistema nervioso periférico modulando diversas funciones fisiológicas. De esta forma, se encuentran a nivel de fibras nerviosas sensoriales y simpáticas de la piel y de las articulaciones,

en los plexos del intestino, en la vejiga urinaria y los conductos deferentes, en las células endocrinas y en el sistema inmune (Stein C., 1993; Puig y Montes A, 1998).

3.1.1.3. Ligandos endógenos

En condiciones fisiológicas, los receptores opioides son activados por un conjunto de compuestos endógenos denominados péptidos opioides. Actualmente se conocen tres precursores que dan lugar a tres familias diferentes de dichos péptidos: la proopiomelanocortina (POMC), la proencefalina (PENK) y la prodinorfina (PDYN) (Álvarez y Farré, 2005; Maldonado y Valverde, 2005).

Tabla 2. Principales péptidos opioides, sus precursores y sitios de unión.

Precursor peptídico	Péptidos opioides	Receptor preferencial	μ	δ	κ
POMC	β-endorfina	μ	+++	++	
PENK	Met-encefalina	δ	++	+++	
	Leu-encefalina	δ	++	+++	
PDYN	Dinorfina A	κ	++		+++
	Dinorfina B	κ	+	+	+++
	α-neoendorfina	κ	+	+	+++
	β-neoendorfina	κ	+	+	+++
	Leu-encefalina	δ	++	+++	

(+) Indica la potencia para activar cada receptor.

El péptido opioide derivado de la POMC es la β-endorfina, que posee alta afinidad por los receptores μ y δ. Los péptidos opioides derivados de la PENK son principalmente la met-encefalina y la leu-encefalina, que activan preferentemente los receptores δ y en menor grado los μ. Estos péptidos se diferencian tan sólo en un único aminoácido (metionina o leucina) localizado en el extremo N-terminal. Otros péptidos opioides derivados de este precursor son el péptido F, el péptido E, el péptido B y la sinencefalina entre otros (Hedner y Cassuto, 1987). Los derivados de la PDYN son las dinorfinas (A y B) y las neoendorfinas (α y β), ambos con afinidad preferencial por los receptores κ, y la leu-encefalina (tabla 2). Se ha

descrito también un grupo de péptidos opioides de gran afinidad para los receptores μ (endomorfinas 1 y 2) (Zadina y cols., 1997) aunque la ausencia en el genoma humano de la secuencia correspondiente a dichos péptidos pone en duda su posible existencia como moléculas endógenas. El péptido anti-opioide derivado de la pronociceptina/orfanina FQ es la nociceptina/orfanina Q, que es un péptido con alta afinidad por el receptor de la nociceptina/orfanina. Las propiedades farmacológicas de este péptido son opuestas a las inducidas por los péptidos opioides clásicos (Minami y Satoh, 1995; Maldonado y Valverde, 2005; Civelli, 2008) (tabla 2).

3.1.1.4. Ligandos exógenos

Los ligandos exógenos pueden clasificarse en naturales (derivados del opio), semisintéticos o sintéticos dependiendo de su procedencia. También pueden clasificarse en agonistas puros, agonistas-antagonistas, agonistas parciales y antagonistas puros en función de la naturaleza de su interacción con los receptores opioides. En la tabla 3 se hace un resumen de los ligandos exógenos opioides más comunes.

3.1.2. Procesos fisiológicos y fisiopatológicos en los que participa el sistema opioide

El sistema opioide endógeno está implicado en comportamientos esenciales para la supervivencia de las especies como son las respuestas al dolor y al estrés, así como en el control de la motivación y refuerzo, la motricidad y funciones adaptativas homeostáticas como la ingesta alimentaria y la regulación de la temperatura. Este sistema endógeno también controla funciones del sistema nervioso autónomo como la respiración y la motilidad gastrointestinal. Además, también participa en la modulación de las respuestas de tipo inmunitario (Olson y cols., 1991; Bodnar y Hadjimarkou, 2003). A continuación se detallan dos de las funciones más características de este sistema que están directamente relacionadas con el trabajo experimental realizado en la presente Tesis Doctoral: el control del dolor y la motivación y refuerzo inducido por drogas.

Tabla 3. Ejemplos de los ligandos exógenos de los receptores opioides.

Fármaco/receptor	**μ**	**δ**	**κ**
Morfina	Ag +++	Ag +	Ag +
Heroína	Ag +++		
Metadona	Ag +++	Ag +	
Fentanilo	Ag +++	Ag +	
Pentazocina	An -	Ag +	Ag +++
DPDPE	Ag +	Ag +++	
Deltorfina I		Ag +++	
Salvinorina A			Ag+++
U-50,488H			Ag +++
Buprenorfina	Ap +++		An --
Naloxona	An ---	An --	An -
Naltrexona	An ---	An --	An -
Naltrindol		An ---	
Nor-binaltorfimina			An ---

Ag: agonista; Ap: agonista parcial; An: antagonista. (+) indica la potencia para activar cada receptor, (-) indica la potencia para bloquear cada receptor (modificado de Álvarez y Ferre, 2005).

3.1.2.1. Control del dolor

Debido a la amplia distribución del sistema opioide endógeno en el organismo, este sistema controla la nocicepción tanto a nivel periférico como a nivel central. A nivel periférico y durante el proceso de inflamación, las células inmunes de los tejidos inflamados sintetizan péptidos opioides que se unirán a sus correspondientes receptores localizados en las terminaciones de los nervios periféricos, disminuyendo la excitabilidad nerviosa y pudiendo modular la liberación de mediadores inflamatorios (Rittner y cols., 2008).

A nivel central, el sistema opioide endógeno regula la transmisión nociceptiva a nivel medular, en los centros supraespinales del control del dolor así como en la vía descendente del dolor. La primera acción del sistema opioide endógeno se produce a nivel espinal inhibiendo la transmisión nociceptiva de las fibras nerviosas Aδ y C que penetran en la médula espinal. Los receptores opioides se expresan presinápticamente en los terminales de estas fibras nerviosas modulando

la liberación de neurotransmisores excitatorios tales como la sustancia P, glutamato y péptido relacionado con el gen de la calcitonina, entre otros (Minami y Satoh, 1995; Flórez J, 2007). Además, estos receptores también se localizan a nivel postsináptico en neuronas espinales de la transmisión nociceptiva, como las neuronas espinotalámicas. La activación de estos receptores produce la inhibición de la actividad de estas neuronas pertenecientes a la vía ascendente del dolor A nivel supraespinal, los receptores opioides y sus correspondientes ligandos están presentes en áreas como la amígdala, tálamo, hipotálamo, corteza y sustancia gris periacueductal, entre otras (Mansour y cols., 1995). El sistema opioide endógeno inhibe la transmisión nociceptiva procedente de la vía ascendente del dolor que se integra a nivel talámico. Además, inhibe el procesamiento vegetativo del dolor al actuar en las vías talámicas que proyectan al hipotálamo, área con gran contenido de β-endorfina (Serrano-Atero M y cols., 2002; Flórez J, 2007). El sistema opioide endógeno controla también las proyecciones que parten del tálamo hacia la corteza, área donde se integra de manera consciente la información nociceptiva. Además, este sistema actúa en los abundantes receptores localizados en el sistema límbico atenuando la percepción desagradable y angustiosa asociada al dolor (Guyton A., 1997; Flórez J, 2007). Por tanto, el sistema opioide endógeno deprime la capacidad de integrar la información nociceptiva y disminuye el componente emocional del dolor. Por último, el sistema opioide también actúa en el sistema descendente del dolor. En este sistema existen células de diversa naturaleza (células *on* y células *off)* que controlan la entrada de la información nociceptiva de la vía ascendente del dolor. Se considera que la función de las células *on* es la de facilitar la transmisión nociceptiva, mientras que las células *off* la inhiben. El sistema opioide endógeno regula la actividad de estas células de manera que inhibe las células *on* y activa las células *off* (Minami y Satoh, 1995; Guyton A., 1997; Flórez J, 2007). Así, muchas neuronas de la sustancia gris periacueductal secretan en sus terminaciones encefalinas, dinorfinas y α-neoendorfinas además de hacer sinapsis con proyecciones hipotalámicas ricas en β-endorfina (Guyton A., 1997; Serrano-Atero M y cols., 2002). Las neuronas encefalinérgicas de la sustancia gris periacueductal hacen sinapsis con neuronas serotonérgicas del núcleo del rafe magnus que proyectan al asta dorsal de la médula espinal. A su vez, éstas actúan sobre neuronas encefalinérgicas que se encuentran a nivel de las astas dorsales donde se cree que la encefalina produce inhibición presináptica de las fibras para el

dolor Aδ y C que penetran en la médula espinal. Por otra parte, los terminales noradrenérgicos que parten del locus coeruleus y proyectan en el asta dorsal de médula espinal son regulados también por el sistema opioide endógeno (Serrano-Atero M y cols., 2002). El resultado final es la inhibición de la transmisión nociceptiva por la vía ascendente del dolor, la modificación de la interpretación de la información nociceptiva y la activación del sistema inhibidor descendente.

Además de la capacidad antinociceptiva de las dinorfinas, estos péptidos poseen en determinadas situaciones efectos pronociceptivos a nivel espinal. De esta forma, el aumento de este péptido a nivel espinal como consecuencia de un tratamiento crónico, ya sea de agonistas opioides o cannabinoides (Vanderah y cols., 2000; Gardell y cols., 2002), se ha relacionado con el desarrollo de hiperalgesia (aumento en la percepción de un estímulo doloroso) y alodinia (dolor producido por un estímulo que normalmente no lo causa) (Laughlin y cols., 2001). Esta capacidad pronociceptiva parece ser debida a la activación de los receptores NMDA por las dinorfinas (Laughlin y cols., 2001). Además, este aumento de las dinorfinas espinales origina a su vez un incremento de la liberación de neurotransmisores excitatorios tales como glutamato, aspartato y sustancia P que contribuye a amplificar la señal sensorial dolorosa (Ossipov y cols., 2003).

3.1.2.2. Motivación y refuerzo inducido por drogas

Se ha demostrado que el sistema opioide endógeno es necesario para que la morfina, nicotina, THC o alcohol puedan ejercer sus efectos placenteros (Tanda y Di, 1998; Berrendero y cols., 2002; Gerrits y cols., 2003). Así, animales deficientes del receptor opioide μ no manifiestan un condicionamiento de preferencia de plaza a la morfina (Matthes y cols., 1996), la nicotina (Berrendero y cols., 2002) y el THC (Ghozland y cols., 2002). Asimismo, la autoadministración de morfina (Becker y cols., 2000) y alcohol (Roberts y cols., 2000) se bloquea en animales knockout para este receptor. No obstante, la participación del sistema opioide endógeno en los efectos reforzantes primarios de la cocaína es a día de hoy un tema controvertido. Se ha demostrado que la inactivación de los receptores opioides μ, ya sea mediante la administración del antagonista naloxona (Kuzmin y cols., 1997a) o la eliminación del receptor (Becker y cols., 2002), disminuye el efecto reforzante de la cocaína en el animal de experimentación aunque no se bloquea de manera completa dicha respuesta. Así, se observó un desplazamiento hacia la derecha de la curva dosis

respuesta en forma de campana tanto en la autoadministración intravenosa como en el condicionamiento de preferencia de plaza inducidos por la cocaína indicando una menor sensibilidad para los efectos reforzantes de la droga en estos animales.

Con respecto a los receptores opioides κ, la administración del agonista U-50, 488H produce una disminución en la cantidad de cocaína o morfina consumida por el animal de experimentación en un paradigma de autoadministración (Kuzmin y cols., 1997b). Por otro lado, animales deficientes del gen que codifica a PDYN muestran un desplazamiento hacia la izquierda de la curva dosis respuesta en forma de campana en el paradigma de autoadministración intravenosa del agonista sintético de los receptores cannabinoides CB1, WIN 55, 212-2, (Mendizabal y cols., 2006). Estos experimentos revelan que el sistema κ/dinorfina modula los efectos aversivos o disfóricos de las drogas de abuso.

La participación de los receptores opioides μ y κ en los efectos motivacionales de ciertas drogas de abuso está bien demostrada por la literatura científica. Sin embargo, existe menos información acerca del papel de los receptores opioides δ en los efectos reforzantes de las drogas y la escasa información disponible resulta confusa y contradictoria (Suzuki y cols., 1994; De Vries y cols., 1995). Diversos estudios muestran la participación de los receptores opioides δ en el desarrollo del condicionamiento de preferencia de plaza para drogas como cocaína (Suzuki y cols., 1997), morfina (Suzuki y cols., 1994) o alcohol (Matsuzawa y cols., 1999). Sin embargo, esta participación de los receptores opioides δ en las propiedades reforzantes de las drogas de abuso no ha sido corroborada por otros grupos de investigación (De Vries y cols., 1995; David y cols., 2008).

El mecanismo por el cual el sistema opioide endógeno regula las propiedades reforzantes de las drogas está relacionado con la distribución anatómica de los receptores y de las neuronas que contienen péptidos opioides. Se ha observado que los receptores opioides μ se localizan preferentemente de manera presináptica en las neuronas GABAérgicas que hacen sinapsis con las neuronas dopaminérgicas del ATV y que proyectan al Nac. El resultado de la activación de estos receptores es la inhibición de las neuronas GABAérgicas (Johnson y North, 1992; Spanagel y cols., 1992) (figura 14). La consecuencia de esta inhibición es una reducción del efecto inhibitorio sobre las neuronas dopaminérgicas del ATV y por consiguiente, un aumento de la liberación de DA en el Nac. Por otro lado, el sistema κ/dinorfina se expresa fundamentalmente a nivel del Nac y no del ATV (Mansour y cols.,

1994). La activación presináptica de los receptores opioides κ disminuye la concentración extracelular de DA en el Nac por dos mecanismos: (1) inhibiendo la liberación de DA y (2) aumentando la recaptación de DA a través de un incremento de la activación de los transportadores de DA (DAT) (Spanagel y cols., 1992; Shippenberg y cols., 2007) (figura 14). Estas acciones demuestran como la activación de los receptores opioides μ y κ ejercen efectos opuestos sobre la liberación de DA y por tanto sobre los efectos motivacionales de las drogas de abuso. De esta forma, mientras que los receptores opioides μ participan en los efectos reforzantes de las drogas, los receptores opioides κ parecen mediar los efectos aversivos o disfóricos asociados al consumo de las mismas.

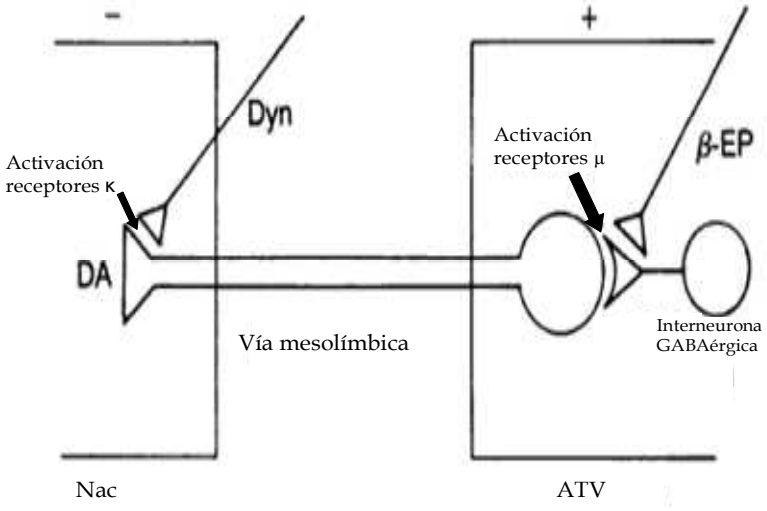


Figura 14. Modelo de la regulación de la liberación de DA a nivel del núcleo accumbens por la activación del sistema opioide endógeno. Abreviaturas: Dyn: neuronas dinorfínicas; β-EP: neuronas β-endorfínicas; DA: dopamina; ATV: área tegmental ventral; Nac: núcleo accumbens (modificado de Spanagel y cols., 1992).

El sistema opioide endógeno no sólo modula los efectos reforzantes agudos de las drogas de abuso. Se ha postulado que diversos factores que contribuyen a la vulnerabilidad de sufrir una adicción (factores genéticos o ambientales) ejercen su efecto a través de este sistema endógeno (Gerrits y cols., 2003; Dahl y cols., 2005; Xuei y cols., 2006; Munafo y cols., 2007). Además, el sistema opioide parece estar muy involucrado en el hábito patológico del consumo, más concretamente en el "deseo intenso" por la droga (Gerrits y cols., 2003). En este sentido, se ha

demostrado que antagonistas opioides como la naltrexona son capaces de reducir el deseo por el alcohol que sienten las personas adictas a esta droga (Volpicelli y cols., 1992).

Durante la fase de abstinencia aguda, el sistema κ/dinorfina localizado en el Nac modula parte de la sintomatología emocional negativa característica de esta etapa de la adicción. Así, el estado de disforia y/o aversión característica de esta fase es debido en parte a la disminución dopaminérgica accumbal que se produce como consecuencia de la sobreactivación del sistema κ/dinorfina tras la retirada de la droga del organismo (Shippenberg y cols., 2007). Hay autores que consideran que la administración de un antagonista de los receptores opioides k durante esta fase de la adicción eliminaría parte de la sintomatología emocional negativa producida por el sistema κ/dinorfina (Shippenberg y cols., 2007).

Por último, diversos estudios han mostrado que la recaída al proceso adictivo inducida por estímulos asociados al consumo de la droga y por un nuevo contacto con la misma está asociada a los receptores opioides μ y δ, mientras que la recaída inducida por estrés estaría más relacionada con el sistema κ/dinorfina. Así, el antagonista opioide μ naltrexona es capaz de inhibir la recaída por estímulos asociados al consumo de drogas como heroína (Shaham y Stewart, 1996), nicotina (Liu y cols., 2008), cocaína (Burattini y cols., 2008), metamfetamina (Anggadiredja y cols., 2004) y alcohol (Ciccocioppo y cols., 2002). Además, este antagonista también bloquea la recaída por nuevo contacto con heroína (Shaham y Stewart, 1996) y alcohol (Ciccocioppo y cols., 2002). Sin embargo, la naltrexona no modifica la recaída a estas drogas cuando ésta es inducida por estrés (Shaham y Stewart, 1996; Ciccocioppo y cols., 2002). También se ha demostrado que el antagonista opioide δ naltrindol inhibe la recaída por estímulos asociados a la toma de alcohol (Ciccocioppo y cols., 2002). Por otro lado, el bloqueo de los receptores opioides κ por el antagonista nor-binaltorfimina (nor-BNI), o la eliminación de los genes que codifican tanto el péptido endógeno dinorfina como el receptor opioide k, inhibe la recaída a la autoadministración de cocaína inducida por estrés. En cambio, la recaída por nuevo contacto con la droga no se vio modificada en estas mismas condiciones experimentales (Redila y Chavkin, 2008).

3.2. Interacción nicotina-sistema opioide endógeno

La consecuencia de la activación de los nAChRs por la nicotina es la liberación de diversos neurotransmisores tales como noradrenalina, serotonina, DA, GABA o glutamato. Aparte de estos neurotransmisores, la administración aguda de nicotina induce la liberación de péptidos opioides tanto a nivel del SNC como del sistema nervioso periférico. Así, la administración aguda de nicotina facilita el aumento de β-endorfina en el hipotálamo de ratón (Marty y cols., 1985) y en el plasma de rata (Conte-Devolx y cols., 1981). Además, la nicotina también induce un aumento en la expresión del ARNm de la PENK y en el contenido de encefalinas en roedores en diferentes áreas relacionadas con la dependencia y la abstinencia a las drogas tales como estriado, tanto dorsal como ventral, amígdala, sustancia gris periacueductal, locus coeruleus, núcleo del rafe e hipocampo (Houdi y cols., 1991; Dhatt y cols., 1995; Houdi y cols., 1998). Por otra parte, se ha descrito un aumento del contenido de dinorfinas y de la expresión de ARNm de PDYN en el estriado de ratón (Isola y cols., 2008a) tras la administración de nicotina.

La nicotina no sólo induce aumentos en los niveles de los péptidos opioides tras su administración aguda, sino que también se han observado cambios en el contenido de péptidos opioides, como por ejemplo en el contenido de encefalinas, y de receptores opioides μ cuando la droga es administrada de manera crónica (Houdi y cols., 1998; Wewers y cols., 1999). Sin embargo, no hay un consenso claro acerca de las variaciones que induce la administración de nicotina crónica en el sistema opioide endógeno ya que algunos autores observaron un aumento de encefalinas (Hexum y Russett, 1987) mientras que otros demostraron una disminución de dichos péptidos (Pierzchala y cols., 1987; Wewers y cols., 1999).

Los cambios en el sistema opioide endógeno observados en animales de laboratorio tras la administración de nicotina también se han confirmado en humanos. Así, se han descrito niveles elevados de β-endorfina en: (1) mujeres fumadoras (Backon, 1989), (2) tras el consumo de cigarrillos con elevado contenido de nicotina (2.4-2.87 mg nicotina) (Pomerleau y cols., 1983; Seyler, Jr. y cols., 1986; Gilbert y cols., 1992), (3) después del consumo de dos cigarrillos, disminuyendo el nivel de β-endorfina tras el quinto cigarrillo (Meliska y Gilbert, 1991), (4) cuando el fumador consume menos de 10 cigarrillos/día (del Arbol y cols., 2000). Sin embargo, otros autores no pudieron demostrar cambios en los niveles de β-

endorfina en ninguna de las etapas del proceso adictivo (Wewers y cols., 1994). Las discrepancias observadas tanto en estudios con animales de experimentación como en estudios clínicos podrían ser debidas en parte a las diferencias en el número de sujetos incluidos en los estudios, las dosis administradas, la duración de los estudios o el momento de recogida de las muestras.

3.2.1. Efectos sobre la ansiedad

La colocalización regional de los nAChRs y de los receptores opioides en áreas límbicas tales como el Nac y la amígdala parece constituir la base de la interacción entre el sistema opioide y los efectos ansiolíticos/ansiogénicos inducidos por la nicotina. La actividad de los receptores opioides μ parece necesaria para que la nicotina induzca su efecto ansiolítico, ya que el antagonista opioide μ, β-funaltrexamina, bloquea dicho efecto (Balerio y cols., 2005). Además, los efectos ansiogénicos producidos por la nicotina se potencian en animales pretratados con el antagonista opioide δ naltrindol. Sin embargo, los receptores κ no modulan los efectos de la nicotina sobre la ansiedad (Balerio y cols., 2005; Marco y cols., 2005).

3.2.2. Efectos sobre la actividad locomotora

La nicotina tiene la capacidad de producir una respuesta locomotora diferente en el animal de experimentación dependiendo de la dosis y el régimen de administración (ver apartado 2.3.3). Así, dosis bajas de nicotina producen hiperlocomoción (Ferrari y cols., 2002) y dosis más elevadas inducen hipolocomoción (Berrendero y cols., 2002). Es conocido que los receptores opioides μ no están implicados en los efectos hipolocomotores agudos inducidos por la nicotina ya que este efecto no se modifica en animales deficientes en dicho receptor (Berrendero y cols., 2002). Además, se ha demostrado que ningún receptor opioide interviene en la hiperactividad locomotora producida por la administración aguda de nicotina (Heidbreder y cols., 1995). Por otra parte, la administración continua de nicotina a dosis bajas produce sensibilización al efecto hiperlocomotor. Los receptores opioides μ participan en este proceso ya que se ha demostrado una pérdida de sensibilización a los efectos locomotores inducidos por la nicotina en animales deficientes en estos receptores (Yoo y cols., 2004). La activación de los

receptores κ previene el desarrollo de la sensibilización (Hahn y cols., 2000), mientras que los receptores opioides δ no participan en este efecto (Heidbreder y cols., 1996).

3.2.3. Efectos antinociceptivos

Diferentes estudios indican que el sistema opioide endógeno participa en el efecto antinociceptivo de la nicotina. De esta forma, se ha demostrado recientemente en ratones que la administración de nicotina a una dosis que produce antinocicepción se correlaciona con el aumento de met-encefalina en el asta dorsal de la médula espinal (Kiguchi y cols., 2008). Sin embargo, no se observó aumento alguno de péptidos derivados de la POMC o de la PDYN en dicha estructura (Kiguchi y cols., 2008). Previos estudios han mostrado un bloqueo de los efectos antinociceptivos de la nicotina en diferentes modelos animales de antinocicepción debido al pretratamiento con naloxona (Tripathi y cols., 1982; Zarrindast y cols., 1997; Biala y cols., 2005; Campbell y cols., 2006). Los antagonistas opioides μ, δ y κ también disminuyen la antinocicepción producida por la nicotina a nivel espinal (Campbell y cols., 2007). Sin embargo, la participación de los receptores μ es más relevante que la de los receptores δ o κ a nivel de la antinocicepción supraespinal (Campbell y cols., 2007). De acuerdo con estos datos, los efectos antinociceptivos inducidos por la nicotina, tanto a nivel espinal como supraespinal, están disminuidos en animales deficientes de los receptores opioides μ (Berrendero y cols., 2002). Otros autores han demostrado un aumento del efecto antinociceptivo supraespinal y espinal de la morfina cuando es administrada conjuntamente con la nicotina, demostrando una interacción entre ambos drogas. Sin embargo, el efecto antinociceptivo supraespinal y espinal de agonistas δ (DPDPE) o κ (U50-488) no es potenciado cuando se administran conjuntamente con nicotina (Suh y cols., 1996a; Suh y cols., 1996b).

3.2.4. Efectos en la tolerancia antinociceptiva

La administración crónica de nicotina induce tolerancia a su efecto antinociceptivo (ver apartado 2.3.5.2.2). El sistema opioide endógeno, además de participar en los efectos antinociceptivos agudos de la nicotina, parece modular el

desarrollo de la tolerancia antinociceptiva. Así, se ha demostrado la existencia de una tolerancia cruzada entre la morfina y la nicotina mediante el ensayo de la formalina (Zarrindast y cols., 1999) y de la placa caliente (Biala y Weglinska, 2006). También se ha demostrado que la administración conjunta de ambas drogas es capaz de aumentar la tolerancia antinociceptiva de cada una por separado (Zarrindast y cols., 1999). Asimismo, un pretratamiento con nicotina en ratones que recibieron morfina crónica produce una disminución de la tolerancia y la dependencia inducida por el opiáceo (Haghparast y cols., 2008).

3.2.5. Efectos reforzantes

La búsqueda de una terapia farmacológica para la adicción al tabaco basada en el sistema opioide endógeno se inició con el hallazgo de la disminución en el consumo y el deseo hacia el tabaco tras la administración de naloxona (Karras y Kane, 1980). (Karras y Kane, 1980). Aunque este mismo resultado fue confirmado por otros investigadores (Gorelick y cols., 1988; Wewers y cols., 1998), ciertos grupos no lograron probar la existencia de modificación alguna en el consumo y deseo por el tabaco después de la administración de antagonistas opioides (Nemeth-Coslett y Griffiths, 1986; Sutherland y cols., 1995). A pesar de estos datos contradictorios, se ha postulado que el bloqueo de los receptores opioides, sobre todo mediante el uso de naltrexona, puede ser una buena terapia para el cese del tabaquismo. Esta afirmación está basada en la observación de una disminución del efecto agudo reforzante de la nicotina en fumadores abstinentes tras la administración de naltrexona (King y Meyer, 2000; Epstein y King, 2004). Sin embargo, se requieren más estudios clínicos para determinar el papel exacto del sistema opioide endógeno en las diferentes etapas del proceso adictivo de la nicotina. Por otro lado, la investigación básica está ayudando a conocer con más precisión el papel desempeñado por cada componente del sistema opioide endógeno en el proceso adictivo de la nicotina. Así, la liberación de DA en el Nac inducida por nicotina necesita de la activación de los receptores opioides μ localizados en el ATV (Tanda y Di, 1998), ya que antagonistas de este receptor bloquean dicha liberación. El aumento de DA extracelular en el Nac inducida por la nicotina disminuye también con la administración previa de (+/-) cyclozocina, antagonista opioide μ y agonista opioide κ (Maisonneuve y Glick, 1999). A nivel

comportamental, se ha demostrado un bloqueo de la inducción del condicionamiento de plaza inducido por nicotina en animales deficientes de los receptores opioides μ (Berrendero y cols., 2002). Asimismo, se ha demostrado que el tratamiento repetido de nicotina que induce un condicionamiento espacial se relaciona con un aumento de la expresión de receptores μ (Walters y cols., 2005) y que el antagonista opioide naloxona bloquea el efecto reforzante de la nicotina y la capacidad de los estímulos contextuales de inducir una preferencia de lugar. En línea con estos datos, la administración aguda de naloxona bloquea la capacidad de la nicotina de inducir un condicionamiento espacial (Zarrindast y cols., 2003). Todos estos estudios indican que la activación de los receptores opioides, en especial los receptores μ, es necesaria para que la nicotina manifieste sus propiedades reforzantes.

Mediante estudios de AEIC se ha demostrado también la interacción existente entre los receptores opioides μ y los efectos reforzantes de la nicotina, ya que la administración de morfina aumenta la eficacia de la nicotina para bajar el umbral de refuerzo evaluado mediante esta técnica (Huston-Lyons y cols., 1993). Sin embargo, los datos obtenidos mediante la técnica de autoadministración intravenosa son confusos y escasos. Se ha observado que la administración del agonista opioide μ DAMGO reduce la autoadministración de nicotina cuando éste es administrado directamente en el ATV o en el núcleo tegmental pedúnculo-pontino (Corrigall y cols., 2000; Corrigall y cols., 2002), mientras que la administración de antagonistas opioides, como la naloxona, naltrexona o el antagonista selectivo del receptor opioide μ CTOP no modifica el comportamiento de autoadministración de nicotina (Corrigall y Coen, 1991; Corrigall y cols., 2002; DeNoble y Mele, 2006). Además, el DAMGO es capaz de disminuir el número de respuestas en el manipulando activo en el test de razón progresiva, lo que sugiere una disminución en la motivación del animal por conseguir la droga (Corrigall y cols., 2002).

3.2.6. Efectos en la abstinencia de la nicotina

Estudios clínicos han demostrado el desarrollo de una sintomatología de abstinencia acompañada de cambios de humor en fumadores que han recibido antagonistas opioides (Sutherland y cols., 1995; Krishnan-Sarin y cols., 1999). Este

dato sugiere la participación del sistema opioide endógeno en la abstinencia nicotínica. Además, estudios en animales de experimentación demuestran modificaciones en el sistema opioide endógeno debido a la retirada de la nicotina del organismo. Así, roedores abstinentes a la nicotina manifiestan un aumento del ARNm de PENK en el estriado y en el hipocampo (Dhatt y cols., 1995; Houdi y cols., 1998; Isola y cols., 2002) así como un aumento de la actividad estriatal, particularmente accumbal, de las neuronas que contienen dinorfinas (Isola y cols., 2008b). En relación a la β-endorfina, se ha observado una disminución de la POMC en el hipotálamo en etapas tempranas y tardías de la abstinencia a la droga (Rasmussen, 1998). No obstante, no existen datos suficientes que aclaren las posibles variaciones en la densidad o actividad funcional de los receptores opioides como consecuencia de la abstinencia a la nicotina. Por un lado, hay autores que demuestran una disminución de los receptores opioides μ en el estriado e hipocampo en animales abstinentes a la nicotina (Marco y cols., 2007). Sin embargo, otros autores han demostrado que no existe ninguna alteración ni en la densidad ni en la actividad funcional de dicho receptor en las diferentes áreas analizadas (Vihavainen y cols., 2008).

Aparte de estos datos bioquímicos, estudios comportamentales confirman la participación del sistema opioide en la dependencia de nicotina. En este sentido, el antagonista opioide naloxona es capaz de precipitar un síndrome de abstinencia de nicotina en animales dependientes de la misma, hecho que confirma la existencia de mecanismos comunes entre ambos sistemas (Malin y cols., 1993; Carboni y cols., 2000; Bissiere y cols., 2003; Balerio y cols., 2004; Biala y cols., 2005). Además, se ha demostrado que la morfina disminuye la sintomatología de una abstinencia espontánea a la nicotina (Malin y cols., 1993) mientras que la nicotina reduce la capacidad de la naloxona de precipitar un síndrome de abstinencia y una aversión de plaza tras un tratamiento crónico con morfina (Zarrindast y Farzin, 1996; Araki y cols., 2004). Asimismo, una disminución de la expresión de los signos somáticos de la abstinencia de nicotina se ha descrito en animales deficientes de los receptores opioides μ (Berrendero y cols., 2002).

Diversos estudios indican que el sistema opioide también participa en la sintomatología emocional negativa asociada a la abstinencia nicotínica. Así, la naloxona es capaz de producir una aversión de plaza en animales tratados crónicamente con nicotina (Ise y cols., 2000; Watkins y cols., 2000; Zarrindast y

cols., 2003; Balerio y cols., 2004). Además, la administración de agonistas opioides μ, δ y κ disminuye la capacidad de la mecamilamina de producir una aversión de plaza en animales tratados crónicamente con nicotina (Ise y cols., 2000; Ise y cols., 2002). Sin embargo, el papel de los antagonistas opioides en la sintomatología emocional negativa de la abstinencia a la nicotina no se ha podido demostrar mediante la técnica de AEIC (Huston-Lyons y Kornetsky, 1992; Watkins y cols., 2000).

Objetivos

Objetivos generales

- Evaluar la participación de los diferentes receptores opioides en los efectos farmacológicos inducidos por la nicotina relacionados con las propiedades adictivas de la misma. Para ello, se han utilizado tanto estrategias farmacológicas como ratones knockout deficientes en alguno de los receptores que componen el sistema opioide endógeno.

- Evaluar la participación de los diferentes péptidos opioides endógenos en los efectos farmacológicos producidos por la nicotina relacionado con sus propiedades adictivas. Con esta finalidad, se han utilizado tanto estrategias farmacológicas como ratones knockout deficientes en alguno de los genes que codifican a los precursores de los péptidos opioides.

- Realizar la puesta a punto de un modelo de recaída a la nicotina en ratón mediante la presentación de estímulos ambientales previamente asociados al consumo de la droga, exposición a estrés y por nuevo contacto con la nicotina con la finalidad de estudiar con posterioridad los sustratos neurobiológicos que median dicho proceso.

Objetivos específicos

- Evaluar el papel de los péptidos opioides derivados de la PENK en los efectos antinociceptivos e hipolocomotores inducidos por la nicotina, así como en los efectos reforzantes y de dependencia física inducidos por esta droga. Los experimentos se han realizado en animales knockout deficientes de dicho precursor de péptidos opioides. (Artículo 1)

- Examinar el papel desempeñado por los receptores opioides δ en las respuestas hipolocomotoras y antinociceptivas producidas por la nicotina, así como en los efectos de recompensa y dependencia física de esta droga. Para ello, hemos utilizado animales knockout deficientes de este receptor opioide. (Artículo 2, en preparación)

- Investigar la contribución de los péptidos opioides derivados de la PDYN en las respuestas agudas de la nicotina sobre la locomoción y antinocicepción, así como en las respuestas reforzantes y de dependencia física producidas por la droga. Para conseguir este objetivo se han utilizado ratones knockout deficientes de dichos péptidos opioides. (Artículo 3)

- Estudiar la participación de los receptores opioides μ en la tolerancia a los efectos antinociceptivos de la nicotina inducida tras la administración crónica de la misma. Para ello, hemos utilizado técnicas autorradiográficas y comportamentales en ratones deficientes del receptor opioide μ. (Artículo 4)

- Analizar el papel desempeñado por los receptores opioides κ en la tolerancia antinociceptiva inducida por la administración crónica de nicotina. Para realizar este objetivo hemos utilizado técnicas autorradiográficas y comportamentales. Asimismo, hemos analizado el papel de las dinorfinas y de los receptores NMDA en la tolerancia antinociceptiva producida por la administración crónica de nicotina. Para lograr este objetivo hemos utilizado técnicas bioquímicas y comportamentales. (Artículo 5)

- Puesta a punto de un modelo de recaída a la búsqueda de nicotina mediante los tres factores que inducen recaídas en humanos: nuevo contacto con la droga, presentación de estímulos asociados a la toma de nicotina y estrés. Esta puesta a punto tiene como finalidad estudiar con posterioridad los sustratos neurobiológicos que median el proceso de recaída. (Artículo 6)

Resultados

Artículo 1

Nicotine-induced antinociception, rewarding effects, and physical dependence are decreased in mice lacking the preproenkephalin gene. Berrendero F, Mendizábal V, Robledo P, Galeote L, Bilkei-Gorzo A, Zimmer A, Maldonado R. (2005) *Journal of Neuroscience* 25(5):1103-12.

Objetivos

- Evaluar las posibles diferencias en los efectos agudos de la nicotina sobre la actividad locomotora y la nocicepción entre los animales deficientes de la PENK y sus correspondientes animales controles wild-type.
- Evaluar los efectos de recompensa producidos por la nicotina en un paradigma de condicionamiento espacial en animales deficientes de la PENK y en sus correspondientes animales controles wild-type.
- Evaluar los efectos de la droga sobre los niveles extracelulares de DA en el Nac mediante la técnica de microdiálisis *in vivo* en ambos genotipos.
- Evaluar en ambos genotipos las manifestaciones somáticas de la abstinencia a la nicotina precipitada por mecamilamina en animales dependientes de la misma.

Resultados

- No se observaron cambios significativos en el efecto hipolocomotor inducido por la administración aguda de nicotina en los animales deficientes de la PENK.
- Los efectos antinociceptivos inducidos por la nicotina resultaron disminuidos de una manera significativa en los animales mutantes, tanto en el ensayo de la placa caliente como en el de la inmersión de la cola.
- El aumento en las concentraciones extracelulares de DA producido por la nicotina en el Nac resultó atenuado en los animales deficientes del precursor de péptidos opioides.
- El efecto reforzante producido por la nicotina medido por un condicionamiento espacial fue bloqueado en los animales deficientes de la PENK.

- Las manifestaciones somáticas del síndrome de abstinencia de nicotina se redujeron en los animales knockout deficientes de la PENK.

Conclusiones

- Los péptidos opioides derivados de la PENK median los efectos antinociceptivos de la nicotina. Sin embargo, no participan en los efectos hipolocomotores de la droga.
- Los péptidos opioides derivados de la PENK median el incremento de las concentraciones extracelulares de DA inducido en el Nac por la nicotina.
- Los péptidos opioides derivados de la PENK regulan las propiedades de recompensa de la nicotina como se demostró en el paradigma del condicionamiento espacial.
- Los péptidos opioides derivados de la PENK son necesarios para la expresión somática de la dependencia física de nicotina.

Berrendero F, Mendizábal V, Robledo P, Galeote L, Bilkei-Gorzo A, Zimmer A, Maldonado R.
Nicotine-induced antinociception, rewarding effects, and physical dependence are decreased in mice lacking the preproenkephalin gene.
J Neurosci. 2005 Feb 2;25(5):1103-12.

Artículo 2

δ-opioid receptors participate in the rewarding effects of nicotine. Galeote L, Berrendero F, Bura SA, Kieffer BL, Maldonado R. (En preparación).

Objetivos

- Evaluar el papel de los receptores opioides δ en los efectos agudos de la nicotina sobre la nocicepción y la actividad locomotora.
- Investigar la participación de estos receptores en el aumento de las concentraciones extracelulares de DA a nivel del Nac inducido por la administración aguda de nicotina.
- Determinar los efectos reforzantes de la nicotina en animales deficientes de los receptores opioides δ mediante un paradigma de condicionamiento espacial.
- Estudiar las manifestaciones somáticas de un síndrome de abstinencia de nicotina en ratones deficientes de los receptores opioides δ.
- Analizar los posibles cambios en la actividad funcional y en la densidad de estos receptores en la región lumbar de la médula espinal y en determinadas áreas cerebrales en animales tolerantes a los efectos antinociceptivos de la nicotina.

Resultados

- El efecto antinociceptivo producido por la nicotina fue similar en los animales deficientes del receptor opioide δ y sus correspondientes controles. Tampoco se observó ninguna diferencia entre genotipos en los efectos hipolocomotores de la nicotina.
- El aumento de DA extracelular a nivel del Nac producido por nicotina fue significativamente menor en animales deficientes de los receptores opioides δ.
- El condicionamiento de preferencia de plaza inducido por nicotina resultó suprimido en ratones carentes del receptor opioide δ.
- La sintomatología física de la abstinencia nicotínica se manifestó por igual en ambos genotipos.

- No se produjeron cambios a nivel de la médula espinal ni en las diferentes estructuras cerebrales evaluadas en la actividad funcional ni en la densidad de los receptores opioides δ en los animales tolerantes al efecto antinociceptivo de la nicotina.

Conclusiones

- Los receptores opioides δ no participan en los efectos antinociceptivos ni hipolocomotores que produce la administración aguda de nicotina.
- Los receptores opioides δ median el aumento de DA extracelular en el Nac inducido por la nicotina.
- Los receptores opioides δ regulan los efectos de recompensa de la nicotina como se demostró en el paradigma del condicionamiento espacial.
- Los receptores opioides δ no participan en la expresión somática de la dependencia física de nicotina.
- Los receptores opioides δ no parecen intervenir en el fenómeno de tolerancia antinociceptiva de la nicotina.

LOS RECEPTORES OPIOIDES δ PARTICIPAN EN LOS EFECTOS REFORZANTES DE LA NICOTINA.

Galeote L, Berrendero F, Bura SA, Kieffer BL, Maldonado R. (En preparación).

La literatura científica aporta numerosos datos acerca del papel desempeñado por el sistema opioide endógeno en los efectos farmacológicos inducidos por la nicotina. Sin embargo, hay pocas evidencias sobre la participación precisa de los receptores opioides δ en las respuestas comportamentales producidas por esta droga. Mediante el uso de animales deficientes del receptor opioide δ evaluamos el papel que desempeña este receptor en los efectos farmacológicos de la nicotina y en particular aquellos relacionados con sus propiedades adictivas. La antinocicepción aguda producida por la nicotina (1, 3 y 6 mg/kg, s.c) evaluada mediante los ensayos de la inmersión de la cola y de la placa caliente fue similar en animales deficientes del receptor δ y sus correspondientes wild-type. Los efectos hipolocomotores producidos por la inyección aguda de nicotina (1, 3 y 6 mg/kg, s.c) tampoco se modificaron en los animales mutantes. Sin embargo, los animales carentes del receptor opioide δ manifestaron un menor aumento del contenido de DA en el Nac tras la administración de nicotina (0.5 mg/kg, s.c). Además, el condicionamiento de preferencia de plaza inducido por la misma dosis de nicotina resultó suprimido en estos animales knockout. Por otro lado, la severidad del síndrome de abstinencia física precipitado por el antagonista nicotínico mecamilamina (1 mg/kg s.c) en animales dependientes de nicotina fue similar en ambos genotipos. Por último, no se observaron cambios en la actividad funcional ni en la densidad de los receptores opioides δ ni en la médula espinal ni en las diferentes áreas cerebrales evaluadas en los animales tolerantes a los efectos antinociceptivos de la nicotina. En resumen, los receptores opioides δ median el aumento de DA extracelular producido en el Nac por la nicotina así como los efectos reforzantes de la misma como se demostró en el paradigma de la preferencia de plaza condicionada.

Introducción

La nicotina es el principal componente psicoactivo del tabaco y la causante de la adicción al mismo. La nicotina, a través de la activación de los nAChRs, produce multitud de efectos farmacológicos tales como antinocicepción, efectos reforzantes y efectos sobre la ansiedad entre otros (Picciotto, 2003). La activación de los nAChRs, expresados de manera mayoritaria a nivel presináptico, induce la liberación de diversos neurotransmisores entre ellos los péptidos opioides (Houdi y cols., 1991; Gotti y cols., 2006; Isola y cols., 2008).

El sistema opioide endógeno participa tanto en los efectos motivacionales de los reforzadores naturales como en los de las drogas de abuso (Bodnar y Hadjimarkou, 2003). En relación a la nicotina, estudios recientes han demostrado la importancia de la activación de los receptores opioides μ en los efectos reforzantes (Walters y cols., 2005) y en las variaciones de las concentraciones extracelulares de DA en el Nac inducidas por la droga (Tanda y Di, 1998; Maisonneuve y Glick, 1999). Asimismo, se ha demostrado que tanto los péptidos opioides derivados de la PENK como los receptores opioides μ participan en los efectos antinociceptivos y reforzantes de la nicotina, y en la dependencia física inducida por la misma (Berrendero y cols., 2002; Berrendero y cols., 2005). Por otra parte, la tolerancia antinociceptiva de la nicotina se asocia a una sobreactivación de los receptores opioides μ (Galeote y cols., 2006) y a una disminución de la densidad de los receptores opioides κ (Galeote y cols., 2008) localizados en la médula espinal. Este aumento de actividad de los receptores μ frena la tolerancia antinociceptiva, mientras que la disminución de los receptores κ la favorece.

A pesar de los datos existentes acerca del papel del sistema opioide endógeno en las respuestas comportamentales de la nicotina, la participación que ejercen los receptores opioides δ en estas respuestas es menos conocida. Además, los escasos estudios que constan en la literatura científica sobre el papel de estos receptores en los efectos reforzantes de drogas como la cocaína o la morfina son contradictorios y confusos (Suzuki y cols., 1994; De Vries y cols., 1995; Suzuki y cols., 1997; David y cols., 2008). En relación a la nicotina, se ha demostrado que los receptores opioides δ modulan el efecto ansiogénico producido por una administración aguda de nicotina (Balerio y cols., 2005).

El objetivo del presente trabajo fue determinar el papel de los receptores opioides δ en los efectos farmacológicos de la nicotina con sus propiedades adictivas.

Materiales y métodos

Animales

La generación de los animales deficientes del receptor opioide δ ha sido descrita previamente (Filliol y cols., 2000). Los animales utilizados en este estudio tenían una edad de 8-12 semanas y pertenecían a la cepa C57BL/6. Los animales (5 por caja) se mantuvieron bajo unas condiciones ambientales de temperatura (21 ± 1ºC) y humedad (55 ± 10%) controladas, con un ciclo de 12 h luz /12 h oscuridad (luz entre las 8:00 A.M y 8:00 P.M). La comida y el agua estuvieron disponibles *ad libitum* todo el tiempo excepto en el momento de la realización de los experimentos. Los animales se manipularon y habituaron a su nuevo ambiente una semana antes de comenzar la fase experimental. Los experimentos fueron conducidos de acuerdo con la Directiva Europea Comunitaria: 86/609/EEC y aprobados por el comité ético local.

Drogas

La sal hidrogenada de tartrato de nicotina (3-(1-Metilpirrolidin-2-il)piridina) y la mecamilamina hidroclorhídrica (Sigma, Madrid, España) se disolvieron en solución salina (0.9%). Ambas sustancias se administraron por vía subcutánea en un volumen de 10 ml/kg. Todas las dosis de nicotina se calcularon como sal hidrogenada de tartrato de nicotina. La ketamina hidroclorhídrica (100 mg/kg) (Imalgène 1000; Rhône Mérieux, Lyon, Francia) y la xylazina hidroclorhídrica (20 mg/kg) (Sigma, Madrid, España) se disolvieron y mezclaron en etanol (5%) y agua destilada (95%). Esta mezcla anestésica se administró en un volumen de 20 ml/kg por peso de animal por vía intraperitoneal.

Actividad locomotora

La respuesta locomotora producida por la administración aguda de nicotina (1, 3 y 6 mg/kg, s.c) o salino se evaluó mediante el uso de las cajas individuales de actividad locomotora (9 x 20 x 11 cm, Imetronic, Francia) como ha sido descrito previamente (Berrendero y cols., 2002). Los animales se introdujeron en las cajas 5 minutos después de la administración de la droga y la actividad locomotora, tanto horizontal como vertical, se evaluó durante 10 minutos en un ambiente de baja luminosidad (20-25 lux).

Ensayos de la inmersión de la cola y de la placa caliente

La respuesta antinociceptiva de cada animal se evaluó 15 y 16 minutos después de la administración de nicotina (1, 3 y 6 mg/kg, s.c.) o salino mediante los ensayos de la inmersión de la cola y de la placa caliente, respectivamente, como ha sido descrito con anterioridad (Simonin y cols., 1998). La temperatura en el ensayo de inmersión de la cola se mantuvo a 50 ± 0.5°C gracias a una bomba térmica reguladora de agua circulante (Clifton, North Somerset, Reino Unido). Se midió el tiempo que tarda el animal en retirar la cola del baño de agua caliente. Con el objeto de prevenir daños titulares se permitió un tiempo máximo de permanencia de la cola (cut-off) en el baño de 5 segundos. En el ensayo de la placa caliente, la superficie de la placa permaneció a 52 ± 0.1°C (Columbus Instruments, Columbus, OH, EEUU). El umbral nociceptivo que evaluamos fue la respuesta del salto del animal. En ausencia de salto y con el objeto de evitar daños tisulares se retiró al animal de la placa caliente a los 240 segundos (cut-off) del comienzo del ensayo. Los datos de ambos ensayos se expresaron como el máximo efecto posible usando la siguiente ecuación: (MPE %) = (latencia de retirada de la cola o salto - latencia media del grupo control)/(tiempo cut-off - latencia media del grupo control) x 100.

Paradigma de condicionamiento de preferencia de plaza

Los efectos reforzantes de la nicotina se evaluaron mediante el condicionamiento de preferencia de plaza no sesgado utilizado por Castañe y colaboradores (2002). El paradigma consistió en dos compartimentos diferentes entre sí y separados por una división central. Durante la fase de pre-condicionamiento, el animal tuvo libre acceso a los compartimentos durante 18 minutos. Durante la fase de condicionamiento, se trató al animal en días alternos con inyecciones de nicotina (0.5 mg/kg, s.c.) o salino durante 8 días. Los animales controles recibieron salino todos los días. Inmediatamente después de la inyección de nicotina o salino se condicionó al animal en su correspondiente compartimento durante 20 minutos. El día de la medición (post-condicionamiento) fue similar al día de pre-condicionamiento (libre acceso a los compartimentos durante 18 minutos). El resultado final se calculó como la diferencia entre el tiempo que permanece cada animal en el compartimento asociado a la droga durante la fase de post-condicionamiento y la fase de pre-condicionamiento.

Cirugía y procedimiento de microdiálisis

La concentración extracelular de DA en el Nac tras la inyección aguda de nicotina (0.5 mg/kg, s.c) o salino se determinó mediante la técnica de microdiálisis *in vivo* como describieron previamente Berrendero y colaboradores (2005). Se anestesió a los animales con la mezcla ketamina/xylazina (20 ml/kg i.p) y se les realizó la cirugía estereotáxica (Paxinos y Franklin, 1997). Se implantó la cánula guía de 1 mm en el Nac (AP: + 1.60 mm; ML: - 0.7 mm; DV: - 3.80 mm de bregma) y se fijó con cemento dental. La fibra (CMA/7, CMA Microdialysis, Estocolmo, Suecia) se introdujo 2 días después de la cirugía dentro de la cánula guía. Los animales se habituaron durante toda la noche al nuevo ambiente experimental 2 días después de la colocación de la fibra. A la mañana siguiente, se recolectaron todas las muestras en un flujo constante de 1 µl/min cada 18 minutos. Las muestras basales se recogieron durante 90 minutos e inmediatamente después de transcurrido ese tiempo se inyectó nicotina (0.5 mg/kg, s.c.) o salino. Seguidamente, se recolectaron las muestras por un periodo de 180 minutos y se analizaron mediante el HPLC.

El aumento del contenido extracelular de DA en el Nac tras la administración de salino o nicotina se calculó como el área bajo la curva (AUC) usando el método estándar (Gibaldi y Perrier, 1975). Se utilizó la siguiente ecuación: AUC = $[0.5*(B + E_1)*h]$ $[0.5*(E_1 + E_2)*h]$ + $[0.5*(E_2 + E_3)*h]$ + …$[0.5*(E_{n-1} + E_n)*h]$ donde B es el promedio de los basales, E_n son los porcentajes de DA respecto al basal tras la inyección de nicotina o salino y h es la duración de recogida de las muestras (18 min).

Una vez finalizado el experimento se extrajeron los cerebros de los animales para comprobar que la fibra estaba colocada de forma correcta en el Nac. Los cerebros se cortaron en un criostato en secciones coronales de 20 µm y se tiñeron con cresil violeta. Solo aquellos animales que tuvieron la fibra implantada de manera correcta se incluyeron en el estudio.

Síndrome de abstinencia física de nicotina

La dependencia de nicotina se indujo mediante el uso de minibombas osmóticas Alzet (Modelo 2001) (Alzet®, Cupertino, CA, EEUU), como ha sido descrito con anterioridad (Castañé y cols., 2002). Estas minibombas implantadas de manera subcutánea bajo anestesia liberaron salino o nicotina bajo un flujo

constante de 1 µl/h. Los animales recibieron durante 6 días una media de nicotina de aproximadamente 25 mg/kg/día. La abstinencia de nicotina se precipitó al séptimo día mediante la inyección del antagonista nicotínico mecamilamina (1 mg/kg, s.c.). Los signos somáticos de la abstinencia se evaluaron inmediatamente tras la inyección del antagonista y durante un periodo de 30 minutos (Castañé y cols., 2002). Se calculó una puntuación global de los signos somáticos para cada animal dándole a cada signo individual un valor relativo (Castañé y cols., 2002).

Estudios de tolerancia antinociceptiva a la nicotina

Se les aplicó a los animales un tratamiento crónico de nicotina con la finalidad de determinar posibles cambios en la densidad y/o actividad funcional de los receptores opioides δ. Así, los ratones recibieron nicotina (5 mg/kg, s.c) o salino 3 veces al día durante 12 días (Galeote y cols., 2006). Este protocolo experimental induce tolerancia a los efectos antinociceptivos inducidos por la nicotina.

Procedimientos autorradiográficos

Procesamiento de los cerebros y médulas espinales

Una hora después de la última inyección, se decapitaron los animales y se extrajeron sus cerebros y médulas espinales. Los cerebros y médulas espinales se cortaron en un criostato en secciones coronales de 20 µm y se guardaron a -80ºC hasta su procesamiento. Se identificaron las estructuras cerebrales a partir del atlas de ratón de Paxinos y Franklin (1997) y las láminas medulares a partir de la citoarquitectura de rata como ha sido publicado previamente (Molander y cols., 1984).

Autorradiografía de la unión de [^{3}H] deltorphin II a los receptores opioides δ

Se utilizó el procedimiento autorradiográfico detallado con anterioridad (Kitchen y cols., 1997). Para determinar la unión total del agonista al receptor los cortes se preincubaron durante 30 minutos en un buffer con 50 mM Tris-HCl, pH 7.4 que contenía 0.9% NaCl. Posteriormente, se incubaron durante 60 minutos en un buffer con 50 mM Tris-HCl, pH 7.4 que contenía el agonista de los receptores opioides δ [^{3}H] ile ^{5,6} – deltorphin II a la concentración de 8 nM. Como control de especificidad se utilizó el mismo buffer con el agonista en presencia de 10 µM de naloxona durante 60 minutos. Después de la incubación se realizaron 3 lavados de

5 minutos a 4ºC en un buffer con 50 mM Tris-HCl (pH 7.4) y los cortes se secaron con una corriente de aire frío. Los autorradiogramas se generaron al exponer los tejidos junto con los estándares autorradiográficos ([^{3}H] microscales, Amersham), a una película sensible a tritio (Hyperfilm-[^{3}H], Amersham) por un periodo de 4 semanas para los cortes cerebrales y de 14 semanas para las secciones de médula espinal. Después de este periodo de exposición, las películas se revelaron y cuantificaron mediante un sistema computerizado de análisis de imagen (MCID, St. Catharines, Ontario, Canadá) utilizando la curva estándar generada a partir de los estándares-[^{3}H].

Unión de [^{35}S] GTPγS estimulada por el agonista DPDPE

Se utilizó el protocolo previamente desarrollado (Sim y cols., 1995). Los cortes se lavaron en un buffer que contenía 50 mM Tris-HCl, 3 mM $MgCl_2$, 0.2 mM EGTA, 100 mM NaCl, pH 7.4 a 25ºC durante 10 minutos, seguido por un periodo de 30 minutos de preincubación en un buffer con 2 mM GDP a 25ºC. Posteriormente, la incubación se realizó en un buffer con 2 mM GDP, 0.04 nM [^{35}S]GTPγS que contenía (estimulado) o no (basal) 10 µM DPDPE a 25° durante 2 horas. La unión de [^{35}S] GTPγS estimulado por el agonista DPDPE se revertió mediante la administración de naltrindol 0.01 µM. Después de la incubación se realizaron 2 lavados de 5 minutos con buffer que contenía 50 mM Tris-HCl, pH 7.0 a 4ºC. Los cortes se secaron y se expusieron a una película (Kodak, Biomax, MR) durante 48 horas. Las películas se cuantificaron con un sistema computerizado de análisis de imagen (MCID, St. Catharines, Ontario, Canadá).

Análisis estadístico

Se utilizó un ANOVA de dos vías (genotipo y tratamiento como factores de variación) para comparar tanto los efectos agudos de la nicotina como los signos somáticos de la abstinencia nicotínica, seguido de un ANOVA de una vía para diferencias individuales y comparaciones *post hoc* (Dunnett´s test) cuando fueron necesarias. Los datos obtenidos en la microdiálisis *in vivo* se analizaron mediante un ANOVA de tres vías de medidas repetidas con tratamiento y genotipo como factores entre-sujetos y tiempo después de la inyección de la droga como factor intra-sujetos. Para el análisis del AUC se utilizó un ANOVA de dos vías (genotipo

y tratamiento como factores de variación) seguido de un ANOVA de una vía para diferencias individuales y comparaciones *post hoc* (Dunnett´s test) cuando fueron requeridas. Para demostrar que los estudios del condicionamiento de preferencia de plaza no fue un procedimiento sesgado se utilizó un ANOVA de una vía con los tiempo que los animales permanecieron en el compartimento asociado a la droga durante la fase de pre-condicionamiento. Por otro lado, se usó un *Student's t test* pareada para comparar diferencias individuales entre el tiempo que el animal permanece en el compartimento asociado a la droga durante las fases de pre-condicionamiento y post-condicionamiento. Los estudios bioquímicos se analizaron mediante un ANOVA de dos vías de medidas repetidas (tratamiento como factor entre-sujetos y área cerebral o lámina medular como factor intra-sujetos) seguidos de un ANOVA de una vía. Se consideraron diferencias significativamente estadísticas cuando la probabilidad de error fue < 0.05.

Resultados

Efectos hipolocomotores y antinociceptivos de la nicotina en animales carentes del receptor opioide δ

La administración aguda de nicotina (1, 3 y 6 mg/kg, s.c) produjo una disminución de la actividad locomotora similar en los animales deficientes en el receptor opioide δ y sus correspondientes controles wild-type. En el caso de la actividad locomotora horizontal, la ANOVA de dos vías reveló un efecto del tratamiento ($F_{(3,79)} = 59.45$, $p < 0.01$), efecto del genotipo ($F_{(1,79)} = 6.22$, $p < 0.05$) pero no interacción entre estos dos factores ($F_{(3,79)} = 1.47$, n.s). La ANOVA de una vía (tratamiento) reveló un efecto significativo del tratamiento en animales wild-type ($F_{(3,44)} = 37.61$, $p < 0.01$) y knockout ($F_{(3,44)} = 32.04$, $p < 0.01$). El análisis *Post hoc* mostró una disminución similar de la actividad horizontal en animales wild-type (1, 3 y 6 mg/kg; $p < 0.01$) y en animales deficientes de los receptores opioides δ (1, 3 y 6 mg/kg; $p < 0.01$) en comparación con el grupo salino (figura 1A). Con respecto a la actividad locomotora vertical, la ANOVA de dos vías mostró un efecto del tratamiento ($F_{(3,79)} = 37.63$, $p < 0.01$), efecto del genotipo ($F_{(1.79)} = 4.22$, $p < 0.05$) pero no interacción tratamiento y genotipo ($F_{(3,79)} = 1.38$, n.s). La ANOVA de una vía (tratamiento) reveló un efecto significativo del tratamiento en animales wild-type ($F_{(3,44)} = 26.59$, $p < 0.01$) y knockout ($F_{(3,44)} = 19.22$, $p < 0.01$). El análisis *Post hoc* mostró una reducción similar de la actividad vertical a las diferentes dosis de nicotina administradas en wild-type (1, 3 y 6 mg/kg; $p < 0.01$) y en knockout (1 mg/kg; $p < 0.05$, 3 y 6 mg/kg; $p < 0.01$) en comparación con el grupo salino (figura 1B).

Las respuestas antinociceptivas inducidas por la nicotina (1, 3 y 6 mg/kg, s.c) fueron evaluadas en ratones deficientes en el receptor opioide δ y en animales wild-type mediante los ensayos de la inmersión de la cola y de la placa caliente. En el ensayo de la inmersión de la cola, la ANOVA de dos vías mostró un efecto del tratamiento ($F_{(3,80)} = 5.82$, $p < 0.05$), pero no efecto del genotipo ($F_{(1.80)} = 0.83$, n.s) ni de la interacción entre ambos factores ($F_{(3,80)} = 1.06$, n.s). La ANOVA de una vía (tratamiento) mostró un efecto significativo de tratamiento en los animales wild-type ($F_{(3,44)} = 3.44$, $p < 0.05$) y knockout ($F_{(3,44)} = 3.57$, $p < 0.05$). El análisis *post hoc* reveló un efecto significativo de la dosis de 6 mg/kg en animales wild-type ($p < 0.01$) y de la dosis de 3 mg/kg en animales knockout ($p < 0.01$) comparados con el

grupo tratado con salino (figura 1C). La ANOVA de dos vías realizada en el ensayo de la placa caliente reveló un efecto del tratamiento ($F_{(3,80)} = 28.01$, $p < 0.05$), pero ningún efecto del genotipo ($F_{(1.80)} = 0.37$, n.s) ni de la interacción entre ambos factores ($F_{(3.80)} = 0.58$, n.s). La ANOVA de una vía (tratamiento) mostró un efecto significativo de tratamiento tanto en los animales wild-type ($F_{(3,44)} = 18.27$, $p < 0.01$) como en los knockout ($F_{(3,44)} = 11.83$, $p < 0.01$). El análisis *post hoc* reveló efecto significativo de las dosis de 3 y 6 mg/kg en animales wild-type ($p < 0.01$) y en animales knockout ($p < 0.01$) comparados con el grupo control (figura 1C).

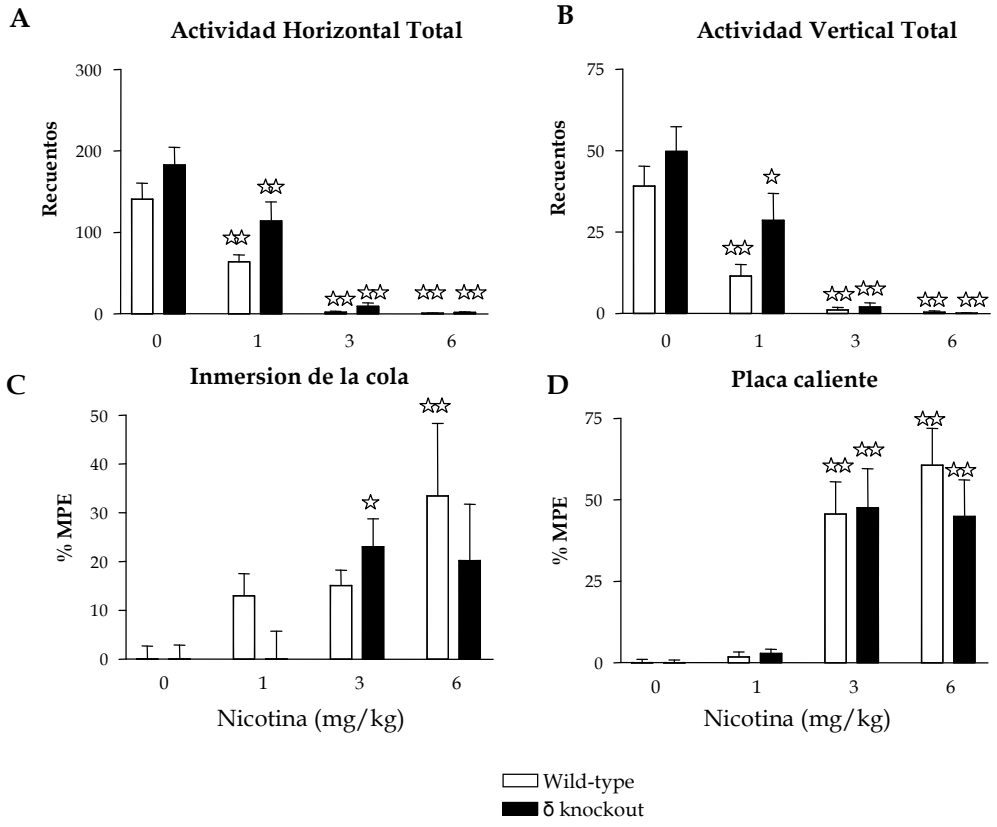


Figura 1. Efectos hipolocomotores y antinociceptivos inducidos por la administración aguda de nicotina en animales deficientes del receptor opioide δ y wild-type. Los efectos sobre la actividad locomotora (A y B) y la nocicepción (C y D) se evaluaron 5 y 15 minutos, respectivamente, tras la inyección de nicotina (0, 1, 3, y 6 mg/kg, s.c.). Los datos de la actividad locomotora son expresados como la media de los movimientos contabilizados ± error durante un periodo de 10 min en los animales wild-type (n = 10-12) y knockout (n = 10-12). Los datos del ensayo de la inmersión de la cola (C) y de la placa caliente (D) son expresados como el porcentaje de máximo efecto posible (%MPE) ± error en ratones wild-type (n = 10-12) y knockout (n = 10-12). ☆$p < 0.05$, ☆☆$p < 0.01$ cuando comparamos con el grupo salino del mismo genotipo (Dunnett's test).

Concentraciones extracelulares de dopamina en el Nac tras la administración de nicotina en animales deficientes del receptor δ

La administración aguda de nicotina (0.5 mg/kg, s.c) indujo un aumento de DA extracelular en el Nac tanto en animales wild-type como en knockout. Sin embargo, este incremento de DA fue significativamente menor en animales deficientes de los receptores opioides δ. Una ANOVA de tres vías de medidas repetidas realizada después de la inyección de nicotina reveló un efecto significativo del tiempo ($F_{(9,216)}$ = 3.059, p <*0.01*), el genotipo ($F_{(1,24)}$ = 246.632, p <*0.01*) y el tratamiento ($F_{(1,24)}$ =10.10, p <*0.01*). Sin embargo, no mostró efecto significativo en las diferentes interacciones entre los factores analizados (figura 2).

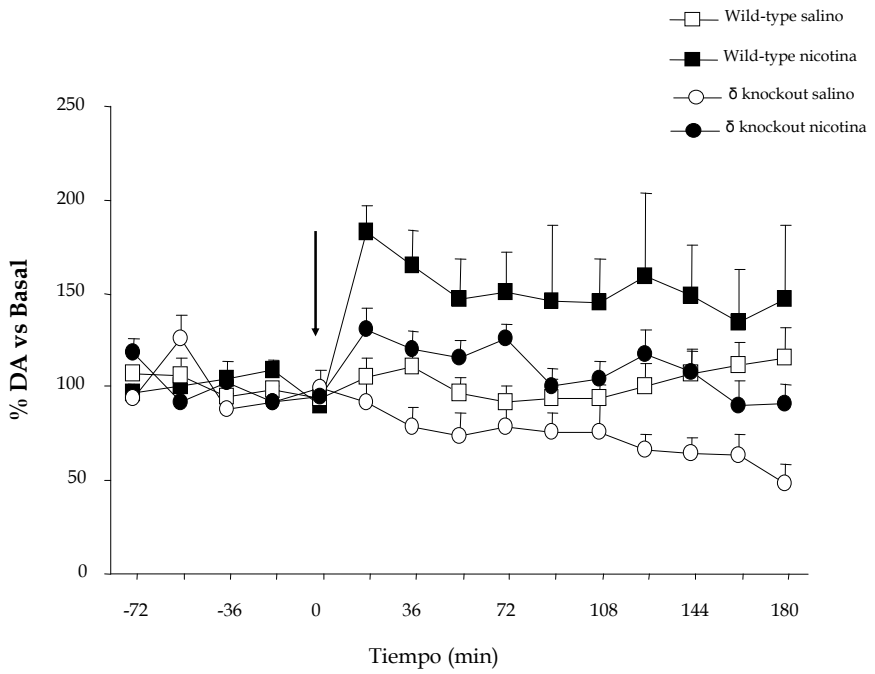


Figura 2. Efecto de la nicotina (0.5 mg/kg, s.c) sobre la concentración extracelular de DA a nivel del Nac obtenida por la técnica de microdiálisis *in vivo* en animales deficientes del receptor opioide δ y wild-type. La flecha indica el momento de la administración de nicotina o salino. Las muestras fueron tomadas cada 18 minutos. Todos los valores son expresados como la media del porcentaje de estimulación con respecto al basal tras la administración de nicotina o salino ± error en ratones wild-type (n = 6-9) y knockout (n = 5-8).

Por otro lado, un ANOVA de dos vías calculada para el área bajo la curva (AUC) reveló un efecto significativo del genotipo ($F_{(1,24)}$ = 6.91, p <*0.05*), el tratamiento ($F_{(1,24)}$ = 16.43, p <*0.01*) pero no interacción entre ambos factores ($F_{(1,24)}$ = 1.09, n.s). La ANOVA de una vía (tratamiento) mostró diferencia significativa de

tratamiento en animales wild-type ($F_{(1,13)} = 10.40$, $p < 0.01$) y knockout ($F_{(1,11)} = 7.25$, $p < 0.05$). La ANOVA de una vía (genotipo) mostró diferencia significativa entre genotipos en animales que han recibido una inyección aguda de nicotina ($F_{(1,12)} = 4.88$, $p < 0.05$) pero no en aquellos animales que han recibido una administración aguda de salino ($F_{(1,12)} = 2.12$, n.s) (figura 3). Este último resultado indica que la eliminación del gen que codifica para el receptor opioide δ modifica el aumento de la concentración de DA extracelular producido en el Nac por la nicotina.

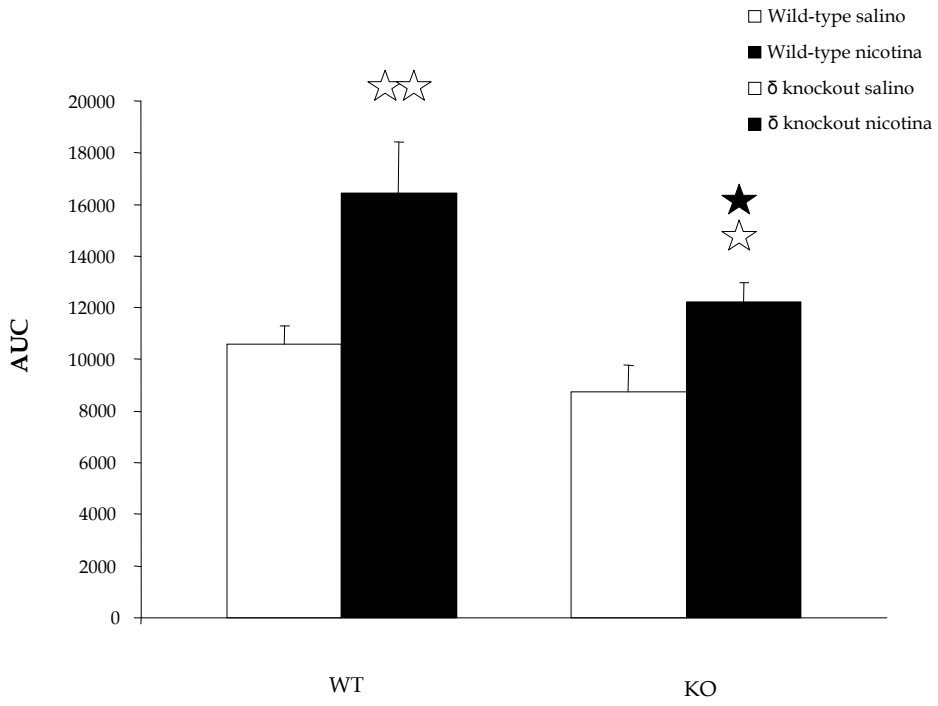


Figura 3. Valores del AUC para la concentración de DA tras la administración de nicotina (0.5 mg/kg) o salino en animales wild-type y knockout. El AUC se calculó para los 108 minutos después de la administración de nicotina o salino. Todos los valores son expresados como la media ± error en ratones wild-type (n = 6-9) y knockout (n = 5-8). ☆$p < 0.05$, ☆☆$p < 0.01$ cuando comparamos con el grupo salino del mismo genotipo (*Student's t test*). ★$p < 0.05$ cuando comparamos entre genotipos (*Student's t test).*

Preferencia de plaza condicionada inducida por nicotina en animales carentes del receptor opioide δ

Los efectos de recompensa inducidos por la nicotina (0.5 mg/kg, s.c) fueron evaluados en animales deficientes del receptor opioide δ y animales wild-type utilizando el paradigma de condicionamiento de plaza. Los animales no mostraron preferencia por el compartimento asociado a la droga en la fase de pre-condicionamiento ($F_{(3,56)}$ = 0.36, n.s) (figura 3). Los animales wild-type condicionados a la nicotina permanecieron significativamente más tiempo en el compartimento asociado a la droga durante la fase de post-condicionamiento que durante la fase de pre-condicionamiento ($p < 0.05$). Sin embargo, este efecto no se manifestó en los animales knockout (figura 3) (n.s).

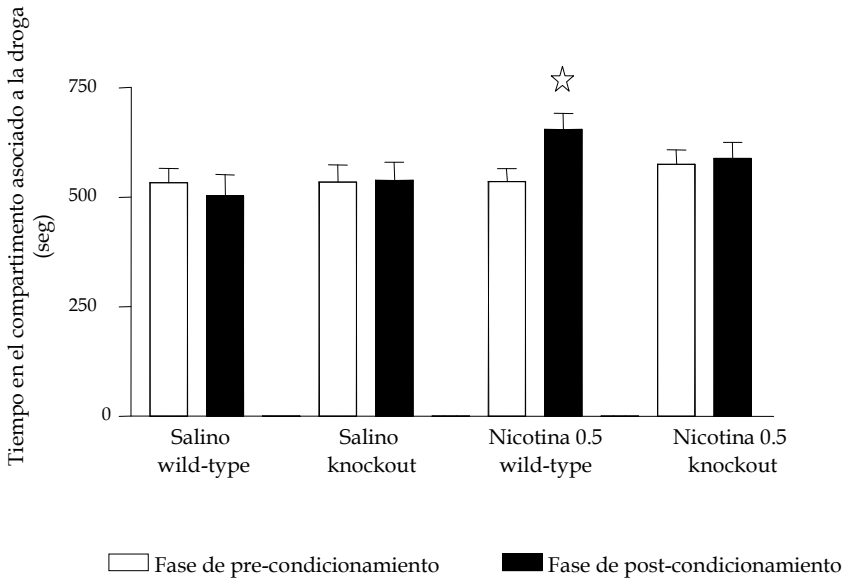


Figura 3. Efectos reforzantes de la nicotina en animales knockout y wild-type en un paradigma de condicionamiento de preferencia de plaza. El condicionamiento de preferencia de plaza fue inducido por salino (Sal) y nicotina (Nic 0.5 mg/kg, s.c) en ambos genotipos. La figura muestra el tiempo permanecido en el compartimento asociado a la droga durante la fase de pre-condicionamiento y la fase de post-condicionamiento. Todos los valores están expresados como la media ± error en ambos genotipos (n = 15). ☆$p < 0.05$, en comparación con la fase de pre-condicionamiento (*Student's t test pareada).*

Manifestaciones somáticas del síndrome de abstinencia de nicotina en animales knockout de los receptores opioides δ

Los signos somáticos característicos del síndrome de abstinencia de nicotina fueron evaluados en ambos genotipos. No se observaron manifestaciones físicas de abstinencia antes de la inyección del antagonista nicotínico mecamilamina en ninguno de los grupos animales. Después de la inyección del antagonista, los animales tratados crónicamente con la nicotina manifestaron los signos físicos propios de la abstinencia de la droga (Berrendero y cols., 2002). La ANOVA de dos vías calculada para signos somáticos representativos como el temblor corporal, temblor de patas y ptosis reveló un efecto significativo del tratamiento ($F_{(1,56)}$ = 33.33, $p < 0.01$; $F_{(1,56)}$ = 11.57, $p < 0.01$; $F_{(1,56)}$ = 18.23, $p < 0.01$, respectivamente) pero no efecto del genotipo ($F_{(1,56)}$ = 0.26, n.s; $F_{(1,56)}$ = 0.07, n.s; $F_{(1,56)}$ = 0.18, n.s, respectivamente) ni la interacción entre estos dos factores ($F_{(1,56)}$ = 0.26, n.s; $F_{(1,56)}$ = 0.01, n.s; $F_{(1,56)}$ = 0.32, n.s, respectivamente). Por otro lado, la ANOVA de dos vías realizadas en la escala global de severidad de la abstinencia reveló un efecto del tratamiento ($F_{(1,56)}$ = 19.23, $p < 0.01$) pero no efecto de genotipo ($F_{(1,56)}$ = 2.70, n.s) ni la interacción entre estos dos factores ($F_{(1,56)}$ = 0.28, n.s). Posteriormente, un ANOVA de una vía (tratamiento) mostró un aumento en los signos individuales y en la escala global de severidad de la abstinencia en animales que recibieron una administración crónica de nicotina en ambos genotipos ($p < 0.05$; $p < 0.01$) cuando fueron comparados con aquellos animales que recibieron una administración crónica de salino (figura 4).

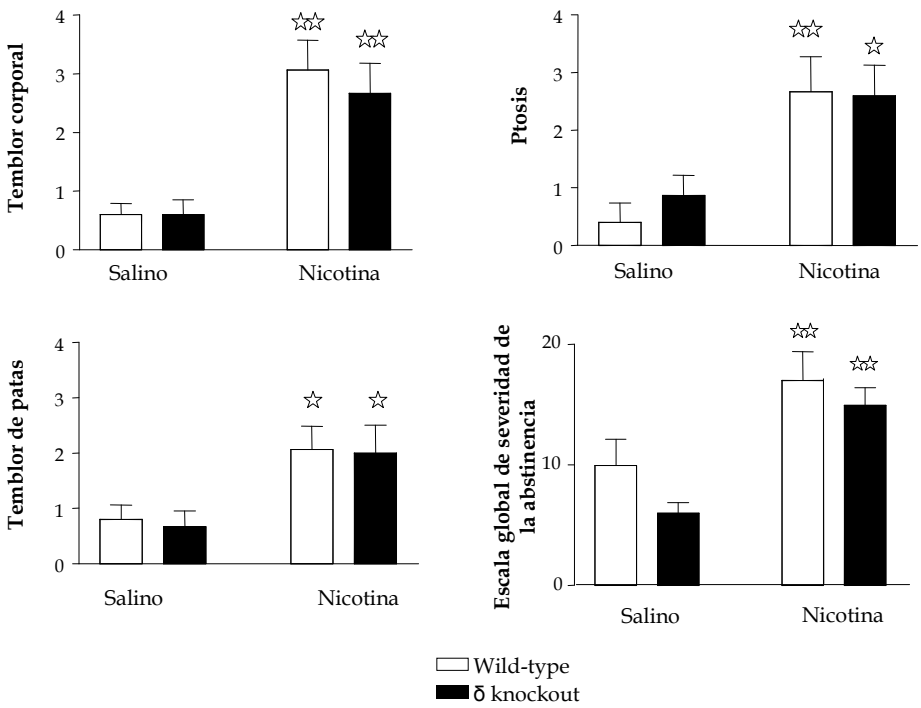


Figura 4. La mecamilamina precipita un síndrome de abstinencia física tanto en animales deficientes del receptor opioide δ como en animales wild-type. La abstinencia fue precipitada por la administración aguda de mecamilamina (1 mg/kg, s.c.) después de 6 días de tratamiento con nicotina (25 mg/kg/d) mediante el uso de minibombas osmóticas. La escala global de severidad de la abstinencia fue calculada para cada animal dándole a cada signo individual un valor relativo (Castañé y cols., 2002). Los datos son expresados como la media ± error en animales wild-type y en animales deficientes del receptor δ (n = 15 por grupo). ☆ $p < 0.05$; ☆☆ $p < 0.01$ en comparación con el grupo salino del mismo genotipo (*Student's t test*).

Análisis en la densidad y actividad funcional de los receptores opioides δ en ratones tolerantes al efecto antinociceptivo de la nicotina

Las posibles alteraciones en la densidad de los receptores δ fueron evaluadas en animales tolerantes a la nicotina mediante el uso de técnicas autorradiográficas con [^{3}H] deltorphin II, un agonista selectivo de los receptores δ. El tratamiento crónico con nicotina (5 mg/kg, s.c, 3 inyecciones/día durante 12 días) no indujo ninguna alteración en los niveles de los receptores δ ni en la médula espinal ni en las diferentes áreas cerebrales analizadas. Así, la ANOVA de dos vías de medidas repetidas reveló un efecto del área cerebral evaluada ($F_{(5,50)} = 81.00$, $p < 0.01$), pero ningún efecto del tratamiento ($F_{(1,10)} = 0.438$, n.s), ni interacción entre ambos factores ($F_{(5,50)} = 1.99$, n.s). En la médula espinal, la ANOVA de dos vías de medidas repetidas mostró un efecto de la lámina analizada ($F_{(2,18)} = 10.46$, $p < 0.01$), pero no efecto del tratamiento ($F_{(1,9)} = 3.09$, n.s), ni interacción entre estos dos factores ($F_{(2,18)} = 0.44$, n.s) (tabla 1 A,B).

Autorradiografía [3H] deltorphin II
(fmol/mg tejido)

A

Cerebro	Salino	Nicotina
Caudado putamen lateral	146 ± 9.80	160.59 ± 7.25
Caudado putamen medial	92.27 ± 7.76	108.01 ± 7.28
Tubérculo olfatorio	79.98 ± 10.74	97.91 ± 15.45
Corteza	64.79 ± 7.32	73.85 ± 7.58
Amígdala	73.24 ± 9.20	57.92 ± 6.04
Hipocampo	36.73 ± 6.69	38.71 ± 8.53

B

Médula espinal	Salino	Nicotina
Láminas (I-II)	32.34 ± 1.29	28.76 ± 1.68
Láminas (III-IV)	28.83 ± 1.55	23.68 ± 1.04
Lámina (X)	31.76 ± 2.47	28.39 ± 1.75

Tabla 1. Densidad de los receptores opioides δ en el cerebro (A) y la médula espinal (B) en animales tratados crónicamente con salino o nicotina (5 mg/kg s.c 3 inyecciones/día durante 12 días). Los valores son expresados como la media ± error de 5-6 animales por grupo.

También, se evaluaron las posibles modificaciones en la actividad funcional de los receptores opioides δ a nivel medular y cerebral en animales tolerantes a la nicotina mediante el uso de autorradiografías de unión de [^{35}S] GTPγS estimulada por el agonista δ DPDPE. La ANOVA de dos vías de medidas repetidas reveló una ausencia del efecto de tratamiento ($F_{(1,8)}$ = 0.162, n.s), del área cerebral evaluada ($F_{(5,40)}$ = 1.92, n.s) y ausencia de interacción entre ambos factores ($F_{(5,40)}$ = 0.123, n.s). De la misma forma, en la médula espinal la ANOVA de dos vías de medidas repetidas mostró una ausencia de efecto del tratamiento ($F_{(1,8)}$ = 0.547, n.s), de la lámina analizada ($F_{(2,16)}$ = 5.29, n.s) y ausencia de interacción entre ambos factores ($F_{(2,16)}$ = 5.07, n.s) (tabla 2 A,B). Estos datos indican que el tratamiento crónico con nicotina anteriormente comentado no produjo cambios ni en la densidad ni en la actividad funcional de los receptores opioides δ en ninguna estructura analizada

Unión de [^{35}S] GTPγS estimulado por el agonista DPDPE (% de estimulación con respecto al basal)

A

Cerebro	Salino	Nicotina
Caudado putamen lateral	27.60 ± 10.03	24.33 ± 8.63
Caudado putamen medial	25.69 ± 9.31	24.54 ± 9.56
Corteza	12.78 ± 6.96	12.74 ± 6.47
Amígdala	37.59 ± 11.00	30.13 ± 12.54
Hipocampo	28.83 ± 4.53	25.45 ± 8.81
Hipotálamo	28.83 ± 10.45	20.03 ± 9.31

B

Médula espinal	Salino	Nicotina
Láminas (I-II)	6.80 ± 1.90	9.09 ± 3.15
Láminas (III-IV)	6.72 ± 2.84	5.43 ± 2.45
Lámina (X)	6.73 ± 1.75	8.86 ± 3.64

Tabla 2. Actividad funcional de los receptores opioides δ en el cerebro (A) y la médula espinal (B) en animales tratados crónicamente con salino o nicotina (5 mg/kg s.c 3 inyecciones/día durante 12 días). Los valores son expresados como la media ± error de 4-6 animales por grupo.

Discusión

En este estudio se demuestra por primera vez la participación de los receptores opioides δ en los efectos reforzantes de la nicotina. Así, los animales deficientes del receptor opioide δ manifiestan un menor aumento de las concentraciones extracelulares de DA en el Nac tras la administración aguda de nicotina en comparación con sus correspondientes wild-type. Además, la preferencia de plaza condicionada inducida por la droga no se desarrolló en estos animales knockout. Sin embargo, no se observaron diferencias entre ambos genotipos en los efectos antinociceptivos e hipolocomotores agudos ni en la dependencia física inducida por la nicotina. Tampoco se produjeron cambios en la densidad ni en la actividad funcional de los receptores opioides δ en las láminas medulares ni en las áreas cerebrales analizadas en animales tolerantes a los efectos antinociceptivos de la nicotina.

Los péptidos opioides derivados de la PENK (Berrendero y cols., 2005) así como los receptores opioides μ (Berrendero y cols., 2002; Biala y cols., 2005) participan en el efecto antinociceptivo agudo producido por la nicotina como ha sido demostrado con anterioridad. Sin embargo, los efectos antinociceptivos de la droga se mantienen en los ratones deficientes de los receptores opioides δ. Las encefalinas endógenas poseen una mayor afinidad por los receptores opioides δ que por los receptores μ, aunque resulta ser la activación de los receptores opioides μ por las encefalinas la que media el efecto antinociceptivo de la nicotina. La escasa proporción de receptores opioides δ tanto en la médula espinal como en las áreas supraespinales que controlan el dolor (Mansour y cols., 1994) puede explicar los resultados observados. Además, se ha demostrado que los receptores opioides δ y los nAChRs no colocalizan a nivel medular. Así, los receptores δ se expresan preferentemente en la lámina I del asta dorsal de la médula mientras que los nAChRs se localizan de manera predominante en las terminaciones de las fibras nerviosas de tipo C de las láminas medulares II, III y V. Además, los nAChRs se expresan también en interneuronas tanto de la sustancia gelatinosa como de las láminas más ventrales de la médula espinal (Yaksh T.L., 1993; Genzen y cols., 2001; Young y cols., 2008). No obstante, en contraste con nuestros resultados, Campbell y colaboradores (2007) demostraron que la administración del antagonista opioide δ naltrindol (10 mg/kg) bloqueaba la antinocicepción espinal de la nicotina y

disminuía también su efecto antinociceptivo a nivel supraespinal. La elevada dosis de naltrindol utilizada en este estudio posee efectos antinociceptivos intrínsecos (Jackson y cols., 1989), además de poder perder la selectividad hacia los receptores opioides δ lo que dificulta la interpretación de estos resultados. Además, diferencias metodológicas como la especie animal utilizada en cada estudio (rata *versus* ratón), un tratamiento farmacológico frente a la utilización de animales knockout y la vía de administración de la nicotina (intraperitoneal *versus* subcutánea) pueden ser también las causantes de dicha discrepancia (Campbell y cols., 2007). Tampoco hemos observado diferencias entre los animales deficientes en el receptor opioide δ y sus correspondientes controles wild-type en cuanto al efecto hipolocomotor producido por la nicotina. Estudios previos han demostrado la ausencia de participación de los receptores opioides μ y los péptidos derivados de la PENK en el efecto hipolocomotor de la nicotina (Berrendero y cols., 2002; Berrendero y cols., 2005).

La administración aguda de nicotina tiene la capacidad de aumentar las concentraciones extracelulares de DA en el Nac, hecho relacionado con sus propiedades reforzantes (Di Chiara y Imperato, 1988; Di Chiara, 2000). Mediante la técnica de microdiálisis *in vivo* demostramos el papel de los receptores opioides δ en la modulación de este fenómeno. Así, los animales deficientes de este receptor presentan un menor incremento en las concentraciones extracelulares de DA en el Nac tras la inyección aguda de nicotina (0.5 mg/kg, s.c) en comparación con sus correspondientes controles wild-type. Previamente a nuestros resultados, se había demostrado que la nicotina requiere de los receptores opioides μ (Tanda y Di, 1998; Maisonneuve y Glick, 1999) y de los péptidos opioides derivados de la PENK (Berrendero y cols., 2005) para inducir un aumento de las concentraciones extracelulares de DA en el Nac. Este aumento es debido a la activación de los receptores opioides μ expresados en los terminales presinápticos de las neuronas GABAérgicas (Bergevin y cols., 2002) del ATV por las interneuronas encefalinérgicas presentes en este área (Garzon y Pickel, 2002). Así, los receptores μ activan de manera indirecta las neuronas dopaminérgicas que proyectan al Nac. Gracias a estudios de electrofisiología y farmacología se ha demostrado que los receptores opioides δ regulan las concentraciones extracelulares de DA accumbal en esta misma área (Jiang y North, 1992). Así, se ha descrito la presencia de receptores δ en el terminal presináptico de interneuronas GABAérgicas accumbales

(Hoffman y Lupica, 2001) que hacen sinapsis con las neuronas dopaminérgicas procedentes del ATV (Jiang y North, 1992). Estos receptores δ son activados por interneuronas encefalinérgicas presentes en el Nac (Svingos y cols., 1996; Svingos y cols., 1998). Por último, las neuronas GABAérgicas del Nac que proyectan al ATV y que poseen ARNm que codifica para la PENK también participan en el incremento de las concentraciones extracelulares de DA accumbal inducido por nicotina (Kalivas y cols., 1993) (Figura 5). Por tanto, la activación de los receptores opioides μ y δ por las encefalinas endógenas pueden producir una activación indirecta de la neurona dopaminérgica accumbal mediante la inhibición en la liberación de GABA a diferentes niveles.

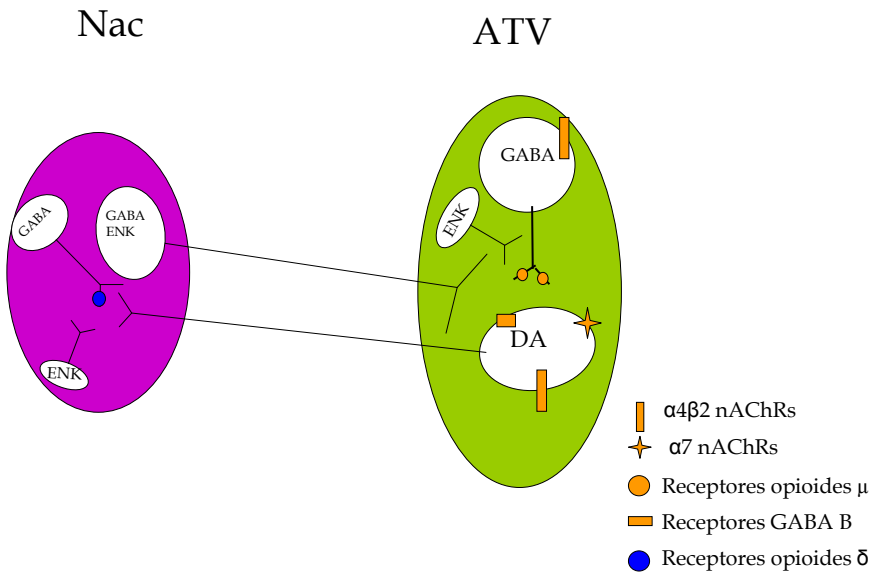


Figura 5. Diagrama del posible papel del sistema opioide endógeno en el aumento del contenido de DA extracelular en el Nac tras la inyección aguda de nicotina. Abreviaturas: GABA: neuronas GABAérgicas; DA: neuronas dopaminérgicas; ENK: neuronas encefalinérgicas.

La nicotina (0.5 mg/kg, s.c) indujo una preferencia de plaza condicionada en animales controles wild-type que fue bloqueada en los animales deficientes del receptor opioide δ. Este resultado concuerda con los datos obtenidos utilizando la técnica de microdiálisis *in vivo* y pone de manifiesto el papel de los receptores opioides δ en los efectos reforzantes de la nicotina. Los receptores opioides δ participan en la manifestación del condicionamiento espacial desarrollado por drogas como la cocaína (Suzuki y cols., 1997) o el alcohol (Matsuzawa y cols., 1999)

aunque este dato no pudo ser corroborado por otros grupos de investigación (De Vries y cols., 1995; David y cols., 2008). Estudios previos indican que bajo las condiciones experimentales que originan un condicionamiento espacial a la nicotina se produce un aumento del ARNm que codifica para los receptores μ del ATV (Walters y cols., 2005) y dicho aumento es revertido por la administración previa de naloxona. Asimismo, este antagonista bloquea la inducción de la preferencia de plaza a la nicotina (Zarrindast y cols., 2003; Walters y cols., 2005). Por otro lado, se ha demostrado recientemente que los animales knockout deficientes del receptor opioide μ (Berrendero y cols., 2002) o de los péptidos opioides derivados de la PENK (Berrendero y cols., 2005) no desarrollan una preferencia de plaza inducida por nicotina. Por tanto, la liberación de encefalinas debido a la administración de nicotina y la posterior activación de los receptores opioides μ y δ conlleva a la manifestación de los efectos reforzantes de la droga.

En relación a la dependencia física de nicotina, estudios clínicos previos demuestran que la administración de antagonistas opioides como la naloxona o naltrexona puede producir una sintomatología abstinente en el fumador (Sutherland y cols., 1995; Krishnan-Sarin y cols., 1999). Por otro lado, el antagonista opioide naloxona es capaz de precipitar un síndrome de abstinencia física de nicotina en roedores (Balerio y cols., 2004; Biala y cols., 2005), mientras que la morfina disminuye la severidad de esta abstinencia en rata (Malin y cols., 1993). En nuestro estudio, los animales deficientes del receptor opioide δ manifestaron una dependencia física de nicotina igual que sus correspondientes controles wild-type. Estudios previos han demostrado un aumento del ARNm para la PENK así como un incremento de met-encefalina en el estriado y el hipocampo de roedores abstinentes a la nicotina (Dhatt y cols., 1995; Houdi y cols., 1998; Isola y cols., 2002). Además, los signos somáticos de la abstinencia de nicotina son menores en animales deficientes del péptido que codifica para la PENK (Berrendero y cols., 2005) y animales carentes del receptor opioide μ (Berrendero y cols., 2002) cuando se comparan con sus correspondientes wild-type. Estos datos indican que las encefalinas, a través de la activación de los receptores opioides μ, median las manifestaciones de la abstinencia física de nicotina. Sin embargo, los receptores opioides δ no parecen participar en este fenómeno.

Finalmente, el tratamiento crónico con nicotina (5 mg/kg s.c, 3 inyecciones/día durante 12 días) indujo tolerancia al efecto antinociceptivo de la misma, como ha

sido recientemente publicado (Galeote y cols., 2006). Este tratamiento no produjo alteraciones en la densidad ni en la actividad funcional de los receptores opioides δ en la médula espinal ni en las diferentes áreas cerebrales analizadas. La ausencia de cambios en la expresión y en la funcionalidad de estos receptores parece indicar que los receptores opioides δ no participan en el desarrollo de la tolerancia antinociceptiva de la nicotina. Sin embargo, la sobreactivación de los receptores opioides μ en la médula espinal de los animales tolerantes a la nicotina frena el desarrollo de su tolerancia antinociceptiva (Galeote y cols., 2006), mientras que la disminución en la densidad de los receptores opioides κ en esta misma estructura en animales tolerantes a la nicotina favorece el desarrollo de dicha tolerancia (Galeote y cols., 2008). La escasa densidad de receptores δ en las estructuras que controlan el dolor así como la ausencia de colocalización entre estos receptores opioides y los nAChRs (Yaksh T.L., 1993; Mansour y cols., 1995; Genzen y cols., 2001; Young y cols., 2008) podrían explicar los resultados observados.

En resumen, los datos obtenidos en nuestro estudio demuestran que los receptores opioides δ regulan el aumento de las concentraciones extracelulares de DA en el Nac producido por la administración aguda de nicotina, así como los efectos reforzantes de la misma evaluados mediante un paradigma de condicionamiento espacial. Sin embargo, estos receptores no participan en el efecto antinociceptivo e hipolocomotor de la nicotina, ni en la dependencia física inducida por un tratamiento crónico con la misma. Los receptores opioides δ tampoco parecen estar involucrados en la tolerancia antinociceptiva de la nicotina.

Artículo 3

Prodynorphin gene disruption increases the sensitivity to nicotine self-administration in mice. Galeote L, Berrendero F, Bura SA, Zimmer A, Maldonado R. (2008). *The International Journal of Neuropsychopharmacology* (en prensa).

Objetivos

- Evaluar el papel de los péptidos opioides derivados de la PDYN en las respuestas sobre la actividad locomotora y la nocicepción de la nicotina mediante el uso de ratones deficientes de estos péptidos.
- Investigar los efectos reforzantes de la droga en animales deficientes de la PDYN mediante la utilización de los modelos de la preferencia de plaza condicionada y de la autoadministración intravenosa.
- Estudiar las manifestaciones de la dependencia física de nicotina en ratones wild-type y knockout de la PDYN.

Resultados

- Los efectos sobre la actividad locomotora producidos por la nicotina fueron iguales en ambos genotipos.
- No se observaron cambios significativos entre genotipos en la antinocicepción inducida por la droga.
- Los animales knockout de la PDYN mostraron una preferencia de plaza a la nicotina similar a los controles wild-type.
- Se observó un aumento en la sensibilidad a los efectos reforzantes de la nicotina en animales deficientes de la PDYN en el modelo de la autoadministración intravenosa.
- Las manifestaciones somáticas del síndrome de abstinencia a la nicotina fueron iguales en ambos genotipos.

Conclusiones

- Los péptidos opioides derivados de la PDYN no participan en los efectos hipolocomotores y antinociceptivos de la nicotina.

- Los péptidos opioides derivados de la PDYN no son necesarios para que la nicotina induzca sus efectos reforzantes como indicó el resultado obtenido en el modelo de la preferencia de plaza condicionada.
- La ausencia de los péptidos opioides derivados de la PDYN incrementa la sensibilidad de la nicotina para inducir un comportamiento de autoadministración intravenosa.
- Los péptidos opioides derivados de la PDYN no intervienen en las manifestaciones somáticas del síndrome de abstinencia de nicotina.

Galeote L, Berrendero F, Andreea Bura S, Zimmer A, Maldonado R.
Prodynorphin gene disruption increases the sensitivity to nicotine self-administration in mice.
Int J Neuropsychopharmacol. 2008 Oct 21:1-11. [Epub ahead of print]

Artículo 4

Mu-opioid receptors are involved in the tolerance to nicotine antinociception. Galeote L, Kieffer BL, Maldonado R, Berrendero F. (2006) *Journal of Neurochemistry* 97(2):416-23.

Objetivos

- Desarrollar un modelo de tolerancia a los efectos antinociceptivos de la nicotina en ratón.
- Determinar posibles cambios en la densidad y en la actividad funcional de los receptores opioides μ en los animales tolerantes a los efectos antinociceptivos de la nicotina mediante el uso de técnicas autorradiográficas
- Evaluar la tolerancia a los efectos antinociceptivos e hipolocomotores de la nicotina en animales deficientes de los receptores opioides μ.

Resultados

- Se desarrolló un modelo de tolerancia antinociceptiva a la nicotina tras la administración crónica de la misma. Sin embargo, no se manifestó en este modelo tolerancia a los efectos hipolocomotores de la droga.
- Se observó un aumento significativo de la actividad funcional de los receptores opioides μ en las láminas de la región lumbar de la médula espinal en los animales tolerantes a la nicotina. La actividad funcional de estos receptores no se modificó en las áreas cerebrales analizadas tras el tratamiento crónico con nicotina.
- No se observaron modificaciones en la densidad de los receptores opioides μ en las diferentes láminas de la región lumbar de la médula espinal. Sin embargo, se encontró una disminución significativa en la densidad de los receptores opioides μ en el estriado de los ratones tolerantes a la nicotina.
- El tratamiento crónico con nicotina induce tolerancia a sus efectos antinociceptivos tanto en animales deficientes del receptor opioide μ como en sus correspondientes controles. Sin embargo, el desarrollo de esta

tolerancia fue más rápido en los animales que carecen del receptor opioide μ.

Conclusión

- El receptor opioide μ participa en el desarrollo de la tolerancia antinociceptiva inducida por un tratamiento crónico con nicotina. Así, la actividad funcional de este receptor opioide se incrementa en la médula espinal de los ratones tolerantes con el objeto de mantener el efecto antinociceptivo de la nicotina. Esta tolerancia se desarrolla con mayor rapidez en los ratones knockout deficientes de los receptores opioides μ.

Galeote L, Kieffer BL, Maldonado R, Berrendero F.
Mu-opioid receptors are involved in the tolerance to nicotine antinociception.
J Neurochem. 2006 Apr;97(2):416-23. Epub 2006 Mar 15.

CORRIGENDUM
Mu-opioid receptors are involved in the tolerance to nicotine antinociception.
J Neurochem. 2006 Aug;98(4):1343

Artículo 5

Involvement of kappa/dynorphin system in the development of tolerance to nicotine-induced antinociception. Galeote L, Maldonado R, Berrendero F. (2008) *Journal of Neurochemistry* 105(4):1358-68.

Objetivos

- Determinar el papel de los receptores opioides κ en los efectos antinociceptivos e hipolocomotores inducidos por la administración aguda de nicotina.
- Analizar los posibles cambios en la densidad de los receptores opioides κ en la médula espinal y en diferentes áreas cerebrales en los animales tolerantes a la nicotina.
- Evaluar la existencia de una posible tolerancia cruzada a los efectos antinociceptivos e hipolocomotores entre el agonista opioide κ U-50,488H y la nicotina.
- Analizar el contenido de dinorfina en la médula espinal de los ratones tolerantes al efecto antinociceptivo de la nicotina.
- Determinar la posible participación de los receptores NMDA en la tolerancia antinociceptiva producida tras el tratamiento crónico con nicotina.

Resultados

- Se observó una reducción significativa del efecto antinociceptivo agudo inducido por nicotina en el ensayo de inmersión de la cola en ratones pre-tratados con el antagonista opioide κ nor-BNI. No se encontraron cambios en la antinocicepción analizada en el ensayo de la placa caliente ni en la hipolocomoción a consecuencia de dicho pre-tratamiento.
- Una disminución significativa de la densidad de los receptores opioides κ fue observada en las láminas lumbares de la médula espinal en animales tolerantes a la nicotina. Por otro lado, se observó un aumento significativo de la densidad de dicho receptor en áreas cerebrales como caudado

putamen, corteza motora y corteza cingulada tras el tratamiento crónico con nicotina.

- Se desarrolló una tolerancia cruzada bi-direccional a los efectos antinociceptivos espinales entre la nicotina y el agonista opioide κ U-50,488H. Sin embargo, no se manifestó tolerancia cruzada a los efectos antinociceptivos de estas sustancias a nivel supraespinal.
- Los niveles de dinorfina en la médula espinal no se vieron alterados en animales tolerantes a la nicotina.
- Los animales pre-tratados con el antagonista NMDA MK-801 manifestaron una tolerancia a los efectos antinociceptivos de la nicotina igual que aquellos animales pre-tratados con salino.

Conclusiones

- Los receptores opioides κ participan en los efectos antinociceptivos espinales agudos de la nicotina.
- El descenso en la densidad de los receptores opioides κ en la médula espinal de los animales tolerantes a la nicotina favorece el desarrollo de este proceso.
- Las dinorfinas espinales y los receptores NMDA no participan en el desarrollo de la tolerancia antinociceptiva producida por la nicotina.

Galeote L, Maldonado R, Berrendero F.
Involvement of kappa/dynorphin system in the development of tolerance to nicotine-induced antinociception.
J Neurochem. 2008 May;105(4):1358-68. Epub 2008 Jan 23.

Artículo 6

New operant model of nicotine-seeking behavior in mice. Martin-Garcia E*, Barbano F*, Galeote L*, Maldonado R. (2008) *The International Journal of Neuropsychopharmacology* (en prensa). * Estos autores contribuyeron por igual en el desarrollo de este trabajo.

Objetivo

- Puesta a punto de un modelo operante de recaída a la búsqueda de nicotina en ratón mediante la presentación de los tres estímulos que producen recaídas en humanos: nuevo contacto con la droga, presentación de estímulos asociados al consumo de la misma y estrés.

Resultados

- Se ha desarrollado un modelo de recaída a la nicotina en ratón utilizando los tres estímulos que producen recaídas en humanos.
- La mayor incidencia de recaída fue inducida mediante la presentación de estímulos asociados al consumo de la droga (90% de recaídas).
- La exposición al estrés produce un 50% de recaídas.
- El nuevo contacto con la droga resultó ser el estímulo menos eficaz para inducir una recaída (30% de recaídas).

Conclusiones

- Los estímulos asociados al consumo de la droga constituyen el principal factor que induce recaída a la búsqueda de la nicotina.
- La puesta a punto de un modelo de recaída a la búsqueda de nicotina en ratón es un paso esencial para el estudio posterior de los sustratos neurobiológicos que participan en esta fase del proceso adictivo de la nicotina.

Martín-García E, Barbano MF, Galeote L, Maldonado R.
New operant model of nicotine-seeking behaviour in mice.
Int J Neuropsychopharmacol. 2008 Aug 28:1-14. [Epub ahead of print]

Discusión

La adicción al tabaco es uno de los problemas socio-económicos y sanitarios más importantes de los países civilizados. Cerca de 1.000 millones de personas fuman tabaco en todo el mundo y su consumo produce alrededor de 5 millones de muertes cada año (WHO, 2008). El tabaquismo es una enfermedad crónica recurrente caracterizada por frecuentes recaídas después de periodos largos de abstinencia. El mayor porcentaje de recaída aparece en los primeros días del cese del consumo del tabaco, aunque siguen surgiendo casos de restablecimiento de la conducta adictiva después de meses de abstinencia (Hughes y cols., 1992; Hughes y cols., 2004). Las personas comienzan a fumar debido a los efectos reforzantes de la nicotina, principal componente psicoactivo del tabaco. Los efectos reforzantes de la nicotina son debidos a su capacidad de liberar DA en los circuitos de recompensa. No obstante, estos efectos no son los únicos que contribuyen a la adicción al tabaco ya que la nicotina tiene también la capacidad de aliviar la ansiedad, mejorar los procesos cognitivos como la memoria y la atención, aumentar el umbral y la tolerancia al dolor y aumentar la vigilia. Todos estos efectos junto con los cambios neuroadaptativos producidos tras la administración crónica de la droga, como la tolerancia y la sensibilización, son los responsables del desarrollo de la dependencia de nicotina

La nicotina ejerce sus efectos farmacológicos a través de la activación de los nAChRs que se localizan ampliamente en todo el organismo. No obstante, la estimulación indirecta de otros sistemas de neurotransmisión, tales como el cannabinoide o el opioide, se ha implicado en la mediación de determinados efectos inducidos por la nicotina (Castañé y cols., 2002; Berrendero y cols., 2002; Maldonado y cols., 2006). Este trabajo se centra en determinar el papel que desempeña el sistema opioide endógeno en las acciones farmacológicas de la nicotina relacionadas con sus propiedades adictivas. Las principales herramientas experimentales utilizadas en nuestros estudios han sido los animales deficientes en alguno de los componentes de dicho sistema

1. Participación del sistema opioide endógeno en los efectos hipolocomotores y antinociceptivos producidos por la administración aguda de nicotina

Previamente al estudio del posible papel del sistema opioide endógeno en las respuestas relacionadas con las propiedades adictivas de la nicotina, es preciso evaluar las respuestas que induce la droga cuando es administrada de manera aguda. En este sentido, estudiamos dos de los principales efectos inducidos por la administración aguda de la nicotina: los efectos antinociceptivos e hipolocomotores.

Se ha demostrado con anterioridad que el sistema opioide interviene en los efectos antinociceptivos de drogas tales como el THC (Cichewicz, 2004), la cocaína (Ushijima y Horita, 1993) o el alcohol (Campbell y cols., 2007). Sin embargo, hasta el momento de iniciar nuestro trabajo, pocos estudios habían mostrado una clara participación del sistema opioide endógeno en los efectos antinociceptivos inducidos por la nicotina. Estudios previos demostraron la capacidad del antagonista opioide naloxona de disminuir el potencial antinociceptivo de diferentes dosis de nicotina en rata y en ratón (Tripathi y cols., 1982; Zarrindast y cols., 1997; Biala y cols., 2005; Campbell y cols., 2006). Sin embargo, dado que la naloxona no es un antagonista selectivo y que bloquea en cierta medida a los tres receptores del sistema opioide, no había podido ser identificado el papel específico de cada uno de ellos en los efectos antinociceptivos de la nicotina. En nuestros estudios pudimos clarificar el papel que desempeña cada uno de los componentes del sistema opioide endógeno en los efectos antinociceptivos de la nicotina mediante la utilización de ratones knockout deficientes en dichos componentes. Así, la antinocicepción inducida por diferentes dosis de nicotina en los ensayos de la inmersión de la cola y de la placa caliente fue menor en animales deficientes de la PENK (artículo 1). Se ha descrito previamente que la nicotina es capaz de inducir la liberación de encefalinas tanto a nivel espinal (Kiguchi y cols., 2008) como en estructuras supraespinales (Houdi y cols., 1991; Dhatt y cols., 1995; Houdi y cols., 1998) relacionadas con el control del dolor. A pesar de que las encefalinas endógenas se unen con mayor afinidad a los receptores opioides δ que a los receptores opioides μ, nuestros resultados indican que las encefalinas liberadas por la nicotina ejercen su papel modulador sobre sus efectos antinociceptivos gracias a

la activación de los receptores opioides μ. Así, un estudio previo demostró un menor efecto antinociceptivo de la nicotina en ratones knockout para los receptores opioides μ (Berrendero y cols., 2002). En cambio, los efectos antinociceptivos de la droga se mantienen en los ratones deficientes de los receptores opioides δ (artículo 2). Estos resultados se apoyan también en estudios anatómicos que muestran una colocalización de los receptores opioides μ con los nAChRs en áreas espinales (terminales de las fibras aferentes tipo C, interneuronas de la sustancia gelatinosa e interneuronas de láminas más ventrales de la médula espinal). Además, estos receptores colocalizan con los nAChRs en áreas supraespinales que controlan el dolor tales como el tálamo, el hipotálamo y la corteza somatosensorial. La presencia de nAChRs y receptores μ se ha demostrado también en áreas de la vía descendente del dolor como el núcleo del rafe magnus o la sustancia gris periacueductal (Yaksh T.L., 1993; Mansour y cols., 1994; Guyton A., 1997; Decker y Meyer, 1999; Decker y cols., 2004). Sin embargo, hay una menor proporción de receptores opioides δ en áreas implicadas en el control nociceptivo (Yaksh T.L., 1993; Mansour y cols., 1995). Así, a nivel espinal los receptores δ se expresan de manera preferente en la lámina I del asta dorsal de la médula espinal mientras que los nAChRs se localizan en mayor proporción en los terminales de las fibras nerviosas de tipo C de las láminas medulares II, III y V. Además, los nAChRs se expresan también en interneuronas tanto de la sustancia gelatinosa como de láminas más ventrales de la médula espinal (Yaksh T.L., 1993; Genzen y cols., 2001; Young y cols., 2008). No obstante, en contraste con nuestros resultados, Campbell y cols. (2007) demostraron que la administración del antagonista opioide δ naltrindol (10 mg/kg) bloquea la antinocicepción espinal de la nicotina y disminuye también su efecto antinociceptivo a nivel supraespinal. La elevada dosis de naltrindol utilizada en este estudio tiene capacidades antinociceptivas intrínsecas (Jackson y cols., 1989) además de una posible pérdida de selectividad hacia los receptores δ lo que dificulta la interpretación de estos resultados. Asimismo, diferencias metodológicas como la especie animal utilizada en cada estudio (rata *versus* ratón), un tratamiento farmacológico frente la utilización de animales knockout y la vía de administración de nicotina empleada (intraperitoneal *versus* subcutánea) podrían ser también las causantes de dicha discrepancia.

Por otra parte, hemos observado que los péptidos opioides derivados de la PDYN no median el efecto antinociceptivo de la nicotina ya que esta respuesta fue

similar en los ratones carentes del gen que codifica a la PDYN (artículo 3). Sin embargo, el bloqueo del receptor opioide κ mediante el antagonista nor-BNI disminuyó el efecto antinociceptivo espinal de la droga evaluado en el ensayo de inmersión de la cola (artículo 5). No se observó ningún efecto del antagonista sobre la antinocicepción de la nicotina en el ensayo de la placa caliente, sugiriendo que dicho receptor sólo participa en la modulación del efecto antinociceptivo de la nicotina a nivel espinal. Un artículo recientemente publicado demuestra que el bloqueo de los receptores opioides κ mediante el uso de nor-BNI induce una disminución de los efectos antinociceptivos espinales de la nicotina sin alterar su efecto antinociceptivo supraespinal corroborando nuestro resultado (Campbell y cols., 2007). La posible discrepancia entre los resultados obtenidos en el estudio con los animales deficientes de la PDYN y los observados con el antagonista de los receptores opioides κ nor-BNI puede tener varias explicaciones. En primer lugar, la carencia de especificidad por parte de los péptidos opioides derivados de la PDYN en la activación de los receptores opioides κ. Así, la mayoría de los péptidos opioides derivados de la PDYN (dinorfinas A y B así como neoendorfinas α y β) activan preferentemente los receptores opioides κ, aunque también pueden activar los receptores μ y δ. Sin embargo, otro péptido derivado de la PDYN, la leu-encefalina, activa de manera preferencial los receptores opioides δ (Maldonado y Valverde, 2005) aunque muestra igualmente afinidad por los receptores μ. Además, las dinorfinas tienen la capacidad de activar tanto receptores NMDA (Laughlin y cols., 2001) como nAChRs (Oka y cols., 1998; Itoh y cols., 2000). En segundo lugar, también puede haber influido en dichos resultados determinadas diferencias metodológicas entre ambos estudios. Así, (1) un tratamiento farmacológico (bloqueo del receptor opioide κ) *versus* la utilización de animales knockout (animales que carecen de los ligandos endógenos que activan a los receptores opioides κ) y (2) la utilización de diferentes temperaturas (50ºC *versus* 48ºC) en el ensayo de inmersión de la cola. La elección de estas temperaturas se basó en el objetivo diferente a alcanzar en ambos estudios: la temperatura de 50ºC fue utilizada para determinar el efecto antinociceptivo agudo de la nicotina mientras que la de 48ºC se eligió para los estudios de tolerancia antinociceptiva, ya que esa menor temperatura facilita la observación del desarrollo de este fenómeno. Por otra parte, una discrepancia entre las funciones de los receptores opioides κ y de los péptidos derivados de la PDYN ha sido también previamente descrita para

otro tipo de respuestas. Así, la expresión somática de la abstinencia de morfina fue menor en ratones carentes del receptor opioide κ (Simonin y cols., 1998) mientras que ésta fue similar en animales deficientes en el gen de la PDYN (Zimmer y cols., 2001). En acuerdo con estos datos, un estudio reciente indica que la administración de nicotina a una dosis que induce antinocicepción produce un aumento a nivel espinal en la expresión de PENK, pero no de PDYN o POMC (Kiguchi y cols., 2008).

Los efectos hipolocomotores de la nicotina fueron también analizados en animales deficientes en los componentes del sistema opioide endógeno. Los efectos hipolocomotores inducidos por la administración aguda de nicotina no se modificaron en los ratones knockout para la PENK (artículo 1), para la PDYN (artículo 3), o para los receptores opioides δ (artículo 2). Tampoco observamos una participación de los receptores opioides κ en este efecto ya que el pre-tratamiento con la nor-BNI no alteró dicha hipolocomoción (artículo 5). En línea con estos datos, Berrendero y colaboradores (2002) demostraron que los animales deficientes del receptor opioide μ manifestaban la misma disminución de la actividad locomotora que sus correspondientes controles wild-type. Por tanto, nuestros estudios demuestran que el sistema opioide endógeno no modula el efecto hipolocomotor de la nicotina. A diferencia de lo observado a nivel agudo, se ha comprobado que los receptores opioides μ y κ median el fenómeno de sensibilización locomotora inducido por la administración repetida de nicotina (Hahn y cols., 2000; Yoo y cols., 2004). Así, en animales deficientes del receptor opioide μ existe una pérdida de la sensibilización a los efectos hiperlocomotores inducidos por la nicotina (Yoo y cols., 2004), mientras que la activación de los receptores κ previene el desarrollo de este fenómeno (Hahn y cols., 2000). Sin embargo, los receptores opioides δ no participan en la sensibilización locomotora producida por un tratamiento repetido con nicotina (Heidbreder y cols., 1996).

2. Participación del sistema opioide endógeno en los efectos reforzantes de la nicotina

Existen numerosas evidencias que indican que el sistema opioide endógeno participa en los efectos gratificantes de los reforzadores naturales (Tanda y Di, 1998; Gerrits y cols., 2003) así como en los de diferentes drogas de abuso tales como

los opiáceos (Matthes y cols., 1996; Tanda y Di, 1998; Contarino y cols., 2002), el alcohol (Tanda y Di, 1998; Becker y cols., 2002; Manzanares y cols., 2005) y los cannabinoides (Ghozland y cols., 2002; Mendizabal y cols., 2006). Sin embargo, hay menos estudios acerca de la participación de este sistema en las propiedades reforzantes de la nicotina.

La nicotina, como todas las drogas de abuso, tiene la capacidad de aumentar los niveles extracelulares de DA en el Nac, hecho relacionado con sus propiedades reforzantes (Pontieri y cols., 1996; Marubio y cols., 2003). Mediante la técnica de microdiálisis *in vivo* hemos determinado el papel del sistema opioide endógeno en el aumento en las concentraciones extracelulares de DA inducido por nicotina a nivel del Nac. La nicotina indujo un incremento en los niveles extracelulares de DA que resultó ser en animales wild-type una curva dosis respuesta en forma de campana. Así, la dosis de 0.5 mg/kg indujo un aumento en las concentraciones extracelulares de DA en el Nac mientras que dosis mayores (1 y 3 mg/kg) no produjeron dicho incremento. Este aumento de DA extracelular a nivel del Nac fue significativamente menor en animales deficientes tanto del precursor del péptido opioide encefalina (artículo 1) como del receptor opioide δ (artículo 2). Además, estudios previos demuestran que el bloqueo de los receptores opioides μ disminuye la liberación de DA en el Nac tras la administración aguda de nicotina en rata (Tanda y Di, 1998; Maisonneuve y Glick, 1999). Por tanto, los péptidos opioides derivados de la PENK participan en el incremento de las concentraciones extracelulares de DA inducido por la nicotina en el Nac a través de la activación de los receptores opioides μ y δ.

La explicación de estos resultados puede realizarse en base a datos anatómico-funcionales. La nicotina incrementa la DA extracelular a nivel del Nac debido a la modulación que ejerce sobre las proyecciones excitatorias (neuronas glutamatérgicas) e inhibitorias (neuronas GABAérgicas) del ATV. Estas proyecciones realizan sinapsis con las neuronas dopaminérgicas que desde el ATV inervan al Nac. Además, la nicotina activa a los nAChRs expresados en estas neuronas dopaminérgicas del ATV (Mansvelder y McGehee, 2002; Laviolette y Van der Kooy, 2004) (figura 11 del apartado introducción). Estudios previos han demostrado la presencia de receptores opioides μ y δ en los terminales presinápticos de las interneuronas GABAérgicas localizadas en el ATV como en el Nac, respectivamente. Así, las interneuronas GABAérgicas del ATV expresan en su

terminal presináptico preferentemente receptores μ (Bergevin y cols., 2002) mientras que las localizadas en el Nac expresan receptores δ (Jiang y North, 1992; Hoffman y Lupica, 2001). Por otro lado, existen interneuronas encefalinérgicas que activan a estos receptores opioides en ambas áreas del circuito mesolímbico dopaminérgico (Svingos y cols., 1996; Svingos y cols., 1998; Garzon y Pickel, 2002). Asimismo, neuronas GABAérgicas que proyectan al ATV procedentes del Nac poseen ARNm que codifica para la PENK (Kalivas y cols., 1993). Por tanto, el sistema opioide endógeno, a través de la inhibición de las interneuronas GABAérgicas, produce una activación indirecta de las neuronas dopaminérgicas que proyectan del ATV hacia el Nac facilitando el aumento de DA extracelular en esta última área (figura 15).

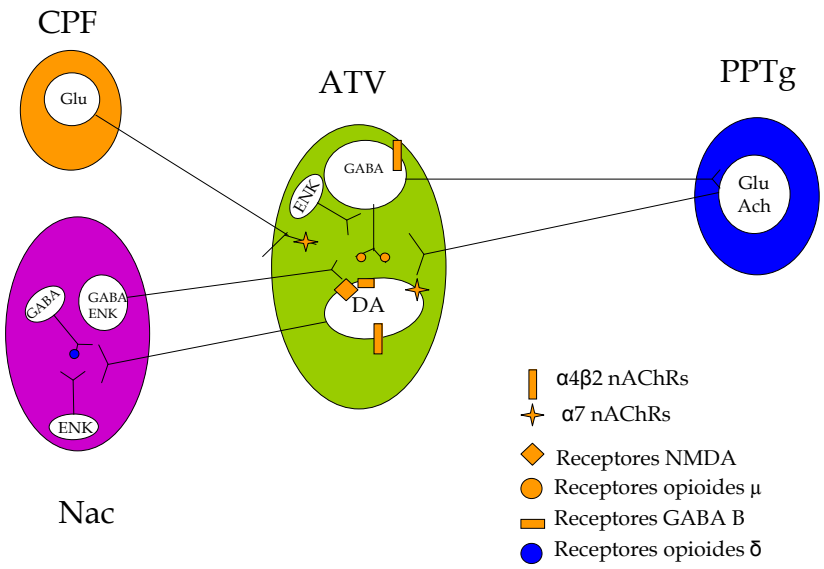


Figura 15. Representación esquemática de los componentes involucrados en el aumento de DA extracelular en el Nac inducido por la nicotina. CPF: Corteza prefrontal. Nac: Núcleo accumbens. ATV: Área tegmental ventral. PPTg: Núcleo tegmental pedúnculo-pontino; GABA: Neuronas GABAérgicas; Glu: Neuronas glutamatérgicas; DA: Neuronas dopaminérgicas; ENK: Neuronas encefalinérgicas. Ach: Neuronas acetilcolinérgicas.

Una vez demostrado que la nicotina aumenta los niveles de DA extracelular a nivel del Nac y que este aumento es dependiente de los péptidos opioides derivados de la PENK y de los receptores opioides μ y δ, hemos evaluado las propiedades reforzantes de la droga mediante el modelo de la preferencia de plaza. Los datos descritos previamente mediante la técnica de microdiálisis *in vivo*

están en la misma línea que los resultados obtenidos en este paradigma. Así, la dosis de nicotina que produce un aumento de las concentraciones extracelulares de DA en el Nac coincide con la que induce una preferencia de plaza (0.5 mg/kg). De hecho, la preferencia de plaza a la nicotina se produce en un estrecho margen de dosis ya que tan sólo dosis intermedias (0.5 mg/kg) son reforzantes para los animales wild-type, mientras que dosis más bajas (0.25 mg/kg) o más elevadas (1 mg/kg) no producen ningún efecto. La preferencia de plaza inducida por la nicotina se bloquea tanto en los animales deficientes de la PENK (artículo 1) como en los animales deficientes del receptor opioide δ (artículo 2). Al igual que en el caso de la nicotina, otras drogas como el alcohol (Matsuzawa y cols., 1999), la cocaína (Suzuki y cols., 1997) o la morfina (Suzuki y cols., 1994; Suzuki y cols., 1996) también necesitan de los receptores opioides δ para producir un condicionamiento espacial.

Existen evidencias en la literatura que demuestran la participación de los receptores opioides μ en los efectos reforzantes inducidos por la nicotina. Así, animales deficientes del receptor opioide μ no desarrollan la preferencia espacial inducida por la nicotina (Berrendero y cols., 2002). Además, bajo las condiciones experimentales que originan un condicionamiento espacial a la nicotina se produce un aumento del ARNm que codifica para los receptores opioides μ del ATV (Walters y cols., 2005), y dicho aumento es revertido por la administración previa de naloxona. Este antagonista también bloquea la inducción de la preferencia de plaza a la nicotina (Zarrindast y cols., 2003; Walters y cols., 2005). Por tanto, las encefalinas median los efectos reforzantes de la nicotina a través de la activación de los receptores opioides μ y δ.

El papel que desempeña el sistema κ/dinorfina en las propiedades aversivas y disfóricas de las drogas de abuso ha sido estudiado de manera amplia (Shippenberg y cols., 2007). Por este motivo hemos evaluado la posible participación de este sistema en los efectos motivacionales de la nicotina a través de un modelo de condicionamiento espacial. Para llevar a cabo nuestro estudio utilizamos animales deficientes del gen que codifica la PDYN. En dicho estudio se observa que los animales knockout de la PDYN desarrollan una preferencia de plaza igual que sus correspondientes controles wild-type (artículo 3), lo que demuestra que los péptidos derivados de este precursor no son necesarios para que la nicotina manifieste sus efectos reforzantes. Este dato coincide con estudios

previos en los que la preferencia de plaza inducida por drogas como la morfina (Zimmer y cols., 2001), el alcohol (Blednov y cols., 2006) o la cocaína (McLaughlin y cols., 2003) no resultó modificada en animales deficientes de la PDYN.

Con el objeto de profundizar en el estudio de la participación del sistema κ/dinorfina en los efectos reforzantes de la nicotina utilizamos la técnica de autoadministración intravenosa. Para ello, el primer objetivo del estudio fue la puesta a punto de esta técnica de autoadministración de nicotina en el ratón para poder evaluar con posterioridad las propiedades reforzantes de la droga en animales deficientes de la PDYN. La literatura científica recoge estudios de autoadministración intravenosa de nicotina en diferentes especies animales tales como primates no-humanos (Sannerud y cols., 1994; Le Foll y cols., 2007), ratas (Corrigall y Coen, 1989; Caggiula y cols., 2001; DeNoble y Mele, 2006) y ratones (Picciotto y cols., 1998; Bilkei-Gorzo y cols., 2008). La metodología utilizada en nuestro estudio es diferente a la metodología utilizada en estudios previos en ratón. Así, nuestros animales nunca sufrieron una restricción de comida (Bilkei-Gorzo y cols., 2008) o agua (Stolerman y cols., 1999) ni entrenamientos previos con estos reforzadores naturales. Tampoco fueron entrenados con anterioridad a autoadministrarse cocaína (Picciotto y cols., 1998) ni tuvieron una movilidad restringida (Fattore y cols., 2002; Paterson y cols., 2003). A través de estos entrenamientos y restricciones previos se puede conseguir acelerar el tiempo de adquisición en el comportamiento de autoadministración así como el porcentaje de adquisición de la droga. Sin embargo, esta manipulación dificulta la interpretación de los datos finales. Por lo tanto, nuestra metodología presenta una ventaja frente a los estudios anteriores ya que los animales no sufrieron ninguna alteración en sus niveles de ansiedad o estrés que pudiera modificar su comportamiento posterior. Además, las propiedades reforzantes de la nicotina no se vieron modificadas por entrenamientos previos con reforzadores naturales o no naturales que pudieran alterar el comportamiento posterior de autoadministración intravenosa de nicotina (Thomsen y Caine, 2007).

En nuestro estudio, la respuesta de autoadministración de nicotina fue dosis dependiente en ambos genotipos. Los animales wild-type mostraron la típica U-invertida en la curva dosis-respuesta que previamente ya se había observado en otras especies animales (Corrigall y Coen, 1989; Sannerud y cols., 1994). Así, a las dosis de 5.2 y 171 μg/kg/infusión se producen los porcentajes más bajos de

adquisición (16.6 y 33.3%, respectivamente) y de número de infusiones (12 y 11 infusiones de media, respectivamente) en comparación con las dosis intermedias (10.6, 21.3, 42.7 y 85.5 μg/kg/infusión) en las que se producen mayores respuestas (21, 26, 17 y 17 infusiones de media, respectivamente). En los animales deficientes de los péptidos derivados de la PDYN se observó un desplazamiento hacia la izquierda de esta curva dosis respuesta (artículo 3). Así, en los animales knockout las dosis más bajas de nicotina (5.2 y 10.6 μg/kg/infusión) son las que inducen un mayor porcentaje de adquisición (50 y 60%, respectivamente) y un mayor número de infusiones (27 infusiones de media en ambos casos). Este desplazamiento hacia la izquierda sugiere una facilitación de los efectos reforzantes de la nicotina en los animales deficientes de la PDYN, ya que en estos animales knockout son necesarias dosis menores de la droga para producir similares porcentajes de adquisición y número de infusiones que en los controles wild-type. Nuestros resultados son similares a los observados con otras drogas tales como la cocaína o los cannabinoides. Así, una menor actividad del sistema κ/dinorfina aumenta la sensibilidad a los efectos neuroquímicos y comportamentales de la cocaína (Shippenberg y cols., 2007). Asimismo, nuestro grupo de investigación ha demostrado recientemente que en animales deficientes PDYN existe también un desplazamiento hacia la izquierda de la curva dosis respuesta de administración intravenosa del agonista cannabinoide sintético WIN 55,212-2 (Mendizabal y cols., 2006).

La explicación del aumento de la sensibilidad de los animales deficientes de la PDYN en la autoadministración de nicotina se basa en el mecanismo de acción del sistema κ/dinorfina. Así, la administración intra-estriatal de dinorfina (1-17) disminuye los niveles basales de DA en el Nac (Zhang y cols., 2004). Por otro lado, los animales deficientes en el receptor opioide κ poseen niveles elevados de DA extracelular en esta región (Chefer y cols., 2005). Estos datos sugieren que el sistema κ/dinorfina mantiene una actividad tónica inhibitoria sobre la transmisión dopaminérgica en el Nac. Por tanto, la ausencia de este efecto inhibitorio de las dinorfinas sobre la facilitación de la actividad dopaminérgica inducida por la nicotina podría explicar el incremento de la sensibilidad de los animales knockout en el paradigma de autoadministración intravenosa.

Estos resultados podrían tener una relevancia clínica ya que se ha observado que personas que son menos sensibles a los efectos aversivos de la nicotina tienen

mayor probabilidad de continuar fumando (Friedman y cols., 1985) y los que acaban desarrollando una dependencia al tabaco suelen presentar una mayor sensibilidad a los efectos reforzantes de la droga (Pomerleau y cols., 1998). En relación a otras drogas de abuso, determinados polimorfismos en el gen que codifica para la dinorfina se han relacionado con la dependencia de cocaína (Dahl y cols., 2005), mientras que polimorfismos para el gen que codifica al receptor opioide κ se han relacionado con el alcoholismo (Xuei y cols., 2006). Por tanto, el estudio de las posibles variantes genéticas en el sistema κ/dinorfina que pudieran asociarse a la predisposición a desarrollar una dependencia al tabaco serían de gran interés.

3. Participación del sistema opioide endógeno en la dependencia de nicotina

Muchos estudios han demostrado la existencia de una interacción entre la nicotina y el sistema opioide endógeno en la regulación de la dependencia nicotínica. Así, la administración de antagonistas opioides, como la naloxona o naltrexona, es capaz de precipitar un síndrome de abstinencia tanto en roedores como en humanos dependientes de nicotina (Sutherland y cols., 1995; Krishnan-Sarin y cols., 1999; Carboni y cols., 2000; Balerio y cols., 2004). Asimismo, la administración de morfina disminuye la sintomatología física de la abstinencia espontánea en animales dependientes de nicotina (Malin y cols., 1993). Con respecto a la sintomatología emocional negativa, la naloxona es capaz de inducir una aversión de plaza en animales tratados crónicamente con nicotina (Ise y cols., 2000; Zarrindast y cols., 2003). Nuestros estudios demuestran que los animales deficientes de la PENK manifiestan una menor sintomatología física de la abstinencia nicotínica (artículo 1). Sin embargo, los animales deficientes del receptor opioide δ (artículo 2) no muestran cambios en esta sintomatología física de la abstinencia. Por otra parte, un estudio previo demuestra que los animales deficientes del receptor opioide μ manifiestan menor dependencia física de nicotina que sus correspondientes controles wild-type (Berrendero y cols., 2002). Aparte de estos estudios comportamentales que demuestran la relación existente entre la abstinencia de nicotina y el sistema opioide endógeno, otras investigaciones muestran alteraciones en los niveles de los péptidos opioides en

animales abstinentes a la droga. Una disminución de la POMC ha sido demostrada en el hipotálamo en etapas tempranas y tardías de la abstinencia de nicotina (Rasmussen, 1998). Además, se ha observado un aumento del ARNm para la PENK así como un incremento de met-encefalina en el estriado y el hipocampo de roedores abstinentes (Dhatt y cols., 1995; Houdi y cols., 1998; Isola y cols., 2002). En conjunto, estos datos comportamentales y bioquímicos indican que las encefalinas, a través de la activación de los receptores opioides μ, participan en las manifestaciones de la abstinencia física de nicotina. Sin embargo, los receptores opioides δ no parecen participar en este fenómeno.

Los animales deficientes de la PDYN no muestran una escala global de severidad de la abstinencia de nicotina diferente de sus correspondientes controles wild-type (artículo 3), dato similar al publicado en el caso de la abstinencia física de morfina en estos mismos ratones knockout (Zimmer y cols., 2001). Un artículo publicado recientemente ha demostrado un aumento del ARNm que codifica para el gen de la PDYN en el Nac de ratones abstinentes de nicotina (Isola y cols., 2008), que puede estar relacionado con el estado disfórico que se asocia a la abstinencia. Por tanto, podemos sugerir que los péptidos opioides derivados de la PDYN no intervienen en la sintomatología física de la abstinencia nicotínica pero podrían estar relacionados con el estado disfórico asociado a la misma.

4. Participación del sistema opioide endógeno en la tolerancia a los efectos hipolocomotores y antinociceptivos inducidos por la administración crónica de nicotina

La tolerancia se define como el aumento de la dosis de la droga necesario para mantener un efecto estable e igual al inicial (Nestler y Aghajanian, 1997). Este proceso, junto con la sensibilización, constituye uno de los cambios neurológicos adaptativos que aparecen durante el desarrollo y mantenimiento de la dependencia de una droga (Koob y Le Moal, 2006). La tolerancia a ciertos efectos agudos producidos por la nicotina es debida a la desensibilización compensada de una sobreexpresión de los receptores nAChRs (Picciotto y cols., 2008). Uno de los efectos agudos de la nicotina más importantes a los que se desarrolla tolerancia es el antinociceptivo (Damaj y Martin, 1996). Con la finalidad de evaluar el sustrato de la tolerancia a la nicotina pusimos a punto un modelo de tolerancia al efecto

antinociceptivo de la misma en ratones C57BL/6. Esta cepa de ratones es el fondo genético en el que se han desarrollado los ratones knockout en los diferentes componentes del sistema opioide endógeno. Para observar una tolerancia a dicho efecto y debido a la corta vida media de la nicotina (2-3 h) (Benowitz, 1996) realizamos una inyección de nicotina a la dosis de 5 mg/kg (s.c) 3 veces al día durante 12 días consecutivos. Bajo estas condiciones, la tolerancia antinociceptiva empieza a manifestarse a partir del cuarto día de tratamiento siendo más evidente en los últimos días del mismo, aunque no llega a desarrollarse una tolerancia absoluta bajo estas condiciones experimentales (artículo 4). Utilizando este mismo protocolo evaluamos el posible desarrollo de tolerancia a los efectos hipolocomotores de la nicotina. Bajo nuestras condiciones experimentales no fue posible poner de manifiesto una tolerancia a estos efectos hipolocomotores (artículo 4), aunque otros investigadores utilizando diferentes modelos experimentales han logrado desarrollarla (Pietila y cols., 1998; Sparks y Pauly, 1999). El protocolo que diseñamos fue pues el modelo óptimo para observar una tolerancia antinociceptiva, efecto sobre el que hemos evaluado el posible papel regulador del sistema opioide endógeno.

Mediante la utilización de técnicas autorradiográficas observamos un aumento de la actividad funcional de los receptores opioides μ en las láminas lumbares de la médula espinal de los animales tolerantes a la nicotina. Sin embargo, en áreas cerebrales como el caudado putamen y Nac se observó una disminución de la densidad de los receptores, aunque la actividad funcional de dichos receptores no se modificó en estas mismas áreas tras la administración crónica de la droga (artículo 4). Estudios previos han demostrado la interacción existente entre el sistema opioide y el fenómeno de tolerancia antinociceptiva inducida por nicotina. En efecto, el desarrollo de una tolerancia cruzada entre morfina y nicotina (Zarrindast y cols., 1999; Biala y Weglinska, 2006) demuestra la existencia de mecanismos comunes en la mediación de este fenómeno. Por otro lado, la administración crónica de nicotina altera los niveles tanto de los péptidos como de los receptores opioides (Mathieu-Kia y Besson, 1998; Wewers y cols., 1999) pudiendo ser éste uno de los mecanismos comunes que explique la tolerancia cruzada entre ambas drogas. Con el objeto de profundizar en el significado fisiológico de las alteraciones bioquímicas obtenidas en nuestro estudio, hemos evaluado la tolerancia antinociceptiva de la nicotina en animales deficientes del

receptor opioide μ. En dicho estudio demostramos que la tolerancia antinociceptiva se desarrolló más rápido en los ratones knockout que en sus correspondientes controles. Este resultado sugiere que el aumento de la actividad funcional de los receptores opioides μ a nivel de la médula espinal producido por la administración crónica de nicotina intenta frenar el desarrollo de la tolerancia antinociceptiva (artículo 4). El tratamiento crónico de nicotina produce una disminución en la expresión del ARNm que codifica para la PENK en estriado e hipocampo de rata (Houdi y cols., 1998), así como una disminución del contenido de met-encefalina en el estriado de esta misma especie animal (Houdi y cols., 1998; Wewers y cols., 1999), probablemente debida a la desensibilización de los nAChRs asociada a esta administración crónica. El incremento en la densidad (Wewers y cols., 1999) y/o actividad funcional de los receptores opioides μ, producido probablemente para compensar el déficit de los péptidos opioides, facilitará la capacidad antinociceptiva de la nicotina frenando el desarrollo de su tolerancia. Esta hipótesis se apoya en los datos obtenidos en los animales deficientes del receptor μ y en la colocalización de los nAChRs con los receptores opioides μ en diversas láminas de la médula espinal (Yaksh T.L., 1993; Rashid y cols., 2006).

El papel que desempeña el sistema κ/dinorfina en el fenómeno de tolerancia antinociceptiva de la nicotina fue también evaluado. Mediante técnicas autorradiográficas observamos una disminución en la densidad de los receptores opioides κ en las láminas lumbares de la médula espinal en los animales tolerantes a la nicotina. En cambio, se observó un aumento en la densidad de estos receptores en áreas cerebrales tales como el caudado putamen, la corteza cingulada y la corteza motora. Para profundizar en la importancia funcional de estos datos se puso a punto un modelo de tolerancia antinociceptiva cruzada entre la nicotina y el agonista opioide κ U-50,488H (artículo 5). El ensayo de la inmersión de la cola, el cual se relaciona de manera predominante con una respuesta nociceptiva a nivel espinal, y el ensayo de la placa caliente, relacionado con la respuesta nociceptiva a nivel supraespinal fueron los métodos utilizados para evaluar el efecto antinociceptivo de la nicotina. La nicotina (5 mg/kg s.c, 3 inyecciones/día), el U-50,488H (10 mg/kg s.c, 1 inyección/día) y el salino se administraron durante 12 días consecutivos. Los animales recibieron una administración aguda de diferentes dosis de nicotina (1.5, 3 y 5 mg/kg, s.c), U-50,488H (5, 10 y 20 mg/kg, s.c) o salino el último día de tratamiento. Una tolerancia cruzada bi-direccional al efecto

antinociceptivo espinal de ambas drogas fue observada bajo estas condiciones experimentales (artículo 5). La explicación de la existencia de esta tolerancia cruzada se basa en los datos obtenidos mediante las técnicas autorradiográficas. Así, el tratamiento crónico con nicotina produce una disminución en la densidad de los receptores opioides κ en la médula espinal. Por consiguiente, la administración aguda de U-50,488H en animales tolerantes a la nicotina producirá un menor efecto antinociceptivo que en animales no tolerantes debido al menor número de receptores κ que podrán ser activados por este agonista opioide. Por otro lado, Narita y colaboradores (2003a, b) observaron que el tratamiento crónico con U-50,488H producía una disminución en la funcionalidad de los receptores opioides κ a nivel medular. Hemos demostrado previamente que la antinocicepción espinal aguda inducida por la nicotina está mediada por los receptores opioides κ (artículo 5) por lo que la nicotina en animales tolerantes al agonista κ producirá un menor efecto antinociceptivo debido a la disminución en la funcionalidad de estos receptores. Sin embargo, esta tolerancia cruzada bi-direccional no se observó en el ensayo de la placa caliente (artículo 5), aunque una tolerancia homóloga se desarrolló para todas las dosis de nicotina evaluadas y para las dosis elevadas del agonista opioide κ (10 y 20 mg/kg). En acuerdo con estos resultados existen evidencias que apoyan la ausencia de interacción entre la nicotina y el U-50,488H a nivel supraespinal. Así, estudios previos han demostrado que la administración aguda intracerebroventricular de nicotina no potencia la respuesta antinociceptiva del U-50,488H cuando este agonista es administrado por vía intracerebroventricular (Suh y cols., 1996). Los resultados comportamentales apoyan los datos obtenidos mediante las técnicas autorradiográficas ya que no se observaron modificaciones en los niveles de los receptores opioides κ en áreas supraespinales relacionadas con el control del dolor como la sustancia gris periacueductal o el tálamo, tras la administración crónica de nicotina. Por tanto, los resultados obtenidos indican que los receptores opioides μ y κ participan de forma opuesta en el desarrollo de la tolerancia a los efectos antinociceptivos de la nicotina. Así, la actividad funcional de los receptores opioides μ aumenta a nivel medular durante el tratamiento crónico con nicotina con el objeto de mantener el efecto antinociceptivo. Sin embargo, el descenso en la densidad de los receptores opioides κ en la médula espinal contribuye al desarrollo de la tolerancia antinociceptiva de la nicotina. De acuerdo con nuestros datos, estudios previos

(Narita y cols., 2003a; Narita y cols., 2003b; Khotib y cols., 2004) indican que la inyección crónica de U-50,488H induce una disminución de la actividad funcional de los receptores opioides κ en áreas del control del dolor como la médula espinal, el tálamo o la sustancia gris periacueductal y un aumento de la actividad funcional de los receptores μ en estas mismas estructuras (Narita y cols., 2003a; Narita y cols., 2003b; Khotib y cols., 2004). Esta diferente regulación de los receptores opioides μ y κ es importante para el mantenimiento de la homeostasis del organismo ya que dichos receptores opioides poseen algunos efectos fisiológicos contrapuestos. Así, los receptores opioides μ participan en los efectos reforzantes (Matthes y cols., 1996; Roberts y cols., 2000; Berrendero y cols., 2002; Ghozland y cols., 2002) mientras que los receptores opioides κ median los efectos disfóricos y aversivos de las drogas de abuso (Simonin y cols., 1998; Mendizabal y cols., 2006).

La tolerancia cruzada a los efectos hipolocomotores de ambas drogas ha sido también evaluada mediante el procedimiento anteriormente descrito. Así, en el grupo tratado con nicotina crónica observamos una tolerancia homóloga a los efectos hipolocomotores de la droga. En contraste con este resultado, habíamos descrito previamente una ausencia de tolerancia a dichos efectos utilizando diferentes condiciones experimentales (artículo 4). Los distintos resultados obtenidos en ambos experimentos pueden ser debidos a las diferencias metodológicas. Así, en el experimento de tolerancia cruzada no se habituaron los animales a las cajas de actividad locomotora lo que supone un aumento de la actividad del animal que tiende a explorar un ambiente nuevo. Esta diferencia puede explicar la tolerancia homóloga observada ya que el efecto de tolerancia puede confundirse con un aumento de la actividad locomotora del animal. Por otro lado, los animales tolerantes a la nicotina mostraron una tolerancia heteróloga tras recibir una inyección aguda de U-50,488H (10 mg/kg). Esta tolerancia heteróloga no se correlaciona con el aumento en el número de receptores opioides κ observado en áreas de integración motora (caudado putamen, la corteza cingulada y la corteza motora) en animales tolerantes a la nicotina.

Por otro lado, la administración crónica de nicotina no indujo cambio en el contenido de dinorfinas en la médula espinal, determinado mediante técnicas de inmuno-histoquímica. La tolerancia antinociceptiva de opiáceos y cannabinoides se ha relacionado con la capacidad que poseen estas drogas de generar hiperalgesia y alodinia tras su administración crónica (Vanderah y cols., 2000; Gardell y cols.,

2002; Ossipov y cols., 2003). Esta pronocicepción se ha asociado con un aumento de las concentraciones de dinorfinas a nivel espinal y la posterior activación de los receptores de tipo NMDA (Laughlin y cols., 2001). De esta manera, el pre-tratamiento con el antagonista NMDA MK-801 disminuye el desarrollo de la tolerancia a los efectos antinociceptivos de la morfina (Trujillo y Akil, 1991) y del agonista cannabinoide sintético WIN-55,212-2 (Gardell y cols., 2002). Sin embargo, en nuestro estudio no observamos cambios en el contenido de las dinorfinas espinales en los animales tolerantes. No obstante, debido a que la administración de nicotina induce una disminución de los receptores opioides κ a nivel espinal no podemos descartar la posibilidad de que las dinorfinas endógenas puedan activar otro tipo de receptores como los nAChRs (Oka y cols., 1998) o NMDA. En base a esta hipótesis, hemos evaluado el papel de los receptores NMDA en el fenómeno de la tolerancia antinociceptiva inducida por nicotina. El pre-tratamiento con MK-801 no alteró el desarrollo de la tolerancia sugiriendo que los receptores NMDA no participan en dicho fenómeno (artículo 5). Una posible explicación a la divergencia entre nuestros resultados y los publicados en el caso de opiáceos o cannabinoides (Trujillo y Akil, 1991; Gardell y cols., 2002) puede ser la diferencia en los mecanismos de acción de cada una de las drogas. Así, la nicotina es una droga que induce excitación de las vías neuronales, mientras que opiáceos y cannabinoides producen inhibición de la transmisión nerviosa. Contrariamente a nuestros datos, otros autores han demostrado que los antagonistas NMDA previenen la sobreexpressión de los nAChRs y disminuyen la tolerancia a los efectos depresores de la nicotina (Shoaib y cols., 1994; Shoaib y cols., 1997). La diferente respuesta comportamental de la nicotina medida en ambos estudios (antinocicepción *versus* hipolocomoción) puede ser la explicación de la discrepancia entre ellos.

Por último, investigamos también el papel de los receptores opioides δ en el desarrollo de la tolerancia a los efectos antinociceptivos de la nicotina. La administración crónica de nicotina no modificó la densidad ni la actividad funcional de los receptores opioides δ ni a nivel medular ni en las diferentes estructuras cerebrales analizadas (artículo 2). La escasa densidad de receptores δ y la falta de colocalización de estos receptores opioides con los receptores nAChRs en las estructuras responsables del control del dolor (Yaksh T.L., 1993; Mansour y cols., 1995; Genzen y cols., 2001; Young y cols., 2008) podrían explicar los resultados observados.

5. Puesta a punto de un modelo comportamental de recaída a la conducta adictiva de la nicotina

El tabaquismo es una enfermedad crónica recurrente caracterizada por frecuentes recaídas incluso después de periodos largos de abstinencia. Con la finalidad de estudiar el sustrato neurobiológico que media este fenómeno, hemos puesto a punto un modelo de recaída a la búsqueda de la nicotina en ratones C57BL/6 que permita en el futuro estudiar el papel de cada uno de los componentes del sistema opioide endógeno en este proceso. Para ello, hemos utilizado el paradigma de autoadministración intravenosa ya que este modelo permite evaluar la eficacia reforzante de una droga, así como los diferentes procesos implicados en la conducta adictiva tales como la adquisición, el mantenimiento, la extinción y la recaída. Desde el punto de vista de la cinética de los efectos de la nicotina la vía intravenosa se asimila a las caladas realizadas por los fumadores (Cami y Farre, 2003; Thomsen y Caine, 2007). En este sentido, la droga llega al cerebro en pocos segundos consiguiendo de esta manera que el animal asocie el placer producido por la droga y el hecho de introducir el hocico en el manipulando activo (contingencia). A diferencia de otros estudios realizados en ratón, nuestros animales no fueron deprivados ni entrenados previamente con comida, agua o entrenados con otros reforzadores como la cocaína (Picciotto y cols., 1998; Stolerman y cols., 1999; Bilkei-Gorzo y cols., 2008). Tampoco su movilidad estuvo restringida (Fattore y cols., 2002; Paterson y cols., 2003), por lo que ningún factor externo modificó el patrón de adquisición de la droga.

Durante las sesiones de adquisición del comportamiento de autoadministración de nicotina, las infusiones recibidas de manera contingente por el animal están pareadas con estímulos luminosos y con el tono sonoro producido por la activación de la bomba de infusión. El 76% de los animales adquirió el comportamiento de autoadministración bajo el criterio de adquisición utilizado (80% de estabilidad, 65% de discriminación entre manipulandos, y un mínimo de 4 infusiones de nicotina) frente al 22% de animales que se autoadministran salino bajo criterios de adquisición similares al nuestro (Trigo y cols., 2007). Estos porcentajes de adquisición demuestran la existencia de una respuesta estable a la búsqueda de la droga descartándose una posible respuesta asociada a la presencia de los estímulos luminosos. Nuestro criterio de adquisición fue menos estricto en

comparación con los publicados para otras especies animales (Corrigall y cols., 2002; DeNoble y Mele, 2006; Le Foll y cols., 2007). La utilización de este criterio se justifica en base a: (1) la nicotina en los ratones es 4 veces menos potente (Stolerman y cols., 1999) que en otras especies animales como las ratas a causa de la farmacocinética particular de la droga en el ratón, (2) la gran variabilidad comportamental de los ratones en este tipo de paradigma, (3) el ratón necesita más tiempo de entrenamiento hasta que adquiere el comportamiento de autoadministración, (4) los ratones son menos sensibles a los cambios de las variables que caracterizan a este paradigma tales como los cambios en los programas de refuerzo FR1, FR3, PR, (5) la escasa duración de la permeabilidad del catéter en esta especie animal (Thomsen y Caine, 2007). Apoyando la validez de nuestro criterio de adquisición está el hecho de que criterios similares han sido utilizados en ratones para la autoadministración de otras drogas como la cocaína (Soria y cols., 2005) o el MDMA (Trigo y cols., 2006).

Una vez que los animales adquirieron el comportamiento de autoadministración, se procedió a la extinción de dicha conducta. El animal no recibió ninguna infusión de la droga durante las sesiones de extinción. Además, tampoco se presentaron los estímulos asociados a la administración de la droga (luz y tono sonoro). En la literatura científica existe una amplia variedad de criterios que se utilizan para validar que el animal ha extinguido el comportamiento de autoadministración previamente adquirido. El criterio utilizado en nuestro estudio fue más estricto que los publicados previamente en ratones. Así, nuestros animales debían disminuir en un 30% sus respuestas en el manipulando activo al menos durante 3 días consecutivos en comparación con la media del número de respuestas realizadas durante la fase de adquisición. Sin embargo, otros grupos de investigación consideran que los ratones han extinguido cuando (1) realizan menos de 25 (Fuchs y cols., 2003) o 15 (Yan y cols., 2006; Yan y cols., 2007) respuestas en el manipulando activo durante dos días consecutivos, o (2) realizan menos del 25% de infusiones en el manipulando activo durante dos días consecutivos comparado con lo realizado en la fase de adquisición (Yan y cols., 2006; Yan y cols., 2007). Nuestro criterio es similar a un estudio de recaída a la búsqueda de cocaína en ratón previamente realizado en nuestro laboratorio (Soria y cols., 2008) y al único estudio de recaída a la adicción a la nicotina en

ratones realizado hasta el momento de redactar este trabajo de investigación (Bilkei-Gorzo y cols., 2008).

Las características del periodo de extinción de nuestro estudio son similares a las del periodo de extinción de otras drogas de abuso tales como la cocaína o la metamfetamina (Cooper y cols., 1987; Yan y cols., 2007; Soria y cols., 2008). Estas características son: (1) un aumento del número de respuestas realizadas por el animal tanto en el manipulando activo como en el inactivo durante el primer día de extinción, (2) una pérdida progresiva de la discriminación entre manipulandos a lo largo de los días de extinción, (3) una resistencia a extinguir la conducta de autoadministración previamente adquirida. Es preciso resaltar la existencia de una correlación positiva entre el número de respuestas realizadas en el manipulando activo los días de adquisición del criterio de autoadministración y el número de respuestas en el manipulando activo durante el primer día de extinción. Esta correlación positiva indica que aquellos ratones que consumieron más nicotina durante los días que cumplen el criterio de adquisición fueron los que buscaron de manera más insistente la misma durante el primer día de extinción. En relación a la resistencia a extinguir un comportamiento de autoadministración previamente adquirido, se ha demostrado en estudios previos (Highfield y cols., 2002; Yan y cols., 2007) que la cepa C57BL/6 es bastante resistente a extinguir una conducta de autoadministración de drogas tales como la cocaína o la metamfetamina. En estos estudios previos, los ratones extinguen la conducta de autoadministración entre 18 y 20 días de media en comparación con los 22 días de nuestro trabajo de investigación. En acuerdo con nuestros resultados, Cohen y colaboradores (2005) demostraron que ratas entrenadas a autoadministrarse nicotina extinguieron dicho comportamiento entre 20 y 30 días después del inicio de las sesiones de extinción (Cohen y cols., 2005). Este último dato es de gran importancia debido a que los periodos de extinción de la conducta de autoadministración de nicotina en ratas suelen ser más cortos que en el caso del ratón (Lesage y cols., 2004; Liu y cols., 2007) aunque este tiempo depende de las exigencias de las condiciones de extinción (Cohen y cols., 2005). La resistencia a la extinción está relacionada con el bajo porcentaje de animales (38%) que extinguió la conducta de autoadministración en nuestro estudio. Este reducido porcentaje de extinción puede tener dos causas: (1) el criterio de extinción utilizado es muy estricto, lo cual presenta la ventaja de evitar falsos positivos, y (2) el valor motivacional que

adquieren los estímulos contextuales (caja de autoadministración) durante las sesiones de adquisición se mantiene y actúa como un estímulo asociado al consumo de nicotina durante las sesiones de extinción (Shaham y cols., 1997; Shalev y cols., 2002).

Los tres factores que inducen recaída en humanos, exposición de los estímulos ambientales asociados a la toma de la droga, nuevo contacto con la droga y estrés, fueron evaluados una vez que el animal extinguió el comportamiento de búsqueda de nicotina. Consideramos que un animal recayó en la conducta de búsqueda de nicotina cuando el número de respuestas en el manipulando activo fue el doble que el número de repuestas en el manipulando activo los días de adquisición del criterio de extinción. También consideramos que se cumplió el criterio de recaída cuando el animal realizó más de 10 respuestas en el manipulando activo.

En nuestro estudio, el 90% de los animales a los que se les presentó los estímulos condicionados al consumo de nicotina (luz y tono sonoro) recayó en la conducta adictiva. Muchos autores consideran que los efectos reforzantes de la nicotina son débiles (Caggiula y cols., 2001; Chiamulera, 2005) cuando son comparados con los que producen otras drogas de abuso. Sin embargo, este hecho no se relaciona con el alto índice de consumo de tabaco en humanos (Anthony y cols., 1994; WHO, 2008). Se piensa que las propiedades reforzantes de la nicotina son las causantes del inicio del proceso adictivo pero que son los estímulos asociados a su consumo los que mantienen el tabaquismo. Estos estímulos, cuando se presentan nuevamente, tienen la capacidad de inducir recaída después de periodos largos de abstinencia (Caggiula y cols., 2001; Caggiula y cols., 2002; Chiamulera, 2005; Liu y cols., 2006). Este hecho se debe a que estos estímulos adquieren propiedades reforzantes mediante un proceso de aprendizaje clásico al asociarse de manera repetida con la droga (Goldberg y cols., 1981; McFarland y Ettenberg, 1997; Deroche-Gamonet y cols., 2004). Se ha postulado que estos refuerzos condicionados tienen la capacidad de inducir un estado subjetivo que contribuye al deseo por la droga y a la recaída. Por otro lado, la nicotina puede también favorecer que los estímulos adquieran propiedades reforzantes por su capacidad de mejorar la interpretación cognitiva como se ha demostrado en diferentes ensayos que evalúan el aprendizaje, la memoria y la atención (Levin y cols., 2006).

El siguiente factor analizado para inducir recaída consistió en la exposición del animal a un nuevo contacto con la nicotina de manera no contingente (administrada por el investigador). Se utilizaron dos grupos de animales diferentes: un primer grupo recibió 0.5 mg/kg, (s.c) de nicotina mientras que un segundo grupo recibió de manera individual la media de la nicotina consumida durante los tres días que el animal alcanzó el criterio de adquisición. La dosis de nicotina que se administró en este segundo grupo resultó una dosis superior a la de 0.5 mg/kg (s.c). En el primer grupo de animales, sólo un 30% de los que recibió la droga recayó en el comportamiento de búsqueda de la nicotina. La dosis de nicotina (0.5 mg/kg) y la ruta de administración (s.c) fueron elegidas en base a los resultados de estudios previos realizados en nuestro laboratorio en los que la dosis de 0.5 mg/kg (s.c) indujo una preferencia de plaza y un aumento de las concentraciones extracelulares de DA en el Nac en ratones C57BL/6 (Berrendero y cols., 2002; Berrendero y cols., 2005). Además, otros autores utilizaron dosis similares (0.28, 0.42 y 0.85 mg/kg) y la misma ruta de administración (s.c) para inducir una recaída a la búsqueda de nicotina en ratas (Shaham y cols., 1997; Dravolina y cols., 2007). Una posible hipótesis que explica la baja proporción de animales que recae mediante este factor es la basada en la amplia duración del periodo de extinción. Así, estudios previos indican que cuanto mayor es el número de sesiones necesarias para cumplir el criterio de extinción menor es el porcentaje de recaída por nuevo contacto con la droga (Highfield y cols., 2002; Yan y cols., 2006). Además, se ha demostrado que el nuevo contacto con la droga es el factor que provoca un menor porcentaje de recaída a drogas como cocaína o metamfetamina en ratones (Highfield y cols., 2002; Fuchs y cols., 2003; Yan y cols., 2006). Asimismo, el hecho de que los estímulos asociados al consumo de la droga adquieran durante el transcurso del proceso adictivo mayor poder reforzante que la droga en sí apoya los datos obtenidos en nuestro estudio. De esta forma, hemos observado un mayor porcentaje de recaída tras la presentación de luz o tono sonoro en comparación con el porcentaje de recaída que se produce con el nuevo contacto con la droga. Por otro lado, ninguno de los animales analizados pertenecientes al segundo grupo recayó a la conducta de búsqueda de la nicotina. Este resultado puede deberse al escaso poder reforzante de la nicotina cuando se administra a dosis superiores a 0.5 mg/kg. De hecho, dosis mayores a 0.5 mg/kg no poseen la capacidad de inducir una preferencia de plaza ni un aumento de los

niveles extracelulares de DA en el Nac, dos hechos directamente relacionados con las capacidades reforzantes de la nicotina (Castañé y cols., 2002; Berrendero y cols., 2005). En los dos grupos utilizados para estudios de recaída por nuevo contacto con la droga se descartó el uso de la vía intravenosa como ruta para administrar la nicotina debido a la baja duración del catéter (12 días de media desde el comienzo del estudio).

Por último, evaluamos la capacidad del estrés para inducir recaída a la búsqueda de la droga en ratones. Para lograr nuestro objetivo utilizamos dos intensidades diferentes de descargas eléctricas, 0.22 y 0.5 mA, aplicadas en las patas del ratón. Un 50% de animales recayó al comportamiento de búsqueda de la droga cuando se utilizó la menor intensidad eléctrica (0.22 mA). Esta intensidad de descarga se escogió basándonos en estudios previos de recaída a la búsqueda de cocaína en ratones (Soria y cols., 2008). Por otro lado, la intensidad de 0.5 mA no produjo ninguna recaída a la búsqueda de nicotina en nuestro estudio, aunque esta misma intensidad de descarga fue utilizada por Bilkei-Gorzo y colaboradores (2008) para inducir recaída a la búsqueda de nicotina en ratones. Estos investigadores no consiguieron que ratones C57BL/6 recayeran a la búsqueda de nicotina después de haber recibido esta intensidad eléctrica. Sin embargo, demostraron que una subpoblación de C57BL/6 con un fondo genético de alta reacción al estrés recaía a la búsqueda de la nicotina tras recibir esta intensidad de 0.5 mA (Bilkei-Gorzo y cols., 2008). Para terminar, debemos comentar que intensidades más elevadas (0.8 mA) que las usadas en nuestro estudio inducen recaída a la búsqueda de nicotina en ratas (Buczek y cols., 1999; Zislis y cols., 2007).

Conclusiones

El trabajo desarrollado en la presente Tesis Doctoral permite extraer las siguientes conclusiones:

1. A nivel espinal, los efectos antinociceptivos agudos de la nicotina están mediados por los péptidos opioides derivados de la proencefalina, a través de su unión a los receptores opioides μ. Los receptores opioides κ también participan en la antinocicepción aguda mientras que los receptores δ no están implicados en este efecto.
2. A nivel supraespinal, los péptidos opioides derivados de la proencefalina, mediante la activación de los receptores μ, participan en la antinocicepción inducida por la administración aguda de la nicotina. Sin embargo, ni los receptores opioides δ ni los κ median este efecto.
3. Los péptidos opioides derivados de la proencefalina y la prodinorfina y los receptores opioides μ, δ y κ no participan en los efectos hipolocomotores producidos por la administración aguda de nicotina.
4. El aumento de las concentraciones extracelulares de DA inducido en el Nac por la administración aguda de nicotina está mediado por los péptidos opioides derivados de la proencefalina y los receptores opioides μ y δ. Además, estos mismos componentes del sistema opioide endógeno regulan los efectos de recompensa de la droga.
5. Los péptidos opioides derivados de la prodinorfina intervienen en los efectos motivacionales de la nicotina, posiblemente mediando los aspectos aversivos y disfóricos de la droga. Así, la ausencia de los mismos incrementa la sensibilidad a la autoadministración intravenosa de nicotina.
6. Los péptidos opioides derivados de la proencefalina, a través de su unión a los receptores opioides μ, participan en las manifestaciones somáticas del síndrome de abstinencia de nicotina. Sin embargo, los receptores opioides δ y los péptidos opioides derivados de la prodinorfina no intervienen en la sintomatología física de la abstinencia nicotínica.
7. El tratamiento crónico con nicotina produce un aumento de la actividad funcional de los receptores opioides μ en la médula espinal.

Este incremento se produce con el objeto de atenuar el desarrollo de la tolerancia a los efectos antinociceptivos de la nicotina.

8. El tratamiento crónico con nicotina produce una disminución a nivel espinal de los receptores opioides κ en animales tolerantes a la droga, descenso que favorece el desarrollo de la tolerancia antinociceptiva.
9. La administración crónica de nicotina no aumenta los niveles de dinorfinas en la médula espinal, en contraste con otras drogas como los opiáceos y los cannabinoides. Además, los receptores de tipo NMDA no participan en el fenómeno de tolerancia antinociceptiva de la nicotina.
10. Los estímulos asociados al consumo de nicotina constituyen el factor más importante en la inducción de recaída a la búsqueda de la nicotina en ratón. El nuevo contacto con la droga constituye el factor que induce un menor porcentaje de recaída mientras que el estrés se sitúa entre ambos factores.

Referencias

Ahmed SH, Koob GF, 1998. Transition from moderate to excessive drug intake: change in hedonic set point. Science 282: 298-300.

Álvarez Y, Farré M, 2005. Neurobiología de los opiáceos, vol. 17. Adicciones: revista de socidrogalcohol, pp. 21-40.

Anggadiredja K, Sakimura K, Hiranita T, Yamamoto T, 2004. Naltrexone attenuates cue- but not drug-induced methamphetamine seeking: a possible mechanism for the dissociation of primary and secondary reward. Brain Res. 1021: 272-276.

Anthony J, Warner A, essler R, 1994 Comparative epidemiology of dependence on tobacco, alcohol, controlled substances, and inhalants: basic findings from the national comorbidity survey. Exp. Clin. Psychopharmacol, pp. 244-268.

Anton B, Fein J, To T, Li X, Silberstein L, Evans CJ, 1996. Immunohistochemical localization of ORL-1 in the central nervous system of the rat. J. Comp Neurol. 368: 229-251.

Araki H, Kawakami KY, Jin C, Suemaru K, Kitamura Y, Nagata M, Futagami K, Shibata K, Kawasaki H, Gomita Y, 2004. Nicotine attenuates place aversion induced by naloxone in single-dose, morphine-treated rats. Psychopharmacology (Berl) 171: 398-404.

Asociación Americana de Psiquiatría, 1994 Diagnostic and statistical manual of mental disorders, 4*th* ed. American psychiatric press, Washington DC.

Backon J, 1989. Negative correlation of cigarette smoking and dysmenorrhea: reduced prostaglandin synthesis due to beta-endorphin, nicotine, or acrolein antagonism. Med. Hypotheses 28: 213-214.

Balerio GN, Aso E, Berrendero F, Murtra P, Maldonado R, 2004. Delta9-tetrahydrocannabinol decreases somatic and motivational manifestations of nicotine withdrawal in mice. Eur. J. Neurosci. 20: 2737-2748.

Balerio GN, Aso E, Maldonado R, 2005. Involvement of the opioid system in the effects induced by nicotine on anxiety-like behaviour in mice. Psychopharmacology (Berl) 181: 260-269.

Balfour DJ, 2004. The neurobiology of tobacco dependence: a preclinical perspective on the role of the dopamine projections to the nucleus accumbens [corrected]. Nicotine. Tob. Res 6: 899-912.

Baños JE, Farre M, 2002. Principios de farmacología clínica. Masson, Barcelona.

Bassareo V, Tanda G, Di CG, 1995. Increase of extracellular dopamine in the medial prefrontal cortex during spontaneous and naloxone-precipitated opiate abstinence. Psychopharmacology (Berl) 122: 202-205.

Becker A, Grecksch G, Brodemann R, Kraus J, Peters B, Schroeder H, Thiemann W, Loh HH, Hollt V, 2000. Morphine self-administration in mu-opioid receptor-deficient mice. Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol. 361: 584-589.

Becker A, Grecksch G, Kraus J, Loh HH, Schroeder H, Hollt V, 2002. Rewarding effects of ethanol and cocaine in mu opioid receptor-deficient mice. Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol. 365: 296-302.

Becker JB, Hu M, 2008. Sex differences in drug abuse. Front Neuroendocrinol. 29: 36-47.

Benowitz NL, 2008. Clinical pharmacology of nicotine: implications for understanding, preventing, and treating tobacco addiction. Clinical Pharmacoly and Therapeutics 83: 531-541.

Benowitz NL, 1996. Pharmacology of nicotine: addiction and therapeutics. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 36: 597-613.

Benwell ME, Balfour DJ, 1979. Effects of nicotine administration and its withdrawal on plasma corticosterone and brain 5-hydroxyindoles. Psychopharmacology (Berl) 63: 7-11.

Benwell ME, Balfour DJ, Anderson JM, 1990. Smoking-associated changes in the serotonergic systems of discrete regions of human brain. Psychopharmacology (Berl) 102: 68-72.

Bergevin A, Girardot D, Bourque MJ, Trudeau LE, 2002. Presynaptic mu-opioid receptors regulate a late step of the secretory process in rat ventral tegmental area GABAergic neurons. Neuropharmacology 42: 1065-1078.

Berrendero F, Kieffer BL, Maldonado R, 2002. Attenuation of nicotine-induced antinociception, rewarding effects, and dependence in mu-opioid receptor knock-out mice. J. Neurosci. 22: 10935-10940.

Berrendero F, Mendizabal V, Robledo P, Galeote L, Bilkei-Gorzo A, Zimmer A, Maldonado R, 2005. Nicotine-induced antinociception, rewarding effects, and physical dependence are decreased in mice lacking the preproenkephalin gene. J. Neurosci. 25: 1103-1112.

Biala G, Budzynska B, 2008. Calcium-dependent mechanisms of the reinstatement of nicotine-conditioned place preference by drug priming in rats. Pharmacol. Biochem. Behav. 89: 116-125.

Biala G, Budzynska B, Kruk M, 2005. Naloxone precipitates nicotine abstinence syndrome and attenuates nicotine-induced antinociception in mice. Pharmacol. Rep. 57: 755-760.

Biala G, Weglinska B, 2006. On the mechanism of cross-tolerance between morphine- and nicotine-induced antinociception: involvement of calcium channels. Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry 30: 15-21.

Bilkei-Gorzo A, Racz I, Michel K, Darvas M, Maldonado R, Zimmer A, 2008. A common genetic predisposition to stress sensitivity and stress-induced nicotine craving. Biol. Psychiatry 63: 164-171.

Bissiere S, Humeau Y, Luthi A, 2003. Dopamine gates LTP induction in lateral amygdala by suppressing feedforward inhibition. Nat. Neurosci. 6: 587-592.

Bitner RS, Nikkel AL, Curzon P, Arneric SP, Bannon AW, Decker MW, 1998. Role of the nucleus raphe magnus in antinociception produced by ABT-594: immediate early gene responses possibly linked to neuronal nicotinic acetylcholine receptors on serotonergic neurons. J Neurosci. 18: 5426-5432.

Blednov YA, Walker D, Martinez M, Harris RA, 2006. Reduced alcohol consumption in mice lacking preprodynorphin. Alcohol 40: 73-86.

Bodnar RJ, Hadjimarkou MM, 2003. Endogenous opiates and behavior: 2002. Peptides 24: 1241-1302.

Booker TK, Butt CM, Wehner JM, Heinemann SF, Collins AC, 2007. Decreased anxiety-like behavior in beta3 nicotinic receptor subunit knockout mice. Pharmacol. Biochem. Behav. 87: 146-157.

Breslau N, Fenn N, Peterson EL, 1993. Early smoking initiation and nicotine dependence in a cohort of young adults. Drug Alcohol Depend. 33: 129-137.

Brody AL, Mandelkern MA, London ED, Childress AR, Lee GS, Bota RG, Ho ML, Saxena S, Baxter LR, Jr., Madsen D, Jarvik ME, 2002. Brain metabolic changes during cigarette craving. Arch. Gen. Psychiatry 59: 1162-1172.

Brunzell DH, Chang JR, Schneider B, Olausson P, Taylor JR, Picciotto MR, 2006. beta2-Subunit-containing nicotinic acetylcholine receptors are involved in nicotine-induced increases in conditioned reinforcement but not progressive ratio responding for food in C57BL/6 mice. Psychopharmacology (Berl) 184: 328-338.

Buccafusco JJ, Jackson WJ, Jonnala RR, Terry AV, Jr., 1999. Differential improvement in memory-related task performance with nicotine by aged male and female rhesus monkeys. Behav. Pharmacol. 10: 681-690.

Buczek Y, Le AD, Wang A, Stewart J, Shaham Y, 1999. Stress reinstates nicotine seeking but not sucrose solution seeking in rats. Psychopharmacology (Berl). 144: 183-188.

Burattini C, Burbassi S, Aicardi G, Cervo L, 2008. Effects of naltrexone on cocaine- and sucrose-seeking behaviour in response to associated stimuli in rats. Int. J. Neuropsychopharmacol. 11: 103-109.

Butschky MF, Bailey D, Henningfield JE, Pickworth WB, 1995. Smoking without nicotine delivery decreases withdrawal in 12-hour abstinent smokers. Pharmacol. Biochem. Behav. 50: 91-96.

Caggiula AR, Donny EC, Chaudhri N, Perkins KA, Evans-Martin FF, Sved AF, 2002. Importance of nonpharmacological factors in nicotine self-administration. Physiol Behav. 77: 683-687.

Caggiula AR, Donny EC, White AR, Chaudhri N, Booth S, Gharib MA, Hoffman A, Perkins KA, Sved AF, 2001a. Cue dependency of nicotine self-administration and smoking. Pharmacology Biochemistry and Behavior 70: 515-530.

Caggiula AR, Donny EC, White AR, Chaudhri N, Booth S, Gharib MA, Hoffman A, Perkins KA, Sved AF, 2001b. Cue dependency of nicotine self-administration and smoking. Pharmacol. Biochem. Behav. 70: 515-530.

Cahill K, Ussher M, 2007. Cannabinoid type 1 receptor antagonists (rimonabant) for smoking cessation. Cochrane. Database. Syst. Rev.: CD005353.

Cami J, Farre M, 2003. Drug addiction. N. Engl. J. Med. 349: 975-986.

Campbell VC, Taylor RE, Tizabi Y, 2006. Antinociceptive effects of alcohol and nicotine: involvement of the opioid system. Brain Res 1097: 71-77.

Campbell VC, Taylor RE, Tizabi Y, 2007. Effects of selective opioid receptor antagonists on alcohol-induced and nicotine-induced antinociception. Alcohol Clin. Exp. Res 31: 1435-1440.

Carboni E, Bortone L, Giua C, Di CG, 2000. Dissociation of physical abstinence signs from changes in extracellular dopamine in the nucleus accumbens and in the prefrontal cortex of nicotine dependent rats. Drug Alcohol Depend. 58: 93-102.

Carboni E, Vacca C, 2003. Conditioned place preference. A simple method for investigating reinforcing properties in laboratory animals. Methods Mol. Med. 79: 481-498.

Carter BL, Tiffany ST, 1999. Meta-analysis of cue-reactivity in addiction research. Addiction 94: 327-340.

Castañé A, Maldonado R, Valverde O, 2004. Role of different brain structures in the behavioural expression of WIN 55,212-2 withdrawal in mice. Br. J. Pharmacol. 142: 1309-1317.

Castañé A, Valjent E, Ledent C, Parmentier M, Maldonado R, Valverde O, 2002. Lack of CB1 cannabinoid receptors modifies nicotine behavioural responses, but not nicotine abstinence. Neuropharmacology 43: 857-867.

Changeux JP, Edelstein SJ, 1998. Allosteric receptors after 30 years. Neuron 21: 959-980.

Chefer VI, Czyzyk T, Bolan EA, Moron J, Pintar JE, Shippenberg TS, 2005. Endogenous kappa-opioid receptor systems regulate mesoaccumbal dopamine dynamics and vulnerability to cocaine. J. Neurosci. 25: 5029-5037.

Chen X, Williamson VS, An SS, Hettema JM, Aggen SH, Neale MC, Kendler KS, 2008. Cannabinoid receptor 1 gene association with nicotine dependence. Arch. Gen. Psychiatry 65: 816-824.

Chiamulera C, 2005. Cue reactivity in nicotine and tobacco dependence: a "multiple-action" model of nicotine as a primary reinforcement and as an enhancer

of the effects of smoking-associated stimuli. Brain Research Brain Research Reviews 48: 74-97.

Chiamulera C, Borgo C, Falchetto S, Valerio E, Tessari M, 1996. Nicotine reinstatement of nicotine self-administration after long-term extinction. Psychopharmacology (Berl) 127: 102-107.

Ciccocioppo R, Martin-Fardon R, Weiss F, 2002. Effect of selective blockade of mu(1) or delta opioid receptors on reinstatement of alcohol-seeking behavior by drug-associated stimuli in rats. Neuropsychopharmacology 27: 391-399.

Cichewicz DL, 2004. Synergistic interactions between cannabinoid and opioid analgesics. Life Sci. 74: 1317-1324.

Civelli O, 2008. The orphanin FQ/nociceptin (OFQ/N) system. Results Probl. Cell Differ. 46: 1-25.

Clarke PB, Fu DS, Jakubovic A, Fibiger HC, 1988. Evidence that mesolimbic dopaminergic activation underlies the locomotor stimulant action of nicotine in rats. J. Pharmacol. Exp. Ther. 246: 701-708.

Cohen C, Perrault G, Griebel G, Soubrie P, 2005. Nicotine-associated cues maintain nicotine-seeking behavior in rats several weeks after nicotine withdrawal: reversal by the cannabinoid (CB1) receptor antagonist, rimonabant (SR141716). Neuropsychopharmacology. 30: 145-155.

Cohen C, Perrault G, Voltz C, Steinberg R, Soubrie P, 2002. SR141716, a central cannabinoid (CB(1)) receptor antagonist, blocks the motivational and dopamine-releasing effects of nicotine in rats. Behav. Pharmacol. 13: 451-463.

Collins AC, Romm E, Wehner JM, 1988. Nicotine tolerance: an analysis of the time course of its development and loss in the rat. Psychopharmacology (Berl) 96: 7-14.

Contarino A, Picetti R, Matthes HW, Koob GF, Kieffer BL, Gold LH, 2002. Lack of reward and locomotor stimulation induced by heroin in mu-opioid receptor-deficient mice. Eur. J. Pharmacol. 446: 103-109.

Conte-Devolx B, Oliver C, Giraud P, Gillioz P, Castanas E, Lissitzky JC, Boudouresque F, Millet Y, 1981. Effect of nicotine on in vivo secretion of melanocorticotropic hormones in the rat. Life Sci. 28: 1067-1073.

Cooper JO, Heron TE, Heward WL, 1987. Applied behavior analysis. Macmillan, New York.

Cordero-Erausquin M, Marubio LM, Klink R, Changeux JP, 2000. Nicotinic receptor function: new perspectives from knockout mice. Trends Pharmacol Sci. 21: 211-217.

Cordero-Erausquin M, Pons S, Faure P, Changeux JP, 2004. Nicotine differentially activates inhibitory and excitatory neurons in the dorsal spinal cord. Pain 109: 308-318.

Corrigall WA, Coen KM, 1989. Nicotine maintains robust self-administration in rats on a limited-access schedule. Psychopharmacology (Berl) 99: 473-478.

Corrigall WA, Coen KM, 1991. Opiate antagonists reduce cocaine but not nicotine self-administration. Psychopharmacology (Berl) 104: 167-170.

Corrigall WA, Coen KM, Adamson KL, Chow BL, Zhang J, 2000. Response of nicotine self-administration in the rat to manipulations of mu-opioid and gamma-aminobutyric acid receptors in the ventral tegmental area. Psychopharmacology (Berl) 149: 107-114.

Corrigall WA, Coen KM, Zhang J, Adamson KL, 2001. GABA mechanisms in the pedunculopontine tegmental nucleus influence particular aspects of nicotine self-administration selectively in the rat. Psychopharmacology (Berl) 158: 190-197.

Corrigall WA, Coen KM, Zhang J, Adamson L, 2002. Pharmacological manipulations of the pedunculopontine tegmental nucleus in the rat reduce self-administration of both nicotine and cocaine. Psychopharmacology (Berl) 160: 198-205.

Corrigall WA, Franklin KB, Coen KM, Clarke PB, 1992. The mesolimbic dopaminergic system is implicated in the reinforcing effects of nicotine. Psychopharmacology (Berl) 107: 285-289.

Cui C, Booker TK, Allen RS, Grady SR, Whiteaker P, Marks MJ, Salminen O, Tritto T, Butt CM, Allen WR, Stitzel JA, McIntosh JM, Boulter J, Collins AC, Heinemann SF, 2003. The beta3 nicotinic receptor subunit: a component of alpha-conotoxin MII-binding nicotinic acetylcholine receptors that modulate dopamine release and related behaviors. J. Neurosci. 23: 11045-11053.

Dahl JP, Weller AE, Kampman KM, Oslin DW, Lohoff FW, Ferraro TN, O'Brien CP, Berrettini WH, 2005. Confirmation of the association between a polymorphism in the promoter region of the prodynorphin gene and cocaine dependence. Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet. 139B: 106-108.

Damaj MI, Martin BR, 1996. Tolerance to the antinociceptive effect of epibatidine after acute and chronic administration in mice. Eur. J. Pharmacol. 300: 51-57.

Dani JA, Heinemann S, 1996. Molecular and cellular aspects of nicotine abuse. Neuron 16: 905-908.

David V, Matifas A, Gavello-Baudy S, Decorte L, Kieffer BL, Cazala P, 2008. Brain Regional Fos Expression Elicited by the Activation of mu- but not delta-Opioid Receptors of the Ventral Tegmental Area: Evidence for an Implication of the Ventral Thalamus in Opiate Reward. Neuropsychopharmacology 33: 1746-1759.

Davis WM, Smith SG, 1976. Role of conditioned reinforcers in the initiation, maintenance and extinction of drug-seeking behavior. Pavlov. J. Biol. Sci. 11: 222-236.

De Vries TJ, Babovic-Vuksanovic D, Elmer G, Shippenberg TS, 1995. Lack of involvement of delta-opioid receptors in mediating the rewarding effects of cocaine. Psychopharmacology (Berl) 120: 442-448.

De Vries TJ, Schoffelmeer AN, Binnekade R, Mulder AH, Vanderschuren LJ, 1998. Drug-induced reinstatement of heroin- and cocaine-seeking behaviour following long-term extinction is associated with expression of behavioural sensitization. Eur. J. Neurosci. 10: 3565-3571.

De Vries TJ, Schoffelmeer AN, Binnekade R, Vanderschuren LJ, 1999. Dopaminergic mechanisms mediating the incentive to seek cocaine and heroin following long-term withdrawal of IV drug self-administration. Psychopharmacology (Berl) 143: 254-260.

Decker MW, Meyer MD, 1999. Therapeutic potential of neuronal nicotinic acetylcholine receptor agonists as novel analgesics. Biochem. Pharmacol. 58: 917-923.

Decker MW, Rueter LE, Bitner RS, 2004. Nicotinic acetylcholine receptor agonists: a potential new class of analgesics. Curr. Top. Med. Chem. 4: 369-384.

Decker MW, Sullivan JP, Arneric SP, Williams M, 2000 Neuronal Nicotinic Acetylcholine Receptors: Novel Targets for CNS Therapeutics. American college of neurophysopharmacology: Psychopharmacology - 4th Generation of Progress..

del Arbol JL, Munoz JR, Ojeda L, Cascales AL, Irles JR, Miranda MT, Ruiz Requena ME, Aguirre JC, 2000. Plasma concentrations of beta-endorphin in smokers who consume different numbers of cigarettes per day. Pharmacol. Biochem. Behav. 67: 25-28.

DeNoble VJ, Mele PC, 2006. Intravenous nicotine self-administration in rats: effects of mecamylamine, hexamethonium and naloxone. Psychopharmacology (Berl) 184: 266-272.

Deroche-Gamonet V, Belin D, Piazza PV, 2004a. Evidence for addiction-like behavior in the rat. Science. 305: 1014-1017.

Deroche-Gamonet V, Belin D, Piazza PV, 2004b. Evidence for addiction-like behavior in the rat. Science 305: 1014-1017.

DGPNSD, 2006. Dirección General del Plan Nacional sobre Drogas. Encuesta Estatal sobre Uso en Enseñanzas Secundarias (ESTUDES). 1994-2006.

DGPNSD, 2007 Guía sobre drogas.

Dhatt RK, Gudehithlu KP, Wemlinger TA, Tejwani GA, Neff NH, Hadjiconstantinou M, 1995. Preproenkephalin mRNA and methionine-enkephalin content are increased in mouse striatum after treatment with nicotine. J. Neurochem. 64: 1878-1883.

Di Chiara G, 2000. Role of dopamine in the behavioural actions of nicotine related to addiction. Eur. J. Pharmacol. 393: 295-314.

Di Chiara G, Imperato A, 1988. Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely moving rats. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 85: 5274-5278.

Di Chiara G, Tanda G, Bassareo V, Pontieri F, Acquas E, Fenu S, Cadoni C, Carboni E, 1999. Drug addiction as a disorder of associative learning. Role of nucleus accumbens shell/extended amygdala dopamine. Ann. N. Y. Acad. Sci. 877: 461-485.

DiFranza JR, Wellman RJ, 2007. Sensitization to nicotine: how the animal literature might inform future human research. Nicotine. Tob. Res 9: 9-20.

Dougherty GG, Jr., Ellinwood EH, Jr., 1981. Chronic D-amphetamine in nucleus accumbens: lack of tolerance or reverse tolerance of locomotor activity. Life Sci. 28: 2295-2298.

Dravolina OA, Zakharova ES, Shekunova EV, Zvartau EE, Danysz W, Bespalov AY, 2007. mGlu1 receptor blockade attenuates cue- and nicotine-induced reinstatement of extinguished nicotine self-administration behavior in rats. Neuropharmacology. 52: 263-269.

Elgoyhen AB, Vetter DE, Katz E, Rothlin CV, Heinemann SF, Boulter J, 2001. alpha10: a determinant of nicotinic cholinergic receptor function in mammalian vestibular and cochlear mechanosensory hair cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 98: 3501-3506.

Epstein AM, King AC, 2004. Naltrexone attenuates acute cigarette smoking behavior. Pharmacol. Biochem. Behav. 77: 29-37.

Epstein DH, Preston KL, Stewart J, Shaham Y, 2006. Toward a model of drug relapse: an assessment of the validity of the reinstatement procedure. Psychopharmacology (Berl) 189: 1-16.

Ershler J, Leventhal H, Fleming R, Glynn K, 1989. The quitting experience for smokers in sixth through twelfth grades. Addict. Behav. 14: 365-378.

Escobedo LG, Marcus SE, Holtzman D, Giovino GA, 1993. Sports participation, age at smoking initiation, and the risk of smoking among US high school students. JAMA 269: 1391-1395.

Everett SA, Warren CW, Sharp D, Kann L, Husten CG, Crossett LS, 1999. Initiation of cigarette smoking and subsequent smoking behavior among U.S. high school students. Prev. Med. 29: 327-333.

Everitt BJ, Wolf ME, 2002. Psychomotor stimulant addiction: a neural systems perspective. J. Neurosci. 22: 3312-3320.

Fagerstrom K, Balfour DJ, 2006. Neuropharmacology and potential efficacy of new treatments for tobacco dependence. Expert. Opin. Investig. Drugs 15: 107-116.

Fattore L, Cossu G, Martellotta MC, Fratta W, 2002. Baclofen antagonizes intravenous self-administration of nicotine in mice and rats. Alcohol Alcohol 37: 495-498.

Ferrari R, Le NN, Picciotto MR, Changeux JP, Zoli M, 2002. Acute and long-term changes in the mesolimbic dopamine pathway after systemic or local single nicotine injections. Eur. J. Neurosci. 15: 1810-1818.

Filliol D, Ghozland S, Chluba J, Martin M, Matthes HW, Simonin F, Befort K, Gaveriaux-Ruff C, Dierich A, LeMeur M, Valverde O, Maldonado R, Kieffer BL, 2000. Mice deficient for delta- and mu-opioid receptors exhibit opposing alterations of emotional responses. Nat. Genet. 25: 195-200.

Flores CM, 2000. The promise and pitfalls of a nicotinic cholinergic approach to pain management. Pain 88: 1-6.

Flórez J, 2007. El tratamiento farmacológico del dolor. Ars Medica.

Freedman R, Coon H, Myles-Worsley M, Orr-Urtreger A, Olincy A, Davis A, Polymeropoulos M, Holik J, Hopkins J, Hoff M, Rosenthal J, Waldo MC, Reimherr F, Wender P, Yaw J, Young DA, Breese CR, Adams C, Patterson D, Adler LE, Kruglyak L, Leonard S, Byerley W, 1997. Linkage of a neurophysiological deficit in schizophrenia to a chromosome 15 locus. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 94: 587-592.

Freedman R, Hall M, Adler LE, Leonard S, 1995. Evidence in postmortem brain tissue for decreased numbers of hippocampal nicotinic receptors in schizophrenia. Biol. Psychiatry 38: 22-33.

Friedman LS, Lichtenstein E, Biglan A, 1985. Smoking onset among teens: an empirical analysis of initial situations. Addict. Behav. 10: 1-13.

Fuchs RA, See RE, Middaugh LD, 2003. Conditioned stimulus-induced reinstatement of extinguished cocaine seeking in C57BL/6 mice: a mouse model of drug relapse. Brain Research 973: 99-106.

Galeote L, Kieffer BL, Maldonado R, Berrendero F, 2006. Mu-opioid receptors are involved in the tolerance to nicotine antinociception. J. Neurochem. 97: 416-423.

Galeote L, Maldonado R, Berrendero F, 2008. Involvement of kappa/dynorphin system in the development of tolerance to nicotine-induced antinociception. J. Neurochem. 105: 1358-1368.

Gardell LR, Burgess SE, Dogrul A, Ossipov MH, Malan TP, Lai J, Porreca F, 2002. Pronociceptive effects of spinal dynorphin promote cannabinoid-induced pain and antinociceptive tolerance. Pain 98: 79-88.

Garzon M, Pickel VM, 2002b. Ultrastructural localization of enkephalin and mu-opioid receptors in the rat ventral tegmental area. Neuroscience 114: 461-474.

Garzon M, Pickel VM, 2002a. Ultrastructural localization of enkephalin and mu-opioid receptors in the rat ventral tegmental area. Neuroscience 114: 461-474.

Genzen JR, Van CW, McGehee DS, 2001. Dorsal root ganglion neurons express multiple nicotinic acetylcholine receptor subtypes. J. Neurophysiol. 86: 1773-1782.

Gerber GJ, Stretch R, 1975. Drug-induced reinstatement of extinguished self-administration behavior in monkeys. Pharmacol. Biochem. Behav. 3: 1055-1061.

Gerdeman GL, Partridge JG, Lupica CR, Lovinger DM, 2003. It could be habit forming: drugs of abuse and striatal synaptic plasticity. Trends Neurosci. 26: 184-192.

Gerrits MA, Lesscher HB, van Ree JM, 2003. Drug dependence and the endogenous opioid system. Eur. Neuropsychopharmacol. 13: 424-434.

Ghozland S, Matthes HW, Simonin F, Filliol D, Kieffer BL, Maldonado R, 2002. Motivational effects of cannabinoids are mediated by mu-opioid and kappa-opioid receptors. J. Neurosci. 22: 1146-1154.

Gibaldi M, Perrier D, 1975. The trapezoid rule. In: Pharmacokinetics New York:Marcel Dekker, pp. 293-296.

Gilbert DG, Meliska CJ, Williams CL, Jensen RA, 1992. Subjective correlates of cigarette-smoking-induced elevations of peripheral beta-endorphin and cortisol. Psychopharmacology (Berl) 106: 275-281.

Giniatullin R, Nistri A, Yakel JL, 2005. Desensitization of nicotinic ACh receptors: shaping cholinergic signaling. Trends Neurosci. 28: 371-378.

Girdler SS, Maixner W, Naftel HA, Stewart PW, Moretz RL, Light KC, 2005. Cigarette smoking, stress-induced analgesia and pain perception in men and women. Pain 114: 372-385.

Glanzt MD, Pickens RW, 1992 Vulnerability to Drug Abuse. Psychological Association Press, Washington, D. C.

Goldberg SR, Spealman RD, Goldberg DM, 1981. Persistent behavior at high rates maintained by intravenous self-administration of nicotine. Science. 214: 573-575.

Goldstein RZ, Volkow ND, 2002. Drug addiction and its underlying neurobiological basis: neuroimaging evidence for the involvement of the frontal cortex. Am. J. Psychiatry 159: 1642-1652.

Gomes I, Jordan BA, Gupta A, Trapaidze N, Nagy V, Devi LA, 2000. Heterodimerization of mu and delta opioid receptors: A role in opiate synergy. J. Neurosci. 20: RC110.

Gorelick DA, Rose J, Jarvik ME, 1988. Effect of naloxone on cigarette smoking. J. Subst. Abuse 1: 153-159.

Gotti C, Clementi F, 2004. Neuronal nicotinic receptors: from structure to pathology. Prog. Neurobiol. 74: 363-396.

Gotti C, Zoli M, Clementi F, 2006. Brain nicotinic acetylcholine receptors: native subtypes and their relevance. Trends Pharmacol Sci. 27: 482-491.

Grabus SD, Martin BR, Imad DM, 2005. Nicotine physical dependence in the mouse: involvement of the alpha7 nicotinic receptor subtype. Eur. J. Pharmacol. 515: 90-93.

Grottick AJ, Trube G, Corrigall WA, Huwyler J, Malherbe P, Wyler R, Higgins GA, 2000. Evidence that nicotinic alpha(7) receptors are not involved in the hyperlocomotor and rewarding effects of nicotine. J. Pharmacol. Exp. Ther. 294: 1112-1119.

Gutstein HB, Akil H, 2001. Opioid Analgesic. En: Hardman, J. G, Limbird, L. E, Gilman, A.G, editors. Goodman and Gilman´s, New York: McGraw-Hill, pp. 569-619.

Guyton A. C, 1997 Sensaciones somáticas. Editorial Medica Panamericana, pp. 149-163.

Haghparast A, Khani A, Naderi N, Alizadeh AM, Motamedi F, 2008. Repeated administration of nicotine attenuates the development of morphine tolerance and dependence in mice. Pharmacol. Biochem. Behav. 88: 385-392.

Hahn B, Shoaib M, Stolerman IP, 2003. Involvement of the prefrontal cortex but not the dorsal hippocampus in the attention-enhancing effects of nicotine in rats. Psychopharmacology (Berl) 168: 271-279.

Hahn B, Stolerman IP, Shoaib M, 2000. Kappa-opioid receptor modulation of nicotine-induced behaviour. Neuropharmacology 39: 2848-2855.

Hedner T, Cassuto J, 1987 Opioids and opioid receptors in peripheral tissues. Scand.J.Gastroenterol, pp. 27-46.

Heidbreder C, Shoaib M, Shippenberg TS, 1996. Differential role of delta-opioid receptors in the development and expression of behavioral sensitization to cocaine. Eur. J. Pharmacol. 298: 207-216.

Heidbreder CA, Babovic-Vuksanovic D, Shoaib M, Shippenberg TS, 1995. Development of behavioral sensitization to cocaine: influence of kappa opioid receptor agonists. J. Pharmacol. Exp. Ther. 275: 150-163.

Hexum TD, Russett LR, 1987. Plasma enkephalin-like peptide response to chronic nicotine infusion in guinea pig. Brain Res 406: 370-372.

Highfield DA, Mead AN, Grimm JW, Rocha BA, Shaham Y, 2002. Reinstatement of cocaine seeking in 129X1/SvJ mice: effects of cocaine priming, cocaine cues and food deprivation. Psychopharmacology (Berl). 161: 417-424.

Hildebrand BE, Nomikos GG, Bondjers C, Nisell M, Svensson TH, 1997. Behavioral manifestations of the nicotine abstinence syndrome in the rat: peripheral versus central mechanisms. Psychopharmacology (Berl) 129: 348-356.

Hildebrand BE, Nomikos GG, Hertel P, Schilstrom B, Svensson TH, 1998. Reduced dopamine output in the nucleus accumbens but not in the medial prefrontal cortex

in rats displaying a mecamylamine-precipitated nicotine withdrawal syndrome. Brain Res 779: 214-225.

Hildebrand BE, Panagis G, Svensson TH, Nomikos GG, 1999. Behavioral and biochemical manifestations of mecamylamine-precipitated nicotine withdrawal in the rat: role of nicotinic receptors in the ventral tegmental area. Neuropsychopharmacology 21: 560-574.

Hoffman AF, Lupica CR, 2001. Direct actions of cannabinoids on synaptic transmission in the nucleus accumbens: a comparison with opioids. J. Neurophysiol. 85: 72-83.

Houdi AA, Dasgupta R, Kindy MS, 1998. Effect of nicotine use and withdrawal on brain preproenkephalin A mRNA. Brain Res 799: 257-263.

Houdi AA, Pierzchala K, Marson L, Palkovits M, Van Loon GR, 1991. Nicotine-induced alteration in Tyr-Gly-Gly and Met-enkephalin in discrete brain nuclei reflects altered enkephalin neuron activity. Peptides 12: 161-166.

Hughes JR, 1992. Tobacco withdrawal in self-quitters. J. Consult Clin. Psychol. 60: 689-697.

Hughes JR, Gulliver SB, Fenwick JW, Valliere WA, Cruser K, Pepper S, Shea P, Solomon LJ, Flynn BS, 1992. Smoking cessation among self-quitters. Health Psychol. 11: 331-334.

Hughes JR, Gust SW, Skoog K, Keenan RM, Fenwick JW, 1991. Symptoms of tobacco withdrawal. A replication and extension. Arch. Gen. Psychiatry 48: 52-59.

Hughes JR, Keely J, Naud S, 2004. Shape of the relapse curve and long-term abstinence among untreated smokers. Addiction 99: 29-38.

Huston-Lyons D, Kornetsky C, 1992. Effects of nicotine on the threshold for rewarding brain stimulation in rats. Pharmacol. Biochem. Behav. 41: 755-759.

Huston-Lyons D, Sarkar M, Kornetsky C, 1993. Nicotine and brain-stimulation reward: interactions with morphine, amphetamine and pimozide. Pharmacol. Biochem. Behav. 46: 453-457.

Hutcheson DM, Tzavara ET, Smadja C, Valjent E, Roques BP, Hanoune J, Maldonado R, 1998. Behavioural and biochemical evidence for signs of abstinence in mice chronically treated with delta-9-tetrahydrocannabinol. Br. J. Pharmacol. 125: 1567-1577.

Hyman SE, Malenka RC, 2001. Addiction and the brain: the neurobiology of compulsion and its persistence. Nat. Rev. Neurosci. 2: 695-703.

Hyman SE, Malenka RC, Nestler EJ, 2006. Neural mechanisms of addiction: the role of reward-related learning and memory. Annu. Rev. Neurosci. 29: 565-598.

Ise Y, Narita M, Nagase H, Suzuki T, 2000. Modulation of opioidergic system on mecamylamine-precipitated nicotine-withdrawal aversion in rats. Psychopharmacology (Berl) 151: 49-54.

Ise Y, Narita M, Nagase H, Suzuki T, 2002. Modulation of kappa-opioidergic systems on mecamylamine-precipitated nicotine-withdrawal aversion in rats. Neurosci. Lett. 323: 164-166.

Isola R, Zhang H, Duchemin AM, Tejwani GA, Neff NH, Hadjiconstantinou M, 2002. Met-enkephalin and preproenkephalin mRNA changes in the striatum of the nicotine abstinence mouse. Neurosci. Lett. 325: 67-71.

Isola R, Zhang H, Tejwani GA, Neff NH, Hadjiconstantinou M, 2008a. Acute nicotine changes dynorphin and prodynorphin mRNA in the striatum. Psychopharmacology (Berl).

Isola R, Zhang H, Tejwani GA, Neff NH, Hadjiconstantinou M, 2008b. Dynorphin and prodynorphin mRNA changes in the striatum during nicotine withdrawal. Synapse 62: 448-455.

Itoh H, Andoh T, Watanabe I, Sasaki T, Kamiya Y, Okumura F, 2000. Dynorphins directly inhibit neuronal nicotinic acetylcholine receptors in PC12 cells. Eur. J. Neurosci. 12: 1253-1262.

Itzhak Y, Martin JL, 1999. Effects of cocaine, nicotine, dizocipline and alcohol on mice locomotor activity: cocaine-alcohol cross-sensitization involves upregulation of striatal dopamine transporter binding sites. Brain Res 818: 204-211.

Iwamoto ET, Marion L, 1993. Adrenergic, serotonergic and cholinergic components of nicotinic antinociception in rats. J. Pharmacol. Exp. Ther. 265: 777-789.

Jackson HC, Ripley TL, Nutt DJ, 1989. Exploring delta-receptor function using the selective opioid antagonist naltrindole. Neuropharmacology 28: 1427-1430.

Jamner LD, Girdler SS, Shapiro D, Jarvik ME, 1998. Pain inhibition, nicotine, and gender. Exp. Clin. Psychopharmacol. 6: 96-106.

Jiang ZG, North RA, 1992. Pre- and postsynaptic inhibition by opioids in rat striatum. J. Neurosci. 12: 356-361.

Johnson SW, North RA, 1992. Opioids excite dopamine neurons by hyperpolarization of local interneurons. J. Neurosci. 12: 483-488.

Jordan BA, Devi LA, 1999. G-protein-coupled receptor heterodimerization modulates receptor function. Nature 399: 697-700.

Kalivas PW, Churchill L, Klitenick MA, 1993a. GABA and enkephalin projection from the nucleus accumbens and ventral pallidum to the ventral tegmental area. Neuroscience 57: 1047-1060.

Kalivas PW, Duffy P, 1993. Time course of extracellular dopamine and behavioral sensitization to cocaine. I. Dopamine axon terminals. J. Neurosci. 13: 266-275.

Kalivas PW, O'Brien C, 2008. Drug addiction as a pathology of staged neuroplasticity. Neuropsychopharmacology 33: 166-180.

Kalivas PW, Sorg BA, Hooks MS, 1993b. The pharmacology and neural circuitry of sensitization to psychostimulants. Behav. Pharmacol. 4: 315-334.

Kalivas PW, Volkow N, Seamans J, 2005. Unmanageable motivation in addiction: a pathology in prefrontal-accumbens glutamate transmission. Neuron 45: 647-650.

Kalivas PW, Volkow ND, 2005. The neural basis of addiction: a pathology of motivation and choice. Am. J. Psychiatry 162: 1403-1413.

Karras A, Kane JM, 1980. Naloxone reduces cigarette smoking. Life Sci. 27: 1541-1545.

Kenny PJ, Markou A, 2001. Neurobiology of the nicotine withdrawal syndrome. Pharmacol. Biochem. Behav. 70: 531-549.

Khan IM, Stanislaus S, Zhang L, Taylor P, Yaksh TL, 2001. A-85380 and epibatidine each interact with disparate spinal nicotinic receptor subtypes to achieve analgesia and nociception. J. Pharmacol. Exp. Ther. 297: 230-239.

Khan IM, Yaksh TL, Taylor P, 1997. Epibatidine binding sites and activity in the spinal cord. Brain Res. 753: 269-282.

Khantzian EJ, 1985. The self-medication hypothesis of addictive disorders: focus on heroin and cocaine dependence. Am. J. Psychiatry 142: 1259-1264.

Khotib J, Narita M, Suzuki M, Yajima Y, Suzuki T, 2004. Functional interaction among opioid receptor types: up-regulation of mu- and delta-opioid receptor functions after repeated stimulation of kappa-opioid receptors. Neuropharmacology 46: 531-540.

Kieffer BL, 1999. Opioids: first lessons from knockout mice. Trends Pharmacol. Sci. 20: 19-26.

Kiguchi N, Maeda T, Tsuruga M, Yamamoto A, Yamamoto C, Ozaki M, Kishioka S, 2008. Involvement of spinal Met-enkephalin in nicotine-induced antinociception in mice. Brain Res 1189: 70-77.

King AC, Meyer PJ, 2000. Naltrexone alteration of acute smoking response in nicotine-dependent subjects. Pharmacol. Biochem. Behav. 66: 563-572.

Kitchen I, Slowe SJ, Matthes HW, Kieffer B, 1997. Quantitative autoradiographic mapping of mu-, delta- and kappa-opioid receptors in knockout mice lacking the mu-opioid receptor gene. Brain Res. 778: 73-88.

Koch T, Hollt V, 2008. Role of receptor internalization in opioid tolerance and dependence. Pharmacol. Ther. 117: 199-206.

Kolta MG, Shreve P, De S, V, Uretsky NJ, 1985. Time course of the development of the enhanced behavioral and biochemical responses to amphetamine after pretreatment with amphetamine. Neuropharmacology 24: 823-829.

Koob GF, Le Moal M, 2006. Neurobiologic of addiction. Academic Press Hardbound, San Diego, CA.

Koob GF, Le Moal M, 1997. Drug abuse: hedonic homeostatic dysregulation. Science 278: 52-58.

Koob GF, Le Moal M, 2001. Drug addiction, dysregulation of reward, and allostasis. Neuropsychopharmacology 24: 97-129.

Kornetsky C, Bain G, 1992. Brain-stimulation reward: a model for the study of the rewarding effects of abused drugs. NIDA Res. Monogr 124: 73-93.

Krishnan-Sarin S, Rosen MI, O'Malley SS, 1999. Naloxone challenge in smokers. Preliminary evidence of an opioid component in nicotine dependence. Arch. Gen. Psychiatry 56: 663-668.

Kumari V, Gray JA, ffytche DH, Mitterschiffthaler MT, Das M, Zachariah E, Vythelingum GN, Williams SC, Simmons A, Sharma T, 2003. Cognitive effects of nicotine in humans: an fMRI study. Neuroimage. 19: 1002-1013.

Kuzmin AV, Gerrits MA, van Ree JM, Zvartau EE, 1997a. Naloxone inhibits the reinforcing and motivational aspects of cocaine addiction in mice. Life Sci. 60: L-64.

Kuzmin AV, Semenova S, Gerrits MA, Zvartau EE, van Ree JM, 1997b. Kappa-opioid receptor agonist U50,488H modulates cocaine and morphine self-administration in drug-naive rats and mice. Eur. J. Pharmacol. 321: 265-271.

Labarca C, Schwarz J, Deshpande P, Schwarz S, Nowak MW, Fonck C, Nashmi R, Kofuji P, Dang H, Shi W, Fidan M, Khakh BS, Chen Z, Bowers BJ, Boulter J, Wehner JM, Lester HA, 2001. Point mutant mice with hypersensitive alpha 4 nicotinic receptors show dopaminergic deficits and increased anxiety. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 98: 2786-2791.

Lanca AJ, Adamson KL, Coen KM, Chow BL, Corrigall WA, 2000. The pedunculopontine tegmental nucleus and the role of cholinergic neurons in nicotine self-administration in the rat: a correlative neuroanatomical and behavioral study. Neuroscience 96: 735-742.

Laughlin TM, Larson AA, Wilcox GL, 2001. Mechanisms of induction of persistent nociception by dynorphin. J. Pharmacol. Exp. Ther. 299: 6-11.

Laviolette SR, Van der Kooy D, 2004. The neurobiology of nicotine addiction: bridging the gap from molecules to behaviour. Nat. Rev. Neurosci. 5: 55-65.

Le Foll B, Wertheim C, Goldberg SR, 2007. High reinforcing efficacy of nicotine in non-human primates. PLoS. ONE. 2: e230.

Le Novere N, Changeux JP, 1995. Molecular evolution of the nicotinic acetylcholine receptor: an example of multigene family in excitable cells. J Mol. Evol. 40: 155-172.

Le AD, Quan B, Juzytch W, Fletcher PJ, Joharchi N, Shaham Y, 1998. Reinstatement of alcohol-seeking by priming injections of alcohol and exposure to stress in rats. Psychopharmacology (Berl) 135: 169-174.

Le NN, Zoli M, Lena C, Ferrari R, Picciotto MR, Merlo-Pich E, Changeux JP, 1999. Involvement of alpha6 nicotinic receptor subunit in nicotine-elicited locomotion, demonstrated by in vivo antisense oligonucleotide infusion. Neuroreport 10: 2497-2501.

Leonard S, Gault J, Moore T, Hopkins J, Robinson M, Olincy A, Adler LE, Cloninger CR, Kaufmann CA, Tsuang MT, Faraone SV, Malaspina D, Svrakic DM, Freedman R, 1998. Further investigation of a chromosome 15 locus in schizophrenia: analysis of affected sibpairs from the NIMH Genetics Initiative. Am. J. Med. Genet. 81: 308-312.

Lesage MG, Burroughs D, Dufek M, Keyler DE, Pentel PR, 2004. Reinstatement of nicotine self-administration in rats by presentation of nicotine-paired stimuli, but not nicotine priming. Pharmacol. Biochem. Behav. 79: 507-513.

Levin ED, 2002. Nicotinic receptor subtypes and cognitive function. J. Neurobiol. 53: 633-640.

Levin ED, Chen E, 2004. Nicotinic involvement in memory function in zebrafish. Neurotoxicol. Teratol. 26: 731-735.

Levin ED, Kaplan S, Boardman A, 1997. Acute nicotine interactions with nicotinic and muscarinic antagonists: working and reference memory effects in the 16-arm radial maze. Behav. Pharmacol. 8: 236-242.

Levin ED, McClernon FJ, Rezvani AH, 2006. Nicotinic effects on cognitive function: behavioral characterization, pharmacological specification, and anatomic localization. Psychopharmacology (Berl) 184: 523-539.

Li MD, 2006. The genetics of nicotine dependence. Curr. Psychiatry Rep. 8: 158-164.

Liu JG, Anand KJ, 2001. Protein kinases modulate the cellular adaptations associated with opioid tolerance and dependence. Brain Res Brain Res Rev. 38: 1-19.

Liu X, Caggiula AR, Yee SK, Nobuta H, Poland RE, Pechnick RN, 2006. Reinstatement of nicotine-seeking behavior by drug-associated stimuli after extinction in rats. Psychopharmacology (Berl). 184: 417-425.

Liu X, Caggiula AR, Yee SK, Nobuta H, Sved AF, Pechnick RN, Poland RE, 2007b. Mecamylamine attenuates cue-induced reinstatement of nicotine-seeking behavior in rats. Neuropsychopharmacology 32: 710-718.

Liu X, Caggiula AR, Yee SK, Nobuta H, Sved AF, Pechnick RN, Poland RE, 2007a. Mecamylamine attenuates cue-induced reinstatement of nicotine-seeking behavior in rats. Neuropsychopharmacology 32: 710-718.

Liu X, Palmatier MI, Caggiula AR, Sved AF, Donny EC, Gharib M, Booth S, 2008. Naltrexone attenuation of conditioned but not primary reinforcement of nicotine in rats. Psychopharmacology (Berl).

Macey DJ, Schulteis G, Heinrichs SC, Koob GF, 1996. Time-dependent quantifiable withdrawal from ethanol in the rat: effect of method of dependence induction. Alcohol 13: 163-170.

Maekawa K, Minami M, Yabuuchi K, Toya T, Katao Y, Hosoi Y, Onogi T, Satoh M, 1994. In situ hybridization study of mu- and kappa-opioid receptor mRNAs in the rat spinal cord and dorsal root ganglia. Neurosci. Lett. 168: 97-100.

Maisonneuve IM, Glick SD, 1999. (+/-)Cyclazocine blocks the dopamine response to nicotine. Neuroreport 10: 693-696.

Maldonado R, Saiardi A, Valverde O, Samad TA, Roques BP, Borrelli E, 1997. Absence of opiate rewarding effects in mice lacking dopamine D2 receptors. Nature 388: 586-589.

Maldonado R, Valverde O, 2005 Farmacología de los opioides. Adicciones: revista de socidrogalcohol, pp. 40-56.

Maldonado R, Valverde O, Berrendero F, 2006. Involvement of the endocannabinoid system in drug addiction. Trends Neurosci. 29: 225-232.

Malin DH, Lake JR, Carter VA, Cunningham JS, Wilson OB, 1993. Naloxone precipitates nicotine abstinence syndrome in the rat. Psychopharmacology (Berl) 112: 339-342.

Malin DH, Lake JR, Newlin-Maultsby P, Roberts LK, Lanier JG, Carter VA, Cunningham JS, Wilson OB, 1992. Rodent model of nicotine abstinence syndrome. Pharmacol. Biochem. Behav. 43: 779-784.

Mansour A, Fox CA, Akil H, Watson SJ, 1995. Opioid-receptor mRNA expression in the rat CNS: anatomical and functional implications. Trends Neurosci. 18: 22-29.

Mansour A, Fox CA, Burke S, Meng F, Thompson RC, Akil H, Watson SJ, 1994. Mu, delta, and kappa opioid receptor mRNA expression in the rat CNS: an in situ hybridization study. J. Comp Neurol. 350: 412-438.

Mansvelder HD, McGehee DS, 2002. Cellular and synaptic mechanisms of nicotine addiction. J. Neurobiol. 53: 606-617.

Manzanares J, Ortiz S, Oliva JM, Perez-Rial S, Palomo T, 2005. Interactions between cannabinoid and opioid receptor systems in the mediation of ethanol effects. Alcohol Alcohol 40: 25-34.

Marco EM, Granstrem O, Moreno E, Llorente R, Adriani W, Laviola G, Viveros MP, 2007. Subchronic nicotine exposure in adolescence induces long-term effects on hippocampal and striatal cannabinoid-CB1 and mu-opioid receptors in rats. Eur. J. Pharmacol. 557: 37-43.

Marco EM, Llorente R, Perez-Alvarez L, Moreno E, Guaza C, Viveros MP, 2005. The kappa-opioid receptor is involved in the stimulating effect of nicotine on adrenocortical activity but not in nicotine induced anxiety. Behav. Brain Res 163: 212-218.

Markou A, Kosten TR, Koob GF, 1998. Neurobiological similarities in depression and drug dependence: a self-medication hypothesis. Neuropsychopharmacology 18: 135-174.

Markou A, Paterson NE, 2001. The nicotinic antagonist methyllycaconitine has differential effects on nicotine self-administration and nicotine withdrawal in the rat. Nicotine. Tob. Res. 3: 361-373.

Marks MJ, Romm E, Gaffney DK, Collins AC, 1986. Nicotine-induced tolerance and receptor changes in four mouse strains. J. Pharmacol. Exp. Ther. 237: 809-819.

Marty MA, Erwin VG, Cornell K, Zgombick JM, 1985. Effects of nicotine on beta-endorphin, alpha MSH, and ACTH secretion by isolated perfused mouse brains and pituitary glands, in vitro. Pharmacol. Biochem. Behav. 22: 317-325.

Marubio LM, del MA-J, Cordero-Erausquin M, Lena C, Le NN, de Kerchove dA, Huchet M, Damaj MI, Changeux JP, 1999. Reduced antinociception in mice lacking neuronal nicotinic receptor subunits. Nature 398: 805-810.

Marubio LM, Gardier AM, Durier S, David D, Klink R, rroyo-Jimenez MM, McIntosh JM, Rossi F, Champtiaux N, Zoli M, Changeux JP, 2003. Effects of nicotine in the dopaminergic system of mice lacking the alpha4 subunit of neuronal nicotinic acetylcholine receptors. Eur. J. Neurosci. 17: 1329-1337.

Mathieu-Kia AM, Besson MJ, 1998. Repeated administration of cocaine, nicotine and ethanol: effects on preprodynorphin, preprotachykinin A and preproenkephalin mRNA expression in the dorsal and the ventral striatum of the rat. Brain Res Mol. Brain Res 54: 141-151.

Matsuzawa S, Suzuki T, Misawa M, Nagase H, 1999. Different roles of mu-, delta- and kappa-opioid receptors in ethanol-associated place preference in rats exposed to conditioned fear stress. Eur. J. Pharmacol. 368: 9-16.

Matthes HW, Maldonado R, Simonin F, Valverde O, Slowe S, Kitchen I, Befort K, Dierich A, Le MM, Dolle P, Tzavara E, Hanoune J, Roques BP, Kieffer BL, 1996. Loss of morphine-induced analgesia, reward effect and withdrawal symptoms in mice lacking the mu-opioid-receptor gene. Nature 383: 819-823.

Mayer DJ, Liebeskind JC, 1974. Pain reduction by focal electrical stimulation of the brain: an anatomical and behavioral analysis. Brain Res 68: 73-93.

McClernon FJ, Hiott FB, Liu J, Salley AN, Behm FM, Rose JE, 2007. Selectively reduced responses to smoking cues in amygdala following extinction-based smoking cessation: results of a preliminary functional magnetic resonance imaging study. Addict. Biol. 12: 503-512.

McFarland K, Davidge SB, Lapish CC, Kalivas PW, 2004. Limbic and motor circuitry underlying footshock-induced reinstatement of cocaine-seeking behavior. J. Neurosci. 24: 1551-1560.

McFarland K, Ettenberg A, 1997. Reinstatement of drug-seeking behavior produced by heroin-predictive environmental stimuli. Psychopharmacology (Berl) 131: 86-92.

McFarland K, Lapish CC, Kalivas PW, 2003. Prefrontal glutamate release into the core of the nucleus accumbens mediates cocaine-induced reinstatement of drug-seeking behavior. J. Neurosci. 23: 3531-3537.

McLaughlin JP, Marton-Popovici M, Chavkin C, 2003. Kappa opioid receptor antagonism and prodynorphin gene disruption block stress-induced behavioral responses. J. Neurosci. 23: 5674-5683.

Meliska CJ, Gilbert DG, 1991. Hormonal and subjective effects of smoking the first five cigarettes of the day: a comparison in males and females. Pharmacol. Biochem. Behav. 40: 229-235.

Mendizabal V, Zimmer A, Maldonado R, 2006. Involvement of kappa/dynorphin system in WIN 55,212-2 self-administration in mice. Neuropsychopharmacology 31: 1957-1966.

Meyer RE, Mirin SM, 1979. The heroin stimulus. Plenum Press, New York.

Minami M, Satoh M, 1995. Molecular biology of the opioid receptors: structures, functions and distributions. Neurosci. Res 23: 121-145.

Miner LL, Collins AC, 1988. The effect of chronic nicotine treatment on nicotine-induced seizures. Psychopharmacology (Berl) 95: 52-55.

Mirza NR, Bright JL, 2001. Nicotine-induced enhancements in the five-choice serial reaction time task in rats are strain-dependent. Psychopharmacology (Berl) 154: 8-12.

Molander C, Xu Q, Grant G, 1984. The cytoarchitectonic organization of the spinal cord in the rat. I. The lower thoracic and lumbosacral cord. J. Comp Neurol. 230: 133-141.

Munafo MR, Elliot KM, Murphy MF, Walton RT, Johnstone EC, 2007. Association of the mu-opioid receptor gene with smoking cessation. Pharmacogenomics. J. 7: 353-361.

Narita M, Khotib J, Mizoguchi H, Suzuki M, Ozaki S, Yajima Y, Tseng LF, Suzuki T, 2003a. Direct evidence for the up-regulation of spinal micro-opioid receptor function after repeated stimulation of kappa-opioid receptors in the mouse. Eur. J. Neurosci. 18: 2498-2504.

Narita M, Khotib J, Suzuki M, Ozaki S, Yajima Y, Suzuki T, 2003b. Heterologous mu-opioid receptor adaptation by repeated stimulation of kappa-opioid receptor:

up-regulation of G-protein activation and antinociception. J. Neurochem. 85: 1171-1179.

Nemeth-Coslett R, Griffiths RR, 1986. Naloxone does not affect cigarette smoking. Psychopharmacology (Berl) 89: 261-264.

Nestler EJ, 2004. Historical review: Molecular and cellular mechanisms of opiate and cocaine addiction. Trends Pharmacol. Sci. 25: 210-218.

Nestler EJ, 2001. Molecular basis of long-term plasticity underlying addiction. Nat. Rev. Neurosci. 2: 119-128.

Nestler EJ, Aghajanian GK, 1997. Molecular and cellular basis of addiction. Science 278: 58-63.

Nisell M, Nomikos GG, Svensson TH, 1994. Systemic nicotine-induced dopamine release in the rat nucleus accumbens is regulated by nicotinic receptors in the ventral tegmental area. Synapse 16: 36-44.

Nomikos GG, Schilstrom B, Hildebrand BE, Panagis G, Grenhoff J, Svensson TH, 2000. Role of alpha7 nicotinic receptors in nicotine dependence and implications for psychiatric illness. Behav. Brain Res. 113: 97-103.

O'Neill ST, Parrott AC, 1992. Stress and arousal in sedative and stimulant cigarette smokers. Psychopharmacology (Berl) 107: 442-446.

Oka K, Andoh T, Watanabe I, Kamiya Y, Ito H, 1998. Inhibition of the neuronal nicotinic receptor-mediated current by kappa opioid receptor agonists in PC12 cells. Pflugers Arch. 436: 887-893.

Olson GA, Olson RD, Kastin AJ, 1991. Endogenous opiates: 1990. Peptides 12: 1407-1432.

Ossipov MH, Lai J, Vanderah TW, Porreca F, 2003. Induction of pain facilitation by sustained opioid exposure: relationship to opioid antinociceptive tolerance. Life Sci. 73: 783-800.

Parrott AC, 1998. Nesbitt's Paradox resolved? Stress and arousal modulation during cigarette smoking. Addiction 93: 27-39.

Paterson NE, Froestl W, Markou A, 2005. Repeated administration of the GABAB receptor agonist CGP44532 decreased nicotine self-administration, and acute administration decreased cue-induced reinstatement of nicotine-seeking in rats. Neuropsychopharmacology 30: 119-128.

Paterson NE, Markou A, 2002. Increased GABA neurotransmission via administration of gamma-vinyl GABA decreased nicotine self-administration in the rat. Synapse 44: 252-253.

Paterson NE, Semenova S, Gasparini F, Markou A, 2003. The mGluR5 antagonist MPEP decreased nicotine self-administration in rats and mice. Psychopharmacology (Berl) 167: 257-264.

Pauli P, Rau H, Zhuang P, Brody S, Birbaumer N, 1993. Effects of smoking on thermal pain threshold in deprived and minimally-deprived habitual smokers. Psychopharmacology (Berl) 111: 472-476.

Pauly JR, 2008. Gender differences in tobacco smoking dynamics and the neuropharmacological actions of nicotine. Front Biosci. 13: 505-516.

Paxinos G, Franklin K, 1997. The mouse brain in stereotaxic coordinates. **San Diego: Academic**.

Paylor R, Nguyen M, Crawley JN, Patrick J, Beaudet A, Orr-Urtreger A, 1998. Alpha7 nicotinic receptor subunits are not necessary for hippocampal-dependent learning or sensorimotor gating: a behavioral characterization of Acra7-deficient mice. Learn. Mem. 5: 302-316.

Payne TJ, Smith PO, Adams SG, Diefenbach L, 2006. Pretreatment cue reactivity predicts end-of-treatment smoking. Addict. Behav. 31: 702-710.

Perkins KA, Doyle T, Ciccocioppo M, Conklin C, Sayette M, Caggiula A, 2006. Sex differences in the influence of nicotine dose instructions on the reinforcing and self-reported rewarding effects of smoking. Psychopharmacology (Berl) 184: 600-607.

Perry EK, Morris CM, Court JA, Cheng A, Fairbairn AF, McKeith IG, Irving D, Brown A, Perry RH, 1995. Alteration in nicotine binding sites in Parkinson's disease, Lewy body dementia and Alzheimer's disease: possible index of early neuropathology. Neuroscience 64: 385-395.

Pert CB, Snyder SH, 1973. Opiate receptor: demonstration in nervous tissue. Science 179: 1011-1014.

Piazza PV, Le MM, 1998. The role of stress in drug self-administration. Trends Pharmacol. Sci. 19: 67-74.

Picciotto MR, 2003. Nicotine as a modulator of behavior: beyond the inverted U. Trends Pharmacol. Sci. 24: 493-499.

Picciotto MR, Addy NA, Mineur YS, Brunzell DH, 2008. It is not "either/or": Activation and desensitization of nicotinic acetylcholine receptors both contribute to behaviors related to nicotine addiction and mood. Prog. Neurobiol. 84: 329-342.

Picciotto MR, Brunzell DH, Caldarone BJ, 2002. Effect of nicotine and nicotinic receptors on anxiety and depression. Neuroreport 13: 1097-1106.

Picciotto MR, Caldarone BJ, Brunzell DH, Zachariou V, Stevens TR, King SL, 2001. Neuronal nicotinic acetylcholine receptor subunit knockout mice: physiological and behavioral phenotypes and possible clinical implications. Pharmacol Ther. 92: 89-108.

Picciotto MR, Corrigall WA, 2002. Neuronal systems underlying behaviors related to nicotine addiction: neural circuits and molecular genetics. J. Neurosci. 22: 3338-3341.

Picciotto MR, Zoli M, Lena C, Bessis A, Lallemand Y, Le NN, Vincent P, Pich EM, Brulet P, Changeux JP, 1995. Abnormal avoidance learning in mice lacking functional high-affinity nicotine receptor in the brain. Nature 374: 65-67.

Picciotto MR, Zoli M, Rimondini R, Lena C, Marubio LM, Pich EM, Fuxe K, Changeux JP, 1998. Acetylcholine receptors containing the beta2 subunit are involved in the reinforcing properties of nicotine. Nature 391: 173-177.

Pierzchala K, Houdi AA, Van Loon GR, 1987. Nicotine-induced alterations in brain regional concentrations of native and cryptic Met- and Leu-enkephalin. Peptides 8: 1035-1043.

Pietila K, Lahde T, Attila M, Ahtee L, Nordberg A, 1998. Regulation of nicotinic receptors in the brain of mice withdrawn from chronic oral nicotine treatment. Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol. 357: 176-182.

Pomerleau OF, 1986. Nicotine as a psychoactive drug: anxiety and pain reduction. Psychopharmacol. Bull. 22: 865-869.

Pomerleau OF, Fertig JB, Seyler LE, Jaffe J, 1983. Neuroendocrine reactivity to nicotine in smokers. Psychopharmacology (Berl) 81: 61-67.

Pomerleau OF, Pomerleau CS, Namenek RJ, 1998. Early experiences with tobacco among women smokers, ex-smokers, and never-smokers. Addiction 93: 595-599.

Pomerleau OF, Turk DC, Fertig JB, 1984. The effects of cigarette smoking on pain and anxiety. Addict. Behav. 9: 265-271.

Pontieri FE, Tanda G, Orzi F, Di CG, 1996. Effects of nicotine on the nucleus accumbens and similarity to those of addictive drugs. Nature 382: 255-257.

Puig MM, Montes A, 1998 Opioids: from receptors to clinical application. Current Review of Pain , pp. 234-241.

Quik M, McIntosh JM, 2006. Striatal alpha6* nicotinic acetylcholine receptors: potential targets for Parkinson's disease therapy. J. Pharmacol. Exp. Ther. 316: 481-489.

Rashid MH, Furue H, Yoshimura M, Ueda H, 2006b. Tonic inhibitory role of alpha4beta2 subtype of nicotinic acetylcholine receptors on nociceptive transmission in the spinal cord in mice. Pain 125: 125-135.

Rashid MH, Furue H, Yoshimura M, Ueda H, 2006a. Tonic inhibitory role of alpha4beta2 subtype of nicotinic acetylcholine receptors on nociceptive transmission in the spinal cord in mice. Pain 125: 125-135.

Rasmussen DD, 1998. Effects of chronic nicotine treatment and withdrawal on hypothalamic proopiomelanocortin gene expression and neuroendocrine regulation. Psychoneuroendocrinology 23: 245-259.

Redila VA, Chavkin C, 2008. Stress-induced reinstatement of cocaine seeking is mediated by the kappa opioid system. Psychopharmacology (Berl) 200: 59-70.

Rittner HL, Brack A, Stein C, 2008. Pain and the immune system. Br. J. Anaesth. 101: 40-44.

Roberts AJ, McDonald JS, Heyser CJ, Kieffer BL, Matthes HW, Koob GF, Gold LH, 2000. mu-Opioid receptor knockout mice do not self-administer alcohol. J. Pharmacol. Exp. Ther. 293: 1002-1008.

Robinson TE, Berridge KC, 1993. The neural basis of drug craving: an incentive-sensitization theory of addiction. Brain Res Brain Res Rev. 18: 247-291.

Romero J, Berrendero F, Garcia-Gil L, Lin SY, Makriyannis A, Ramos JA, Fernandez-Ruiz JJ, 1999. Cannabinoid receptor and WIN-55,212-2-stimulated [35S]GTPgammaS binding and cannabinoid receptor mRNA levels in several brain structures of adult male rats chronically exposed to R-methanandamide. Neurochem. Int. 34: 473-482.

Ross SA, Wong JY, Clifford JJ, Kinsella A, Massalas JS, Horne MK, Scheffer IE, Kola I, Waddington JL, Berkovic SF, Drago J, 2000. Phenotypic characterization of an alpha 4 neuronal nicotinic acetylcholine receptor subunit knock-out mouse. J Neurosci. 20: 6431-6441.

Rubino T, Vigano D, Massi P, Parolaro D, 2001. The psychoactive ingredient of marijuana induces behavioural sensitization. Eur. J. Neurosci. 14: 884-886.

Russell MA, 1989. Subjective and behavioural effects of nicotine in humans: some sources of individual variation. Prog. Brain Res 79: 289-302.

Salas R, Pieri F, De BM, 2004. Decreased signs of nicotine withdrawal in mice null for the beta4 nicotinic acetylcholine receptor subunit. J. Neurosci. 24: 10035-10039.

Salas R, Pieri F, Fung B, Dani JA, De BM, 2003. Altered anxiety-related responses in mutant mice lacking the beta4 subunit of the nicotinic receptor. J. Neurosci. 23: 6255-6263.

Salin-Pascual RJ, Drucker-Colin R, 1998. A novel effect of nicotine on mood and sleep in major depression. Neuroreport 9: 57-60.

Sannerud CA, Prada J, Goldberg DM, Goldberg SR, 1994. The effects of sertraline on nicotine self-administration and food-maintained responding in squirrel monkeys. Eur. J. Pharmacol. 271: 461-469.

Sarnyai Z, Shaham Y, Heinrichs SC, 2001. The role of corticotropin-releasing factor in drug addiction. Pharmacol. Rev. 53: 209-243.

Schafer MK, Bette M, Romeo H, Schwaeble W, Weihe E, 1994. Localization of kappa-opioid receptor mRNA in neuronal subpopulations of rat sensory ganglia and spinal cord. Neurosci. Lett. 167: 137-140.

Schilstrom B, Nomikos GG, Nisell M, Hertel P, Svensson TH, 1998a. N-methyl-D-aspartate receptor antagonism in the ventral tegmental area diminishes the systemic nicotine-induced dopamine release in the nucleus accumbens. Neuroscience 82: 781-789.

Schilstrom B, Svensson HM, Svensson TH, Nomikos GG, 1998b. Nicotine and food induced dopamine release in the nucleus accumbens of the rat: putative role of alpha7 nicotinic receptors in the ventral tegmental area. Neuroscience 85: 1005-1009.

Serrano-Atero M N, Peramo F, Cañas A, García-Saura P, Serrano-Alvaréz C, Caballero J, 2002 Modulación descendente de la información nociceptiva. Rev.Soc.Esp.Dolor, pp. 382-390.

Seyler LE, Jr., Pomerleau OF, Fertig JB, Hunt D, Parker K, 1986. Pituitary hormone response to cigarette smoking. Pharmacol. Biochem. Behav. 24: 159-162.

Shaham Y, Adamson LK, Grocki S, Corrigall WA, 1997. Reinstatement and spontaneous recovery of nicotine seeking in rats. Psychopharmacology (Berl). 130: 396-403.

Shaham Y, Stewart J, 1996. Effects of opioid and dopamine receptor antagonists on relapse induced by stress and re-exposure to heroin in rats. Psychopharmacology (Berl) 125: 385-391.

Shaham Y, Stewart J, 1995. Effects of restraint stress and intra-ventral tegmental area injections of morphine and methyl naltrexone on the discriminative stimulus effects of heroin in the rat. Pharmacol. Biochem. Behav. 51: 491-498.

Shahan TA, Bickel WK, Madden GJ, Badger GJ, 1999. Comparing the reinforcing efficacy of nicotine containing and de-nicotinized cigarettes: a behavioral economic analysis. Psychopharmacology (Berl) 147: 210-216.

Shalev U, Grimm JW, Shaham Y, 2002a. Neurobiology of relapse to heroin and cocaine seeking: a review. Pharmacological Reviews 54: 1-42.

Shalev U, Grimm JW, Shaham Y, 2002b. Neurobiology of relapse to heroin and cocaine seeking: a review. Pharmacol. Rev. 54: 1-42.

Sher E, Chen Y, Sharples TJ, Broad LM, Benedetti G, Zwart R, McPhie GI, Pearson KH, Baldwinson T, De FG, 2004. Physiological roles of neuronal nicotinic receptor subtypes: new insights on the nicotinic modulation of neurotransmitter release, synaptic transmission and plasticity. Curr. Top. Med. Chem. 4: 283-297.

Shippenberg TS, Elmer GI, 1998. The neurobiology of opiate reinforcement. Crit Rev. Neurobiol. 12: 267-303.

Shippenberg TS, Zapata A, Chefer VI, 2007. Dynorphin and the pathophysiology of drug addiction. Pharmacol. Ther. 116: 306-321.

Shoaib M, Benwell ME, Akbar MT, Stolerman IP, Balfour DJ, 1994. Behavioural and neurochemical adaptations to nicotine in rats: influence of NMDA antagonists. Br. J. Pharmacol. 111: 1073-1080.

Shoaib M, Schindler CW, Goldberg SR, Pauly JR, 1997. Behavioural and biochemical adaptations to nicotine in rats: influence of MK801, an NMDA receptor antagonist. Psychopharmacology (Berl) 134: 121-130.

Sim LJ, Selley DE, Childers SR, 1995. In vitro autoradiography of receptor-activated G proteins in rat brain by agonist-stimulated guanylyl 5'-[gamma-[35S]thio]-triphosphate binding. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 92: 7242-7246.

Simonin F, Valverde O, Smadja C, Slowe S, Kitchen I, Dierich A, Le MM, Roques BP, Maldonado R, Kieffer BL, 1998. Disruption of the kappa-opioid receptor gene in mice enhances sensitivity to chemical visceral pain, impairs pharmacological actions of the selective kappa-agonist U-50,488H and attenuates morphine withdrawal. EMBO J. 17: 886-897.

Sine SM, 1997. Identification of equivalent residues in the gamma, delta, and epsilon subunits of the nicotinic receptor that contribute to alpha-bungarotoxin binding. J Biol. Chem. 272: 23521-23527.

Sine SM, Kreienkamp HJ, Bren N, Maeda R, Taylor P, 1995. Molecular dissection of subunit interfaces in the acetylcholine receptor: identification of determinants of alpha-conotoxin M1 selectivity. Neuron 15: 205-211.

Sinha R, Fuse T, Aubin LR, O'Malley SS, 2000. Psychological stress, drug-related cues and cocaine craving. Psychopharmacology (Berl) 152: 140-148.

Skiner BF, 1938. The behavior of organisms. Appleton-Century-Crofts, New York.

Solomon RL, Corbit JD, 1974. An opponent-process theory of motivation. I. Temporal dynamics of affect. Psychol. Rev. 81: 119-145.

Soria G, Barbano MF, Maldonado R, Valverde O, 2008. A reliable method to study cue-, priming-, and stress-induced reinstatement of cocaine self-administration in mice. Psychopharmacology (Berl). .

Soria G, Mendizabal V, Tourino C, Robledo P, Ledent C, Parmentier M, Maldonado R, Valverde O, 2005. Lack of CB1 cannabinoid receptor impairs cocaine self-administration. Neuropsychopharmacology. 30: 1670-1680.

Spanagel R, Herz A, Shippenberg TS, 1992. Opposing tonically active endogenous opioid systems modulate the mesolimbic dopaminergic pathway. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 89: 2046-2050.

Spano MS, Fattore L, Fratta W, Fadda P, 2007. The GABAB receptor agonist baclofen prevents heroin-induced reinstatement of heroin-seeking behavior in rats. Neuropharmacology 52: 1555-1562.

Sparks JA, Pauly JR, 1999. Effects of continuous oral nicotine administration on brain nicotinic receptors and responsiveness to nicotine in C57Bl/6 mice. Psychopharmacology (Berl) 141: 145-153.

Stein C., 1993 Peripheral mechanisms of opioid analgesia. Anesth Analg, pp. 182-191.

Stolerman IP, Naylor C, Elmer GI, Goldberg SR, 1999. Discrimination and self-administration of nicotine by inbred strains of mice. Psychopharmacology (Berl) 141: 297-306.

Suh HW, Song DK, Choi SR, Chung KM, Kim YH, 1996a. Nicotine enhances morphine- and beta-endorphin-induced antinociception at the supraspinal level in the mouse. Neuropeptides 30: 479-484.

Suh HW, Song DK, Lee KJ, Choi SR, Kim YH, 1996b. Intrathecally injected nicotine enhances the antinociception induced by morphine but not beta-endorphin, D-Pen2,5-enkephalin and U50,488H administered intrathecally in the mouse. Neuropeptides 30: 373-378.

Sutherland G, Stapleton JA, Russell MA, Feyerabend C, 1995. Naltrexone, smoking behaviour and cigarette withdrawal. Psychopharmacology (Berl) 120: 418-425.

Suzuki T, Tsuji M, Ikeda H, Misawa M, Narita M, Tseng LF, 1997. Antisense oligodeoxynucleotide to delta opioid receptors blocks cocaine-induced place preference in mice. Life Sci. 60: L-8.

Suzuki T, Tsuji M, Mori T, Misawa M, Endoh T, Nagase H, 1996. Effect of the highly selective and nonpeptide delta opioid receptor agonist TAN-67 on the morphine-induced place preference in mice. J. Pharmacol. Exp. Ther. 279: 177-185.

Suzuki T, Yoshiike M, Mizoguchi H, Kamei J, Misawa M, Nagase H, 1994. Blockade of delta-opioid receptors prevents morphine-induced place preference in mice. Jpn. J. Pharmacol. 66: 131-137.

Svingos AL, Clarke CL, Pickel VM, 1998. Cellular sites for activation of delta-opioid receptors in the rat nucleus accumbens shell: relationship with Met5-enkephalin. J. Neurosci. 18: 1923-1933.

Svingos AL, Moriwaki A, Wang JB, Uhl GR, Pickel VM, 1996. Ultrastructural immunocytochemical localization of mu-opioid receptors in rat nucleus accumbens: extrasynaptic plasmalemmal distribution and association with Leu5-enkephalin. J. Neurosci. 16: 4162-4173.

Sziraki I, Sershen H, Benuck M, Hashim A, Lajtha A, 1998. Receptor systems participating in nicotine-specific effects. Neurochem. Int. 33: 445-457.

Tanda G, Di CG, 1998. A dopamine-mu1 opioid link in the rat ventral tegmentum shared by palatable food (Fonzies) and non-psychostimulant drugs of abuse. Eur. J. Neurosci. 10: 1179-1187.

Thomsen M, Caine SB, 2007. Intravenous drug self-administration in mice: practical considerations. Behav. Genet. 37: 101-118.

Trigo JM, Panayi F, Soria G, Maldonado R, Robledo P, 2006. A reliable model of intravenous MDMA self-administration in naive mice. Psychopharmacology (Berl). 184: 212-220.

Trigo JM, Renoir T, Lanfumey L, Hamon M, Lesch KP, Robledo P, Maldonado R, 2007. 3,4-methylenedioxymethamphetamine self-administration is abolished in serotonin transporter knockout mice. Biol. Psychiatry. 62: 669-679.

Tripathi HL, Martin BR, Aceto MD, 1982. Nicotine-induced antinociception in rats and mice: correlation with nicotine brain levels. J. Pharmacol. Exp. Ther. 221: 91-96.

Trujillo KA, Akil H, 1991. Inhibition of morphine tolerance and dependence by the NMDA receptor antagonist MK-801. Science 251: 85-87.

Ugedo L, Ruiz E, 2000. Influencia de la herencia genética en las drogodependencias, vol. 2. Trastornos Adictivos, pp. 114-121.

Ushijima I, Horita A, 1993. Cocaine: evidence for. Pharmacol. Biochem. Behav. 44: 365-370.

Vanderah TW, Gardell LR, Burgess SE, Ibrahim M, Dogrul A, Zhong CM, Zhang ET, Malan TP, Jr., Ossipov MH, Lai J, Porreca F, 2000. Dynorphin promotes abnormal pain and spinal opioid antinociceptive tolerance. J. Neurosci. 20: 7074-7079.

Vanderschuren LJ, Di CP, Everitt BJ, 2005. Involvement of the dorsal striatum in cue-controlled cocaine seeking. J. Neurosci. 25: 8665-8670.

Vanderschuren LJ, Schmidt ED, De Vries TJ, Van Moorsel CA, Tilders FJ, Schoffelmeer AN, 1999. A single exposure to amphetamine is sufficient to induce long-term behavioral, neuroendocrine, and neurochemical sensitization in rats. J. Neurosci. 19: 9579-9586.

Vezina P, Kalivas PW, Stewart J, 1987. Sensitization occurs to the locomotor effects of morphine and the specific mu opioid receptor agonist, DAGO, administered repeatedly to the ventral tegmental area but not to the nucleus accumbens. Brain Res 417: 51-58.

Vihavainen T, Piltonen M, Tuominen RK, Korpi ER, Ahtee L, 2008. Morphine-nicotine interaction in conditioned place preference in mice after chronic nicotine exposure. Eur. J. Pharmacol.

Volkow ND, Fowler JS, 2000. Addiction, a disease of compulsion and drive: involvement of the orbitofrontal cortex. Cereb. Cortex 10: 318-325.

Volpicelli JR, Alterman AI, Hayashida M, O'Brien CP, 1992. Naltrexone in the treatment of alcohol dependence. Arch. Gen. Psychiatry 49: 876-880.

Wall TL, Schoedel K, Ring HZ, Luczak SE, Katsuyoshi DM, Tyndale RF, 2007. Differences in pharmacogenetics of nicotine and alcohol metabolism: Review and recommendations for future research. Nicotine. Tob. Res 9: S459-S474.

Walters CL, Brown S, Changeux JP, Martin B, Damaj MI, 2006. The beta2 but not alpha7 subunit of the nicotinic acetylcholine receptor is required for nicotine-conditioned place preference in mice. Psychopharmacology (Berl) 184: 339-344.

Walters CL, Cleck JN, Kuo YC, Blendy JA, 2005. Mu-opioid receptor and CREB activation are required for nicotine reward. Neuron 46: 933-943.

Wang J, Irnaten M, Mendelowitz D, 2001. Agatoxin-IVA-sensitive calcium channels mediate the presynaptic and postsynaptic nicotinic activation of cardiac vagal neurons. J. Neurophysiol. 85: 164-168.

Wang N, Orr-Urtreger A, Chapman J, Rabinowitz R, Nachman R, Korczyn AD, 2002. Autonomic function in mice lacking alpha5 neuronal nicotinic acetylcholine receptor subunit. J Physiol 542: 347-354.

Warburton DM, Rusted JM, Fowler J, 1992. A comparison of the attentional and consolidation hypotheses for the facilitation of memory by nicotine. Psychopharmacology (Berl) 108: 443-447.

Waters AJ, Shiffman S, Sayette MA, Paty JA, Gwaltney CJ, Balabanis MH, 2003. Attentional bias predicts outcome in smoking cessation. Health Psychol. 22: 378-387.

Watkins SS, Stinus L, Koob GF, Markou A, 2000. Reward and somatic changes during precipitated nicotine withdrawal in rats: centrally and peripherally mediated effects. J. Pharmacol. Exp. Ther. 292: 1053-1064.

Weissenborn R, Robbins TW, Everitt BJ, 1997. Effects of medial prefrontal or anterior cingulate cortex lesions on responding for cocaine under fixed-ratio and second-order schedules of reinforcement in rats. Psychopharmacology (Berl) 134: 242-257.

Wewers ME, Dhatt R, Tejwani GA, 1998. Naltrexone administration affects ad libitum smoking behavior. Psychopharmacology (Berl) 140: 185-190.

Wewers ME, Dhatt RK, Snively TA, Tejwani GA, 1999. The effect of chronic administration of nicotine on antinociception, opioid receptor binding and met-enkelphalin levels in rats. Brain Res 822: 107-113.

Wewers ME, Tejwani GA, Anderson J, 1994. Plasma nicotine, plasma beta-endorphin and mood states during periods of chronic smoking, abstinence and nicotine replacement. Psychopharmacology (Berl) 116: 98-102.

Whitehead CC, 1974. Methadone pseudowithdrawal syndrome: paradigm for a psychopharmacological model of opiate addiction. Psychosom. Med. 36: 189-198.

WHO, 2008. Report on the Global Tobacco Epidemic. The MPOWER package (http://www.who.int/tobacco/mpower/mpower_spanish.pdf).

Wilens TE, Decker MW, 2007. Neuronal nicotinic receptor agonists for the treatment of attention-deficit/hyperactivity disorder: focus on cognition. Biochem. Pharmacol. 74: 1212-1223.

Wilkins JN, Carlson HE, Van VH, Hill MA, Gritz E, Jarvik ME, 1982. Nicotine from cigarette smoking increases circulating levels of cortisol, growth hormone, and prolactin in male chronic smokers. Psychopharmacology (Berl) 78: 305-308.

Wise RA, Bozarth MA, 1987. A psychomotor stimulant theory of addiction. Psychol. Rev. 94: 469-492.

Woodruff-Pak DS, 2003. Mecamylamine reversal by nicotine and by a partial alpha7 nicotinic acetylcholine receptor agonist (GTS-21) in rabbits tested with delay eyeblink classical conditioning. Behav. Brain Res. 143: 159-167.

Xu W, Gelber S, Orr-Urtreger A, Armstrong D, Lewis RA, Ou CN, Patrick J, Role L, De BM, Beaudet AL, 1999a. Megacystis, mydriasis, and ion channel defect in mice lacking the alpha3 neuronal nicotinic acetylcholine receptor. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 96: 5746-5751.

Xu W, Orr-Urtreger A, Nigro F, Gelber S, Sutcliffe CB, Armstrong D, Patrick JW, Role LW, Beaudet AL, De BM, 1999b. Multiorgan autonomic dysfunction in mice lacking the beta2 and the beta4 subunits of neuronal nicotinic acetylcholine receptors. J Neurosci. 19: 9298-9305.

Xuei X, Dick D, Flury-Wetherill L, Tian HJ, Agrawal A, Bierut L, Goate A, Bucholz K, Schuckit M, Nurnberger J, Jr., Tischfield J, Kuperman S, Porjesz B, Begleiter H, Foroud T, Edenberg HJ, 2006. Association of the kappa-opioid system with alcohol dependence. Mol. Psychiatry 11: 1016-1024.

Yaksh T.L., 1993 The Spinal Actions of Opioids. Opioids II. Springer-Verlag, pp. 53-76.

Yan Y, Nitta A, Mizoguchi H, Yamada K, Nabeshima T, 2006. Relapse of methamphetamine-seeking behavior in C57BL/6J mice demonstrated by a reinstatement procedure involving intravenous self-administration. Behav. Brain Res 168: 137-143.

Yan Y, Yamada K, Nitta A, Nabeshima T, 2007. Transient drug-primed but persistent cue-induced reinstatement of extinguished methamphetamine-seeking behavior in mice. Behavioral Brain Research 177: 261-268.

Yoo JH, Lee SY, Loh HH, Ho IK, Jang CG, 2004. Loss of nicotine-induced behavioral sensitization in micro-opioid receptor knockout mice. Synapse 51: 219-223.

Young JW, Crawford N, Kelly JS, Kerr LE, Marston HM, Spratt C, Finlayson K, Sharkey J, 2007. Impaired attention is central to the cognitive deficits observed in alpha 7 deficient mice. Eur. Neuropsychopharmacol. 17: 145-155.

Young T, Wittenauer S, McIntosh JM, Vincler M, 2008. Spinal alpha3beta2* nicotinic acetylcholine receptors tonically inhibit the transmission of nociceptive mechanical stimuli. Brain Res. 1229: 118-124.

Zadina JE, Hackler L, Ge LJ, Kastin AJ, 1997. A potent and selective endogenous agonist for the mu-opiate receptor. Nature 386: 499-502.

Zarrindast MR, Faraji N, Rostami P, Sahraei H, Ghoshouni H, 2003. Cross-tolerance between morphine- and nicotine-induced conditioned place preference in mice. Pharmacol. Biochem. Behav. 74: 363-369.

Zarrindast MR, Farzin D, 1996. Nicotine attenuates naloxone-induced jumping behaviour in morphine-dependent mice. Eur. J. Pharmacol. 298: 1-6.

Zarrindast MR, Khoshayand MR, Shafaghi B, 1999. The development of cross-tolerance between morphine and nicotine in mice. Eur. Neuropsychopharmacol. 9: 227-233.

Zarrindast MR, Pazouki M, Nassiri-Rad S, 1997. Involvement of cholinergic and opioid receptor mechanisms in nicotine-induced antinociception. Pharmacol. Toxicol. 81: 209-213.

Zhang Y, Butelman ER, Schlussman SD, Ho A, Kreek MJ, 2004. Effect of the endogenous kappa opioid agonist dynorphin A(1-17) on cocaine-evoked increases in striatal dopamine levels and cocaine-induced place preference in C57BL/6J mice. Psychopharmacology (Berl) 172: 422-429.

Zimmer A, Valjent E, Konig M, Zimmer AM, Robledo P, Hahn H, Valverde O, Maldonado R, 2001. Absence of delta -9-tetrahydrocannabinol dysphoric effects in dynorphin-deficient mice. J. Neurosci. 21: 9499-9505.

Zislis G, Desai TV, Prado M, Shah HP, Bruijnzeel AW, 2007. Effects of the CRF receptor antagonist D-Phe CRF(12-41) and the alpha2-adrenergic receptor agonist clonidine on stress-induced reinstatement of nicotine-seeking behavior in rats. Neuropharmacology 53: 958-966.

Zoli M, Picciotto MR, Ferrari R, Cocchi D, Changeux JP, 1999. Increased neurodegeneration during ageing in mice lacking high-affinity nicotine receptors. EMBO J. 18: 1235-1244.