



Universidad de Los Andes

Facultad de Ciencias

Departamento de Biología

Laboratorio de Fisiología de la Conducta

**EFECTO AGUDO Y CRÓNICO DE LA MORFINA SOBRE LOS NIVELES DE AGMATINA
GLUTAMATO Y GABA EN EL PALIDO VENTRAL DE RATAS.**

Autor: Br. Elismar Y. Ruiz V.

Tutor: Pedro Rada.

Mérida, Julio de 2017.

www.bdigital.ula.ve

Trabajo Especial de Grado presentado

por la Br. Elismar Y. Ruiz V.

como requisito para

optar al título de Licenciada en

Biología.

Resumen.

La adicción a morfina es una enfermedad cerebral que se caracteriza por la búsqueda y consumo compulsivo de la droga, pérdida de control del consumo y la aparición de un estado emocional negativo. En el estudio, se determinaron las variaciones en los niveles de neurotransmisores agmatina, glutamato y GABA en el pálido ventral de cerebro de rata, durante tratamientos agudo y crónico con morfina, y luego de inducir la abstinencia con el antagonista naloxona. Los neurotransmisores se recolectaron mediante la técnica de microdiálisis intracerebral in vivo, analizándose a través de electroforesis capilar acoplada a detección por fluorescencia inducida por láser. Durante la fase aguda del tratamiento, no se registraron cambios significativos en los niveles de agmatina; por el contrario, los niveles de GABA y glutamato experimentaron una disminución y aumento significativos, respectivamente. En la fase crónica del tratamiento, se observó una reducción significativa en los niveles de GABA, mientras que, los niveles de agmatina y glutamato no cambiaron. Posteriormente, al inducir la abstinencia con naloxona, los niveles de agmatina y glutamato aumentaron significativamente, entretanto, los niveles de GABA no registraron variación. Solo se encontró una reducción significativa en los valores absolutos de agmatina previo a la inyección del antagonista naloxona.

Palabras claves: agmatina, glutamato, GABA, morfina, naloxona, pálido ventral, microdiálisis intracerebral, electroforesis capilar, ratas.

ABSTRACT

Morfine adiction is a neural disease characterized by search and compulsive intake of drug, control loss and ocurrence of negative emotional state. In this study, the variations on agmatine, GABA and glutamate neurotransmitters levels was determined, during acute and chronic morfine treatment, and after induce abstinence with naloxone antagonist. The neurotransmitters were obtained by in vivo intracerebral microdialysis and analyzed by capillary electrophoresis coupled to laser-induced fluorescence detection. During acute phase of treatment, changes on agmatine levels were not found; in contrast, the GABA and glutamate levels suffered a significant decrease and increase, respectively. In chronic phase of treatment, a significant decrease on GABA levels were observed, while that agmatine and glutamate levels not changing. Later, to the naloxone-induced abstinence, the agmatine and glutamate levels significantly increased, and GABA levels did not vary. A significant decrease on agmatine absolute values was found only, before to naloxone antagonist inyection.

Key Words: agmatine, glutamate, GABA, morphine, naloxone, ventral palidum, intracerebral microdialysis, capillary electrophoresis, EC-LIF, rats.

www.bdigital.ula.ve

Agradecimientos.

A mis padres Elio y Yolanda, por su amor, comprensión, corrección y apoyo; quienes me enseñaron que “la mayor herencia de los padres hacia los hijos es el estudio”, y me han impulsado a proponerme metas y alcanzarlas a pesar de los obstáculos en el camino. Agradecida de Dios y de la vida por haberme regalado los mejores padres cuyos principios me inspiran a perseguir la excelencia para que el éxito venga por añadidura.

A mis hermanos Yole, Jesús y Esmeralda porque nunca dejaron de animarme con un ¡vamos, si se puede! Y siempre han estado en las buenas y malas siendo testigos de mis triunfos y fracasos, aceptando lo mejor y peor de mí.

A las alegrías de mi vida, mis sobrinos Víctor y Rafael David... con solo recordar sus sonrisas y travesuras encienden mis motores y me impulsan a seguir construyendo un mejor futuro para ustedes. ¡Los quiero!

A mis abuelos... quienes representan para mi uno de los mayores ejemplos de perseverancia y superación, a pesar de todas las dificultades de la vida.

A los filósofos y demás... “los Ruices” en especial a mis tios Goyo y Luis, mi transitar por Mérida no hubiera sido igual sin la ayuda que me brindaron... mil gracias es poco, en comparación con su gran apoyo.

A mis tias Yadira, Dalia, Morella y Esmeralda... por cada una de las innumerables ayudas que ocasiones que me han brindado.

A Frederit David, por quien siento un gran amor, admiración y respeto. Cuando la apatía osaba de compañera, nunca me dejaste sucumbir ante la desesperación por tus charlas motivacionales. Me enseñaste que siempre hay que estar preparada para lo peor esperando lo mejor de las cosas. “No era más que un zorro semejante a mil otros. Yo le hice mi amigo y ahora es único en el mundo”... tomado de el principito/ Antoine De Saint Exupéry.

A mis amigo, Adan, Yajaira, Mónica, Liliana, Marcos, Manuel, Wilvis, Lady y José David... siempre ocuparan un lugar privilegiado en mi vida, fueron risas, llantos, abrazos y rabietas. Sin ustedes mi caminar por la uni no hubiera sido igual...

Astrid, Elías, Mike y María José fueron grandes compañeros; gracias por el apoyo, intercambio de ideas y tardes de charlas y cafés en el laboratorio.

Al profesor Pedro Rada, por el que siento una gran admiración por sus grandes conocimientos, gracias por abrirme las puertas del laboratorio, la paciencia y la guía a lo largo de este trabajo.

Al profesor Luis Hernández, gran Bio-médico, un ejemplo de que la alta trayectoria científica y grandes conocimientos pueden ir de la mano con la humildad y calidad humana.

A la profesora Andrea Ramírez, gracias por su amistad y preocupación hacia mí, más que una profesora una gran consejera.

Al profesor Wilfredo Quiñones, gracias por haber sido una voz amiga, trabajar a su lado fue una gran experiencia que me hizo crecer y ganar seguridad.

A la profesora Amaranta Gómez, gracias por la gran colaboración y correcciones en la culminación del trabajo escrito.

A los profesores Pedro Pieruzzini, Luis Betancourt y, el ingeniero Luis E. Hernández miembros del laboratorio de fisiología de la conducta, por la enorme colaboración en la realización del trabajo experimental.

A la profesora Rosa de Jesús y al resto del personal del bioterios de la Universidad de los Andes, por solventar cualquier problema acerca de los animales para los experimentos.

Al profesor Alexis M. y Zaida C. miembros del laboratorio de toxicología analítica del Instituto Autónomo Hospital Universitario (IAHULA), sin la prestación del equipo de electroforesis, no hubiera logrado la culminación del trabajo experimental... mil gracias.

A las profesoras Leticia y Zulma del centro de microscopia electrónica Dr Ernesto Palacios Pru, por la amabilidad, colaboración, y disponibilidad a la hora de realizar los cortes de cerebro. Mil gracias.

A todos aquellas personas que no he nombrado, disculpen mi omisión, mil gracias!

Índice

INTRODUCCIÓN.	9
ADICCIÓN.	9
MORFINA.	16
AGMATINA.	19
GLUTAMATO.	21
ACIDO GAMMA-AMINO BUTÍRICO (GABA).	23
MICRODIÁLISIS INTRACEREBRAL.	26
ELECTROFORESIS CAPILAR.	27
HIPÓTESIS.	29
OBJETIVOS GENERALES.	30
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.	30
JUSTIFICACIÓN DEL PROBLEMA.	31
MATERIALES Y MÉTODOS.	32
MATERIAL BIOLÓGICO.	32
REACTIVOS.	32
SOLUCIONES.	33
EQUIPOS.	33
MATERIAL PARA CIRUGÍA Y OTROS.	34
IMPLANTACIÓN DE LA CÁNULA GUÍA:	36
SESIONES DE MICRODIÁLISIS INTRACEREBRAL.	37
DERIVATIZACIÓN DE LAS MUESTRAS:	38
ELECTROFORESIS CAPILAR ACOPLADA A UN SISTEMA DE DETECCIÓN POR FLUORESCENCIA INDUCIDA POR LÁSER.	38
PROCESAMIENTO DE DATOS Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO.	41
HISTOLOGÍA.	41
RESULTADOS.	43
NIVELES DE AGMATINA EN EL PÁLIDO VENTRAL DE RATAS DURANTE EL PRIMER DÍA DE TRATAMIENTO CON MORFINA (FASE AGUDA).	43
NIVELES DE AGMATINA EN EL PÁLIDO VENTRAL DE RATAS DURANTE EL SÉPTIMO DÍA DE TRATAMIENTO CON MORFINA (FASE CRÓNICA).	43
NIVELES DE AGMATINA EN EL PÁLIDO VENTRAL DE RATAS EN EL OCTAVO DÍA DE TRATAMIENTO CON NALOXONA.	43
CONCENTRACIONES BASEALES DE AGMATINA EN EL PÁLIDO VENTRAL EN LOS DIFERENTES DÍAS DE TRATAMIENTOS CON MORFINA.	43

NIVELES DE GLUTAMATO EN EL PÁLIDO VENTRAL DE RATAS DURANTE EL PRIMER DÍA DE TRATAMIENTO CON MORFINA (FASE AGUDA).	46
NIVELES DE GLUTAMATO EN EL PÁLIDO VENTRAL DE RATAS DURANTE EL SÉPTIMO DÍA DE TRATAMIENTO CON MORFINA (FASE CRÓNICA).	46
NIVELES DE GLUTAMATO EN EL PÁLIDO VENTRAL DE RATAS DURANTE LA INDUCCIÓN DE LA ABSTINENCIA EN EL OCTAVO DÍA DE TRATAMIENTO CON NALOXONA.	46
CONCENTRACIONES BASALES DE GLUTAMATO EN EL PÁLIDO VENTRAL DE RATAS EN LOS DIFERENTES DÍAS DE TRATAMIENTOS CON MORFINA.	46
NIVELES DE GABA EN EL PÁLIDO VENTRAL DE RATAS DURANTE EL PRIMER DÍA DE TRATAMIENTO CON MORFINA (FASE AGUDA).	49
NIVELES DE GABA EN EL PÁLIDO VENTRAL DE RATAS DURANTE EL SÉPTIMO DÍA DE TRATAMIENTO CON MORFINA (FASE CRÓNICA).	49
NIVELES DE GABA EN EL PÁLIDO VENTRAL DE RATAS DURANTE LA INDUCCIÓN DE ABSTINENCIA CON EL ANTAGONISTA NALOXONA EN EL OCTAVO DÍA DE TRATAMIENTO.	49
CONCENTRACIONES BASALES DE GABA EN EL PÁLIDO VENTRAL EN LOS DIFERENTES DÍAS DE TRATAMIENTOS CON MORFINA.	49
VERIFICACIÓN DE LA CÁNULA DE DIÁLISIS.	51
DISCUSIÓN.	53
AGMATINA.	53
GLUTAMATO.	56
GABA.	59
CONCLUSIONES.	64
BIBLIOGRAFÍA	66

Introducción

Adicción

La adicción es definida como una enfermedad crónica cerebral que se caracteriza por la aparición de patrones en el comportamiento de los individuos, destacándose entre estos: la búsqueda y consumo compulsivo de la droga, pérdida de control durante el consumo y la aparición de un estado emocional negativo (anhedonia, disforia, irritabilidad, entre otros) cuando hay ausencia de la droga (Koob y Le Moal, 1997).

Otros autores han señalado que durante la adicción se genera un desorden en la motivación y un aprendizaje asociativo, debido a que el consumo de droga adquiere un alto valor motivacional e incluso los estímulos asociados con éstas pueden predecir su disponibilidad, y causar la búsqueda de la misma (Di Chiara y col., 1999). Asimismo, han argumentado que el reforzamiento positivo, aunque no es suficiente, constituye una propiedad clave en la adicción; ya que los efectos generados por las drogas como el placer, liberación de tensión, reducción de fatiga, rendimiento en las actividades u otros estados de excitación incrementa la probabilidad de búsqueda y consumo continuo (Di Chiara y col., 1999).

Es importante resaltar que el persistente consumo de drogas ocasiona alteraciones en los circuitos cerebrales, a tal punto, de generarse una dependencia del individuo hacia los efectos de la misma esto conduce a cambios en el comportamiento. De acuerdo con la Asociación Americana de Psicología (APA), (1995), a través del manual de diagnóstico y estadísticos de los trastornos mentales (DSM-IV-TR), existen una serie de criterios para diagnosticar la dependencia a una sustancia, debiéndose presentar al menos tres de los siguientes patrones en los individuos:

- ✓ Aparición de tolerancia.
- ✓ Síntomas de abstinencia.
- ✓ Consumo de una sustancia en mayores cantidades o durante periodos de tiempo más largos de lo previsto.
- ✓ Deseo persistente o intentos fallidos de dejar o controlar el consumo.
- ✓ Problemas físicos y psicológicos relacionados con el consumo.

- ✓ Consumo continuado de la sustancia a pesar de los problemas de salud, sociales o económicos que genera su toma.

- ✓ Incumplimientos de actividades familiares, laborales o de ocio por el consumo de la droga.

Teorías de la adicción

Con la finalidad de explicar el inicio y mantenimiento de la adicción, han surgido diversas hipótesis que exponen diferentes maneras de explicar dicho proceso. Actualmente las hipótesis más destacadas o aceptadas son: 1) teoría de la Sensibilización del incentivo; y 2) teoría de la espiral de la desregulación.

Sensibilización del incentivo (Robinson y Berridge, 1993)

Estos autores proponen que existe una hipersensibilización del mecanismo neural que atribuye un valor incentivo a las drogas (aumento del neurotransmisor dopamina (DA) en el sistema mesolímbico), es decir, los individuos adictos se encuentran más sensibilizados a los efectos de las drogas que a otros estímulos; por esta razón, se incrementa en ellos el deseo patológico o “craving” induciendo la búsqueda compulsiva de la droga. Esta hipótesis propone que el placer subjetivo (liking) no está sujeto a sensibilización, por lo que el consumo de la droga se mantiene, aunque disminuya el efecto placentero con el tiempo y tras el consumo persistente (Robinson y Berridge, 1993; Robinson y Berridge, 2008)

Teoría de la espiral de la desregulación (Koob y Le Moal, 1997)

Basada en la teoría de los procesos oponentes propuesta por Solomon y Corbit en 1974, sugieren que el cerebro presenta mecanismos de control para regular los estados placenteros o aversivos. Exponen que, al principio, predominan los efectos placenteros que refuerzan próximos encuentros con la droga; estos efectos son los responsables del inicio de la adicción. Cuando el consumo se intensifica se genera el efecto contrario, surge la aparición de la tolerancia a los efectos iniciales de las drogas, produciéndose disforia o la aparición de un estado que puede ser físico y emocionalmente negativo, que pudiera estar asociado con una disminución en los niveles de dopamina. El hecho de evitar o aliviar este déficit pudiera ser el causante del mantenimiento de la adicción (Koob y Le Moal, 1997).

Koob y Le Moal proponen que la sensibilización del sistema de recompensa cerebral no es el único factor que influye durante el proceso de adicción; la aparición de los efectos negativos contribuye con el consumo y búsqueda de la droga por activación de mecanismos asociados con estrés, como por ejemplo, aumento en la liberación del factor liberador de corticotropina durante la abstinencia (Logrip y col., 2011). Estos autores concluyen que la anticipación/preocupación por la obtención de la droga contribuye con la intoxicación y aparición de la abstinencia, procesos que influyen en el mantenimiento de la adicción (Koob y Le Moal, 1997).

Sustrato neurobiológico de la adicción

A través de trabajos realizados por Olds y Milner en el año 1954 mediante la técnica de autoestimulación eléctrica intracerebral, se logró determinar los mecanismos cerebrales responsables de la recompensa, en donde, la implantación de electrodos en determinados núcleos del encéfalo de ratas, promovía que éstas presionaran constantemente una palanca para obtener un estímulo eléctrico y con ello una “recompensa”; de esta forma se comenzó a estudiar el sustrato neural implicado en la recompensa y el placer (Olds y Milner, 1954).

A finales de la década de los '70 Roy Wise señala la importancia del sistema dopaminérgico en los mecanismos de recompensa. Wise demuestra que, en ratas que aprenden a presionar una palanca para obtener comida, la inyección de un bloqueador específico de la dopamina en la sustancia negra era suficiente para inhibir la conducta de presionar la palanca; y no era por que el animal se enfermara, ya que si al mismo animal se le colocaba la comida dentro de la jaula, la comía sin problema, simplemente no presionaba la palanca (Wise y Col., 1978).

Con el tiempo, las drogas proporcionaron un nuevo enfoque para el estudio del placer y recompensa, y por medio de la técnica de microdiálisis intracerebral se determinó que todas las drogas de adicción incrementan los niveles de dopamina en el núcleo accumbens (estriado ventral), en comparación con el caudado-putamen (estriado dorsal), (Di Chiara y col., 1999; Hernandez y Hoebel, 1987). Actualmente, se conoce que los circuitos de placer y recompensa están muy asociados al proceso de adicción, y que las drogas de abuso, de forma similar a los reforzadores naturales (comida, agua, sexo), activan la liberación de dopamina desde el área tegmental ventral (ATV) hacia una región específica denominada como “shell” del núcleo accumbens, corteza prefrontal y núcleo basolateral de la amígdala, (Di Chiara e Imperato, 1988; Wise, 2002; Wise y col., 1987), incluso se ha señalado que la liberación de dopamina causada por drogas es significativamente mayor que la provocada por dichos reforzadores (Hernández y Hoebel, 1988). Es importante destacar que los reforzadores naturales están sujetos a un mecanismo de regulación como habituación y/o saciedad, es decir, a medida que se repite la exposición a dichos reforzadores, disminuye su carácter reforzante o

su capacidad para generar una recompensa; no ocurre así, con el repetido consumo de las drogas, el cual induce la aparición de tolerancia (Di Chiara y col., 1999).

A pesar de la acción común de las drogas sobre el sistema mesolímbico, el incremento de dopamina se puede producir por diversos mecanismos. Los psicoestimulantes, como anfetaminas y cocaína, bloquean la recaptura de dopamina (Fernández y col., 2006). Por otra parte, el alcohol y el cannabis actúan sobre neuronas glutamatérgicas o GABAérgicas que a su vez modulan la activación de las neuronas dopaminérgicas del ATV; asimismo, se ha determinado que la morfina y la heroína se unen sobre los receptores μ -opioides de interneuronas GABAérgicas que inhiben neuronas glutamatérgicas y dopaminérgicas en el ATV; de esta forma, se produce la excitación de dicha región y se promueve la liberación de dopamina hacia el núcleo accumbens (Johnson y North, 1992; Jalabert y col., 2011; Chen y col., 2015), (ver figura 2).

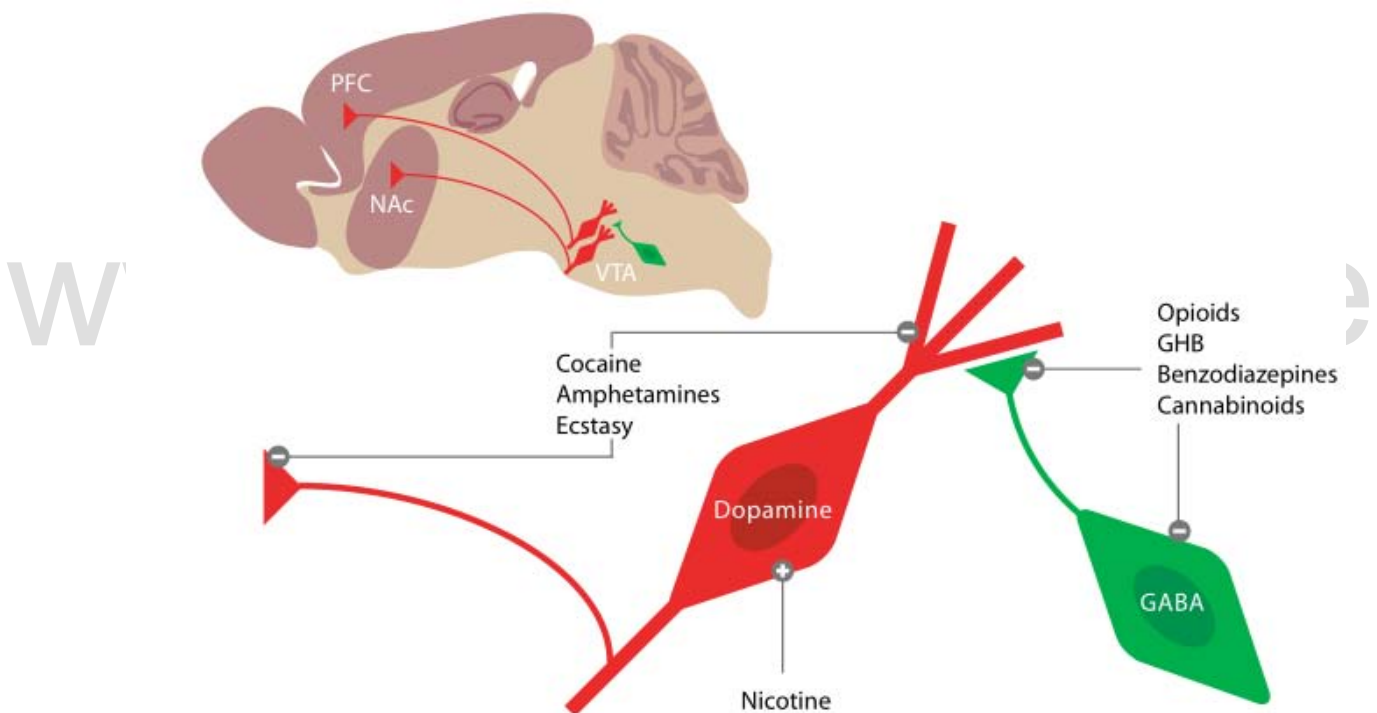


Figura 1. Representación esquemática del sistema mesocorticolímbico en la adicción. Se puede visualizar el área tegmental ventral (ATV), núcleo accumbens (NAc) y corteza prefrontal (CPF). El esquema ilustra el mecanismo cerebral mediante el cual las drogas incrementan la liberación de dopamina en el Nac y CPF. Los psicoestimulantes como la cocaína bloquean la recaptura de dopamina en terminales presinápticos y en dendritas, la nicotina actúa al unirse sobre los receptores colinérgicos despolarizando directamente las neuronas dopaminérgicas. Los opioides, cannabinoides, benzodiazepinas se unen sobre sus receptores a nivel pre y postsinápticos de interneuronas GABAérgicas desinhibiendo la liberación de DA en el ATV (Lüscher y Malenka, 2011).

Por otro lado, es necesario mencionar que el pálido ventral recibe GABA y péptidos opioides del núcleo accumbens a través de la neurona espinosa media (Napier y Mitrovic, 1999), proyecciones glutamatérgicas desde el núcleo basolateral de la amígdala, núcleo subtálmico y corteza prefrontal (Fuller y col., 1987; Carnes y col., 1990), y dopaminérgicas desde la sustancia negra y el área tegmental ventral (Napier, 1991). El pálido ventral, conjuntamente con otras regiones cerebrales como el estriado dorsal (caudado-putamen) y ventral (núcleo accumbens), núcleo subtálmico y sustancia negra, forma parte de los ganglios basales, un conjunto de núcleos de sustancia gris cuya función principal es la planificación y ejecución de los movimientos corporales complejos (Purves, 2001). Es importante destacar, que el pálido ventral se encuentra estructurado en dos regiones, cada una con funciones específicas: la región ventromedial (VPvm) y dorsolateral (VPdl), las cuales reciben aferencias desde el núcleo accumbens shell y core, respectivamente. La primera subregión se ha asociado con la adquisición de recompensas naturales y generadas por las drogas de abuso, y la región dorsolateral con el comportamiento de búsqueda de la droga (Root y col., 2015)

La conexión del pálido ventral con el sistema mesocorticolímbico ha llevado a inferir su posible papel en la recompensa generada por las drogas; estudios han hallado que la estimulación del PV incrementa la autoestimulación en las ratas (Pannagis y col., 1995) mientras que lesiones en dicha región (con ácido iboténico) bloquea la autoadministración de heroína y cocaína (Hubner y Koob, 1990); asimismo, se ha resaltado su función de “puente” debido a que comunica la información límbica, como estímulos asociados a las emociones, con el circuito motor, de manera que se genera una respuesta motora apropiada para dicho estímulo (ver figura 2), (Kalivas y col, 1999; Mogeson y col., 1980); por esta razón, ha sido una estructura blanco para el estudio del comportamiento motivado por drogas de abuso; se ha determinado que inyecciones de morfina en el pálido ventral causa activación motora en ratas (Dallimore y col., 2006), lo que pudiera relacionarse con el estado motivacional positivo que induce.

Fase aguda: consiste en los primeros contactos del individuo con la droga, cuyo uso puede ser controlado. Se caracteriza porque sus propiedades reforzantes facilitan la fuerte exposición al consumo. Como se mencionó anteriormente, se generan variaciones en los niveles de dopamina u otros neurotransmisores (Di Chiara e Imperato, 1988; Nestler y Aghajanian, 1997).

Fase crónica: surge cuando el consumo de la droga es continuo (en el transcurso de días hasta años), y se genera una pérdida de control, incluso en ausencia de estímulos asociados con el consumo de droga. Se ha determinado que durante esta etapa, se anticipa la liberación de dopamina ocasionado por la presencia de estímulos asociados con las drogas. No obstante, en presencia de señales (como jeringas, reencuentro con individuos consumidores o lugar de consumo, entre otros) también se induce la búsqueda y consumo compulsiva de la droga (Nestler y Aghajanian, 1997; Volkow y col., 2016).

En esta fase se generan cambios plásticos en el cerebro, resaltándose la alteración en las estructuras de las dendritas, en la cantidad de los receptores y sus funciones; por ejemplo, el consumo crónico de cocaína incrementa los receptores dopaminérgicos y receptores μ -opioides en el núcleo accumbens (Unterwald y col., 1992; Unterwald, 2001), asimismo, el consumo crónico de morfina mantiene incrementado los niveles de dopamina (Pothos y col., 1991) lo que indica la aparición de **sensibilización**, el cual es un proceso caracterizado por el aumento de los efectos de la droga incluso cuando su consumo es persistente (Di Chiara y col., 1999). Otras alteraciones, como incremento de factores de transcripción como CREB (cAMP response element binding protein), δ -fos, y la expresión de genes se han asociado con la aparición de tolerancia (Luscher y Malenka, 2011; Olive y Gass, 2015); caracterizada por la disminución del efecto de la droga a medida que el consumo es continuo, hecho por el cual, los individuos incrementan la cantidad de drogas con la finalidad de alcanzar un efecto similar al obtenido en la primera dosis (Nestler y Aghajanian, 1997).

Fase de abstinencia aguda (síndrome de abstinencia): se define como el conjunto de signos y síntomas (que pueden ser emocionales o físicos), que aparecen cuando se suprime o se reduce la concentración de la droga en sangre y tejidos en individuos que han mantenido un uso prolongado y en altas concentraciones de la droga (APA, 1995). En el caso de adictos a opiáceos, el síndrome de abstinencia se caracteriza por la aparición de un estado disfórico acompañado por síntomas depresivos y de ansiedad; además de molestias periféricas como escalofríos, temblores, pupilas dilatadas, anorexia, náuseas, diarrea, insomnio, pérdida de peso, deshidratación, elevaciones de la temperatura y de la presión arterial y alteraciones del pulso.

Fase de abstinencia a largo plazo (recaídas): cuando la abstinencia aguda logra ser superada, se genera una etapa de "abstinencia asintomática". Sin embargo, el deseo intenso por consumir drogas (craving) puede conducir a una recaída. Por otro lado, tras la aparición de estímulos

asociados con las drogas, nuevos contactos con la misma, incluso el estrés, promueve la aparición de una abstinencia sintomática (Moral y Fernández, 2009).

Morfina

La morfina es un alcaloide derivado del opio o exudado de la planta *Papaver somniferum* mejor conocida como amapola real o adormidera, cuyo efecto analgésico se conoce desde hace 3400 años A.C. Se extrajo por primera vez en 1806, nombrandola como “morfina” en honor al dios griego del sueño “Morpheus”, por su efecto sedante. El exudado es una mezcla de azúcares, grasas, proteínas, ácido láctico, además de 20 alcaloides activos entre los que destacan papaverina, codeína, noscapina y la morfina, la cual constituye el 10% del opio. Es importante resaltar que todos los compuestos del opio, incluso fármacos semisintéticos como la heroína (derivada de la morfina), se designan como opiáceos, mientras que el término opioide se utiliza para definir a todas las sustancias sean éstas endógenas (como encefalinas, endorfinas y dinorfinas) o exógenas que se unen a receptores pertenecientes al sistema opioide endógeno como el receptor opioide mu (μ), kappa (κ), delta (δ) y épsilon (ϵ) (Álvarez, 2005; Valverde y Maldonado, 2005).

Mecanismo de acción de la morfina

La acción farmacológica de la morfina depende de su interacción con el sistema opioide endógeno, específicamente con el receptor μ -opioide:

Receptores mu-opioide (μ): presenta una elevada afinidad hacia la morfina; dentro de los péptidos endógenos que se unen a este receptor se encuentran las met-enkefalinas, las leu-enkefalinas, dinorfinas y β -endorfinas (Borsodi y col., 2016; Villarejo y col., 2000).

El receptor μ -opioide se encuentra acoplado a una proteína G heterotrimérica. La unión de la morfina con el receptor μ -opioide, provoca un cambio conformacional en el receptor, que promueve la unión de GTP a la subunidad G_α de la proteína G, disociándose luego del dímero $G_{\beta\gamma}$. A partir de allí se genera una cascada de señalización intracelular que conlleva a la regulación de enzimas y canales iónicos. Para retornar al estado inicial, la subunidad G_α metaboliza el GTP en GDP y fosfato inorgánico, y luego se une con el dímero $G_{\beta\gamma}$ y por tanto se detiene la activación de la señalización (Cooper, 2002).

Durante la fase aguda de adicción a la morfina, se produce la inhibición de la enzima adenilato ciclasa por activación de la subunidad α de la proteína G ocasionando una disminución en los niveles de AMPc. Por otra parte, las subunidades $\beta\gamma$ promueven el cierre de canales de calcio, sodio y la apertura de los canales de potasio; esto provoca hiperpolarización de la membrana e inhibición de la actividad eléctrica de las neuronas, así como la liberación de neurotransmisores para los cuales se ha especializado la neurona (Nestler, 2004).

Cuando el consumo de morfina es crónico, el efecto descrito anteriormente se revierte, es decir, como mecanismo compensatorio se genera la activación de la enzima adenilato ciclasa, aumentando la síntesis de AMPc, que, a su vez, produce la activación de otras enzimas, como la proteína kinasa A, cuya subunidad catalítica actúa fosforilando factores de transcripción como CREB; aumentando la expresión de varios genes, como los que codifican la tirosina hidroxilasa (enzima clave en la síntesis de catecolaminas como el DOPA (dihidroxifenilalanina) precursor de la dopamina u otros (Purves y col., 2007; Hyman y col., 2006; Nestler, 2004; Nestler y Aghajanian, 1997), (ver figura 3).

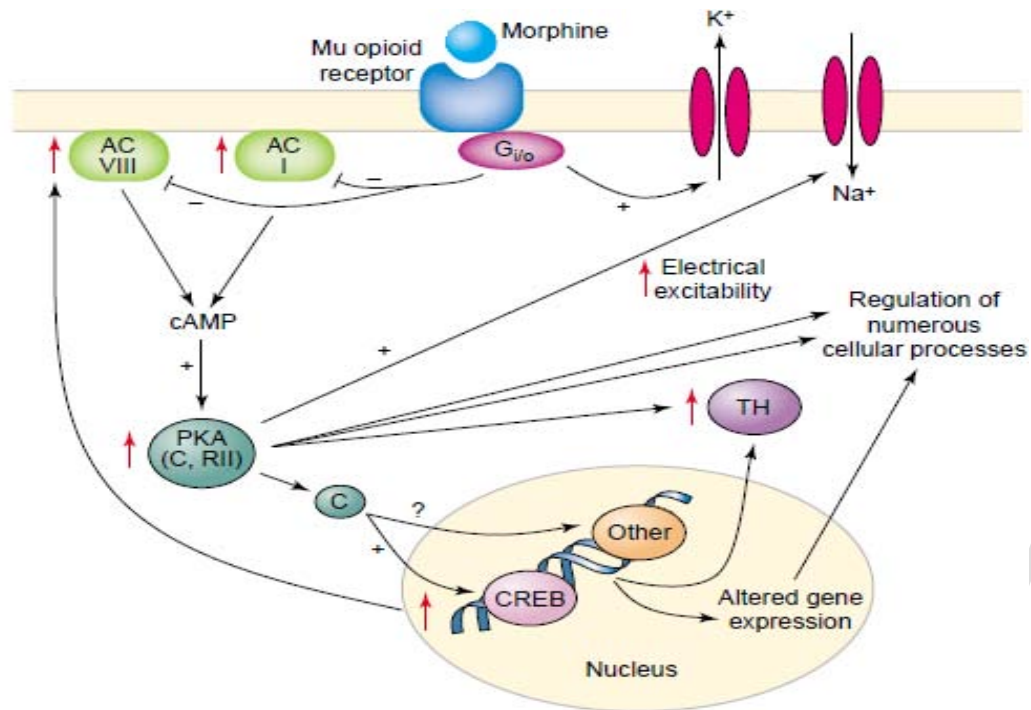


Figura 3. Ilustración esquemática del mecanismo de acción de la morfina. En el esquema se observa la adenilato ciclasa (AC), proteína kinasa A (PKA) y su subunidad catalítica (C), CREB (cAMP response element binding protein) y la tirosina hidroxilasa (TH). Las flechas rojas indican los cambios ocurridos en la fase crónica de consumo. Se ha determinado que el consumo agudo de morfina reduce los niveles de AMPc y la excitabilidad neuronal; por el contrario, en la fase crónica de consumo se incrementan la AC, PKA, CREB y expresión de genes. Estas alteraciones también se producen al inducir la abstinencia en numerosas regiones del cerebro, como locus coeruleus, núcleo accumbens, área tegmental ventral, amígdala u otros, asociándose con la disforia y el síndrome de abstinencia (Nestler, 2004)

Es importante destacar otros procesos que se generan a medida que el consumo de morfina se incrementa, produciéndose adaptaciones celulares que posiblemente provocan la tolerancia a nivel celular o desensibilización. Durante este proceso se produce la fosforilación de los receptores μ -opioides a través de proteínas quinasas; el receptor fosforilado, se desacopla de la proteína G, y se

asocia con otras proteínas denominadas arrestinas que producen su internalización por endocitosis. El receptor puede ser degradado por proteasas o reinsertado a la membrana generando una nueva resensibilización (figura 4) (Nestler, 2001; Pierce y Lefkowitz, 2001; Williams y col., 2013).

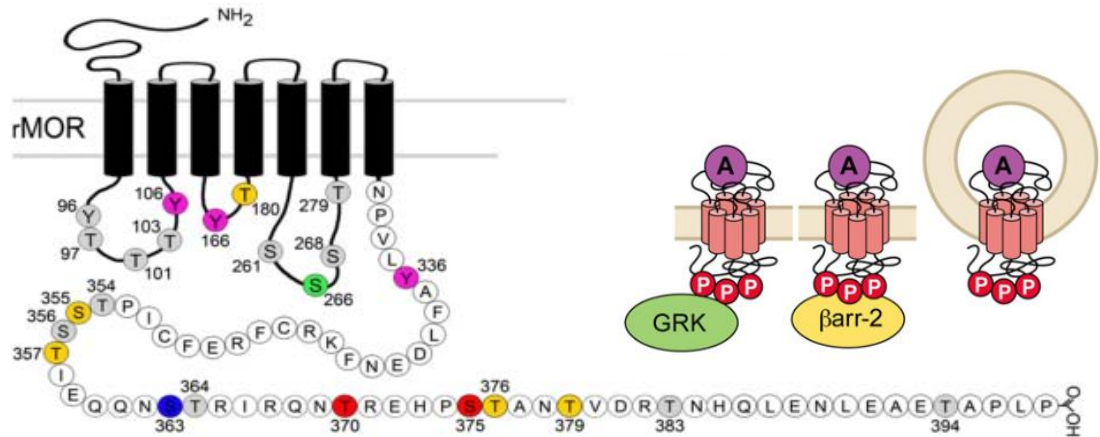


Figura 4. Representación esquemática del receptor μ -opioide. En la figura se muestra los siete dominios transmembranas del receptor y círculos coloreados en la región intracelular, los cuales corresponden con los residuos fosforilados por diversas proteínas quinasas para promover su internalización. Los círculos amarillos (residuos de treonina) indican fosforilación por GRK (quinasa reguladoras de proteínas G), círculos fucsias (residuos de tirosina) por tirosinas quinasas, círculo verde (residuos de serina) por CaMKII (quinasa dependiente de calcio-calmodulina) y círculo azul (serina) por PKC (proteína quinasa C). Del lado izquierdo, obsérvese la representación del proceso de fosforilación por quinasas, unión de β -arrestinas y posterior endocitosis que puede inducirse cuando el consumo de morfina es crónico (Williams y col., 2013).

Para estudiar el síndrome de abstinencia en animales de experimentación, se puede realizar la retirada de la droga luego de un tratamiento crónico, o bien, mediante la aplicación de antagonistas de los receptores a los que se une la droga (Broseta y col., 2002). Cuando se realizan modificaciones en la estructura molecular de la morfina, se originan fármacos como el antagonista naloxona, el cual presenta una fuerte afinidad para los receptores μ -opioides. Dicho antagonista presenta sustituyentes en la posición de nitrógeno y en el carbono 6 (grupo hidroxilo), (ver figura 5), que permiten una mayor interacción con el receptor μ -opioides (Villarejo y col., 2000). Es importante destacar, que dentro de los cambios físicos que se han observado luego de la inducción del síndrome de abstinencia en roedores se encuentran: temblor de cuerpo (“wet dog shakes”), saltos (“jumping”), ptosis (cierre de párpados con lagrimeo), micción (orina frecuente en la caja de experimentación), piloerección, diarrea,

locomoción y/o inmovilidad, postura erguida, aseo de genitales (acicalamiento) y castaño de dientes (“teeth chattering”), entre otros (Broseta y col., 2002).

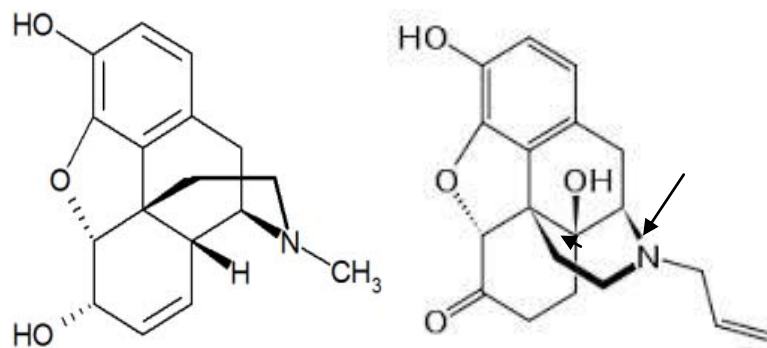


Figura 5. Estructura molecular de la morfina y naloxona. Obsérvese la similitud de las estructuras a excepción de la adición de sustituyentes en la molécula de naloxona; las flechas indican los cambios con respecto a la morfina. (Villarejo y col., 2000).

Agmatina

La agmatina es una molécula novedosa; se le ha atribuido numerosas funciones biológicas resaltando la posibilidad de ser un neurotransmisor o neuromodulador por el hecho de presentar concentraciones similares a los neurotransmisores; es sintetizada en el cerebro, empaqueta en vesículas sinápticas, se libera cuando ocurre una despolarización de la neurona presináptica, alcanzando unirse a diversos receptores en el sistema nervioso central, hasta ser inactivada mediante la catálisis enzimática o ser almacenada mediante recapturas. La agmatina, además de encontrarse en el cerebro también se ha hallado en otros tejidos de mamíferos, plantas y bacterias (Li y col., 1994; Reis y Regunathan, 2000).

Síntesis y metabolismo de la agmatina

La agmatina es una poliamina sintetizada partir de la arginina, mediante la acción de la arginina descarboxilasa (ADC) presente en la membrana mitocondrial en el tejido nervioso. La arginina puede movilizarse al interior neuronal a través de transportadores específicos para aminoácidos catiónicos. Por medio de la enzima agmatina descarboxilasa, la agmatina es hidrolizada a putrescina, un precursor de las poliaminas espermidina y espermina. Por otro lado, la agmatina puede ser oxidada por la diamina oxidasa a γ -guanidinobutiraldehído, que rápidamente se oxida a γ -guanidinobutirato, el cual es rápidamente excretado del interior celular (Reis y Regunathan, 2000)

Además de encontrarse en el interior de la neurona, la agmatina puede almacenarse en astrocitos, en el interior de los sinaptosomas. En el espacio extracelular, tiene la capacidad de unirse a diversos

receptores como los alfa-2 adrenoreceptores, receptores imidazol, antagonizar receptores de glutamato (NMDA), acetilcolina (nACh) y los de serotonina (5-HT₃) (Raasch y col, 2001), (ver Figura 6).

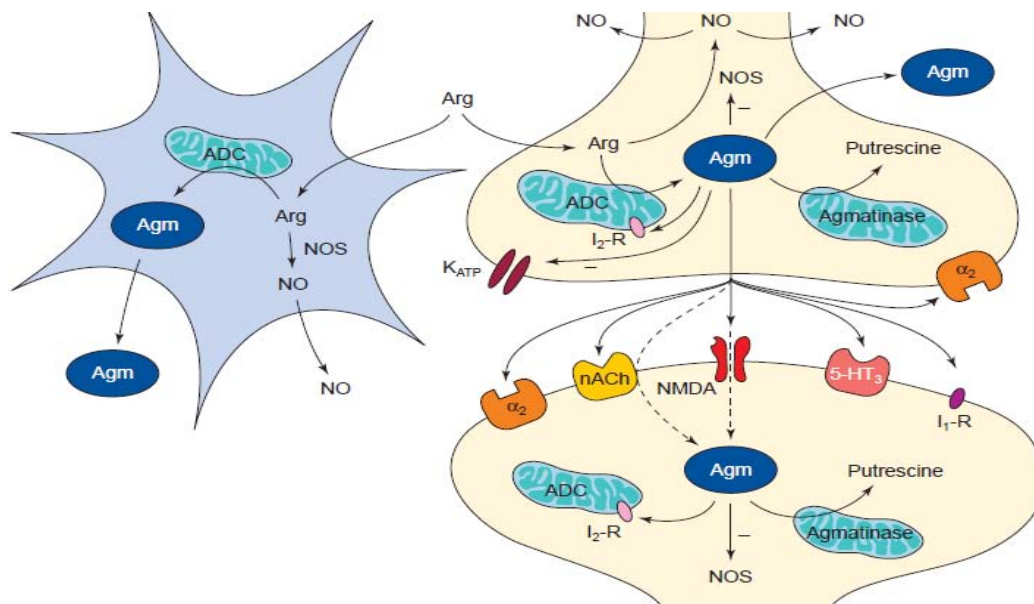


Figura 6. Representación esquemática sobre la unión de agmatina en diversos receptores presentes en la superficie de la neurona postsináptica y síntesis de agmatina a partir de arginina (Reis y Regunathan, 2000).

Funciones biológicas más relevantes de la agmatina

Dentro de las funciones biológicas a las que se le ha asociado, se encuentra la liberación de insulina desde los islotes pancreáticos, liberación de adrenalina y noradrenalina desde las células cromafines y modulación de la actividad de la monoamino oxidasa (MAO) mediante la interacción con los receptores imidazol (Moretti y col., 2014). Se ha asociado con la atenuación de la hiperalgesia mediante la unión con los alfa-2 adrenoreceptores en ratas tratadas con morfina (Regunathan, 2006). Es importante destacar, la función neuroprotectora de la agmatina frenando el efecto neurotóxico y las adaptaciones provocadas por la transmisión glutamatérgica sobre enfermedades como epilepsia y adicción a drogas de abuso (Moretti y col., 2014). Se ha propuesto que la agmatina inhibe el desarrollo y la dependencia, mediante el bloqueo de los canales NMDA sobre los que actúa el glutamato (Wang y col., 2011). Además, se estima que la agmatina podría contrarrestar la adicción a opiáceos actuando específicamente sobre la expresión de AMPc en el tejido neuronal; sin embargo, los mecanismos de acción específicos aún se desconocen (Aricioglu y col., 2004). No existen estudios “*in vivo*” porque solo recientemente se midió los niveles de agmatina que se liberan en los diferentes circuitos cerebrales (Betancourt y col., 2011), razón por la cual es de suma importancia estudiar de que manera está involucrada la agmatina en el proceso de adicción a la morfina.

Glutamato

El glutamato es considerado como el principal neurotransmisor excitatorio y de mayor importancia dentro del sistema nervioso central. Las neuronas en su mayoría son glutamatérgicas y se estima que más del 50% de las sinapsis liberan este neurotransmisor. El glutamato es un aminoácido no esencial que puede atravesar la barrera hematoencefálica desde la circulación sanguínea, aunque la mayor cantidad de glutamato en el cerebro es producido en el interior de las células glías y neuronas presinápticas (Purves y col., 2007).

Metabolismo del glutamato

La síntesis de glutamato puede surgir a partir del α -cetoglutarato en el ciclo de Krebs y por transaminación desde terminaciones nerviosas. El precursor de glutamato en las terminaciones sinápticas es la glutamina; ésta es producida y secretada por las células glías y transportada a las neuronas para luego ser metabolizada a glutamato por la glutaminasa (Forman y col., 2009).

El glutamato es liberado desde vesículas sinápticas por exocitosis dependiente de calcio y se une a receptores específicos en la membrana de la neurona postsináptica. El resto de glutamato del espacio extracelular, pasa a las células gliales a través de transportadores dependiente de sodio con una alta afinidad al glutamato o puede ser recapturado por astrocitos (Forman y col., 2009).

En el interior de las células gliales se encuentra presente la enzima glutamina sintasa que transforma el glutamato en glutamina y a partir de la cual comienza nuevamente el ciclo. Cabe destacar, que la glutamina que se genera en la célula glial también puede entrar al ciclo de Krebs hasta generar α -cetoglutarato, el cual puede penetrar en las neuronas para reponer su consumo (ver figura 7), (Forman y col., 2009).

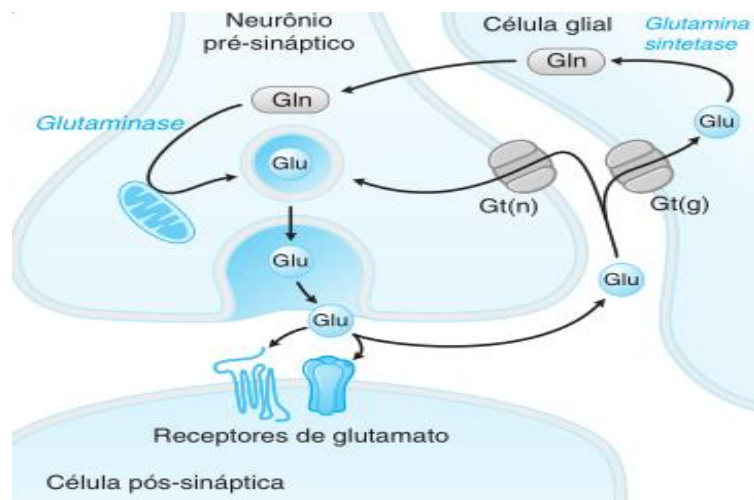


Figura 7. Representación esquemática sobre la síntesis de glutamato. El glutamato obtenido a partir de glutamina es empaquetado y liberado desde la terminación presináptica y se une

en receptores postsinápticos. Las células gliales, a través de los receptores de glutamato, recapturan dicho neurotransmisor hasta metabolizarlo nuevamente en glutamina (Forman y col., 2009).

Receptores glutamatérgicos

Receptores ionotrópicos:

Estos receptores median una respuesta excitatoria rápida. Estan constituidos por cinco subunidades que conforman un canal iónico. Estos canales se abren con la unión del glutamato, provocando un cambio conformacional que permite la entrada de cationes a través de la membrana plasmática (Ruiz y Fuentes, 2008).

Receptores NMDA (N-metil-D aspartato): Tras la unión de glutamato y glicina al receptor, se abre un canal que permite la salida de potasio y la entrada de sodio y calcio. Cuando ocurre la despolarización de la membrana (conjuntamente con la unión de los agonistas al canal como Zinc y glicina), se remueve el catión magnesio que bloquea el canal. Es importante resaltar, que la despolarización en la membrana postsináptica puede ser producida por la acción de varios potenciales de acción postsinápticos o mediante la activación de otros receptores glutamatérgicos como AMPA/Cainato presentes en membranas adyacentes, que permiten la entrada de cationes que producen un aumento en el potencial de membrana (Hardingham y Bading, 2003; Forman y col., 2009).

Receptores AMPA (ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil- 4-isoxazol propiônico): La unión de glutamato a este receptor provoca la entrada de sodio o calcio permitiendo la despolarización de la neurona postsináptica (Forman y col., 2009).

Receptores cainato: Al igual que los receptores AMPA, median la excitación rápida; estos receptores permiten el flujo de sodio o calcio al interior de la neurona postsináptica y salida de potasio a través del canal, el cual se activa e inactiva rápidamente (Forman y col., 2009).

Receptores metabotrópicos de glutamato (mGluR):

Se diferencian de los receptores ionotrópicos, en que no permiten la entrada de iones a través de canales iónicos, y que median su acción a través de una cascada de señalización dependiente de la activación de proteínas G heterotriméricas y segundos mensajeros intracelulares. Los receptores mGluR constan de siete dominios transmembrana cuya región intracelular está ligado a la proteína G. Estos receptores se clasifican en tres grupos: El grupo I incluye los receptores mGlu1 y mGlu5, los

cuales estimulan la actividad de la fosfolipasa C. La vía de señalización fosfolipasa C-Inositol bifosfato activada por estos receptores, promueve la liberación de Ca^{2+} del retículo endoplasmático. El grupo II (mGlu2 y mGlu3) y el grupo III (mGlu 4,6,7,8,) están acoplados a la proteína G con subunidad α_i inhibiendo la actividad de la proteína adenilato ciclasa (enzima que cataliza la formación de AMPc), (Forman y col., 2009).

Sistema glutamatérgico en el desarrollo de la tolerancia y dependencia generado por la morfina

La liberación de dopamina provocada por drogas como la morfina pudiera estar mediada por el neurotransmisor glutamato, el cual excita las neuronas dopaminérgicas del ATV facilitando la liberación de la dopamina hacia el accumbens (Chen y col., 2015). Tanto la tolerancia, dependencia y la aparición del síndrome de abstinencia se relacionó con cambios en la neurotransmisión de glutamato y aspartato. En ratas sometidas a tratamientos agudo y crónico con morfina, los niveles de estos neurotransmisores en el accumbens fueron alterados (Sepúlveda y col., 1997). Asimismo, la administración intravenosa de heroína tuvo la capacidad de aumentar los niveles de glutamato en el pálido ventral; sin embargo, no se conoce con exactitud la función de tal incremento (Caillé y Parsons, 2004).

Otros trabajos hallaron que repetidas dosis de morfina aumentaba la expresión de diferentes subunidades de receptores ionotrópicos en diferentes regiones cerebrales como el núcleo accumbens (Wang y col., 2011). Por otra parte, cuando se bloquearon los receptores NMDA en ratas tratadas con morfina mediante antagonistas como MK801, se produjo una atenuación del síndrome de abstinencia (Trujillo, 1991) sugiriendo la posibilidad que la morfina produzca cambios en el sistema glutamatérgico asociándose con la dependencia y el síndrome de abstinencia.

Es importante destacar, que la mayoría de estudios han explorado cómo las diferentes drogas (cocaína, cannabis, alcohol, nicotina, heroína, morfina, entre otros) alteran la neurotransmisión glutamatérgica, principalmente en el núcleo accumbens; desconociéndose el efecto específico de la morfina sobre los niveles de glutamato en el pálido ventral de ratas tratadas con morfina, así como también, los cambios ocurridos cuando se induce la abstinencia (con el antagonista naloxona); haciéndose necesario explorar el efecto de diferentes drogas como la morfina sobre dicha neurotransmisión en otros núcleos cerebrales que se han asociado con la adicción, como el pálido ventral.

Acido y -aminobutírico (GABA).

El ácido γ -aminobutírico (GABA) es el principal neurotransmisor inhibitorio del sistema nervioso central, tiene la capacidad de disminuir la excitabilidad neuronal mediante su unión a diversos receptores presentes en los astrocitos y neuronas distribuidas en los circuitos cerebrales; aproximadamente el 30% de las sinapsis en el encéfalo y medula espinal son GABAérgicas, por tanto, es el neurotransmisor inhibitorio de mayor importancia (Ruiz y col., 2008). Se ha hecho énfasis que el reforzamiento opiáceo pudiera depender de una inhibición en la liberación de GABA hacia regiones asociadas con la adicción, como por ejemplo el área tegmental ventral (Xi y Stein, 1998).

Metabolismo de GABA.

La síntesis de GABA esta mediada por la enzima glutamato descarboxilasa (GAD) que cataliza la descarboxilación de glutamato. Una vez empaquetado en vesículas, es liberado desde terminales presinápticas. En el espacio extracelular, este neurotransmisor se une a sus receptores o puede ser recaptado por neuronas o células glías, a través de transportadores específicos de GABA (GAT), donde posteriormente es inactivado por la GABA transaminasa (GABA-T) produciendo semialdehído succinato, que sirve de sustrato a la semialdehído succinato deshidrogenasa (SSADH), generando ácido succínico que es incorporado al ciclo de Krebs para obtener glutamato (Brambilla y col., 2003).

Receptores de GABA

Existen dos tipos de receptores de GABA: receptores ionotrópicos GABA_A y GABA_C, son proteínas de membranas con múltiples subunidades que abren canales de anión cloruro. Los receptores metabotrópicos GABA_B son receptores acoplados a proteínas G heterotriméricas que ejercen su función mediante la formación de segundos mensajeros intracelulares.

Receptores ionotrópicos GABA_A y GABA_C:

Estos receptores son glicoproteínas de membranas, están formados por cinco subunidades, cada una de ellas presenta cuatro dominios que atraviesan la membrana; la subunidades se distribuyen alrededor de un poro central y selectivo para el ion cloro (Barnard y col., 1998).

El receptor GABA_A y GABA_C se encuentran ubicado en las neuronas postsinápticas, y al interactuar con GABA u otros agonistas, sufren un cambio conformacional que abren el canal y aumenta la conductancia al cloruro ocasionando una inhibición rápida del potencial postsináptico. Además de GABA, estos receptores presentan otros sitios de unión para ligandos como muscimol (agonista), bicuculina (antagonista), benzodiazepinas, barbitúricos, neuropéptidos, etanol y anestésicos (Barnard y col., 1998; Forman y col., 2009).

Receptor metabotrópico GABA_B:

Consiste en un receptor acoplado a una proteína G inhibitoria. Cuando GABA se une al receptor, la subunidad α de la proteína G inhibe a la adenilato ciclasa produciéndose una reducción en los niveles de AMPc, mientras que las subunidades $\beta\gamma$ varia su acción dependiendo de la ubicación del receptor. Si este se encuentra localizado en la neurona presináptica, las subunidades inhiben los canales de calcio produciéndose la disminución en la entrada del ion a la célula y la reducción en la liberación de los neurotransmisores desde las vesículas sinápticas; mientras que la activación de los receptores a nivel postsinápticos hiperpolariza la membrana por la salida de potasio (Kaupman y col., 2001).

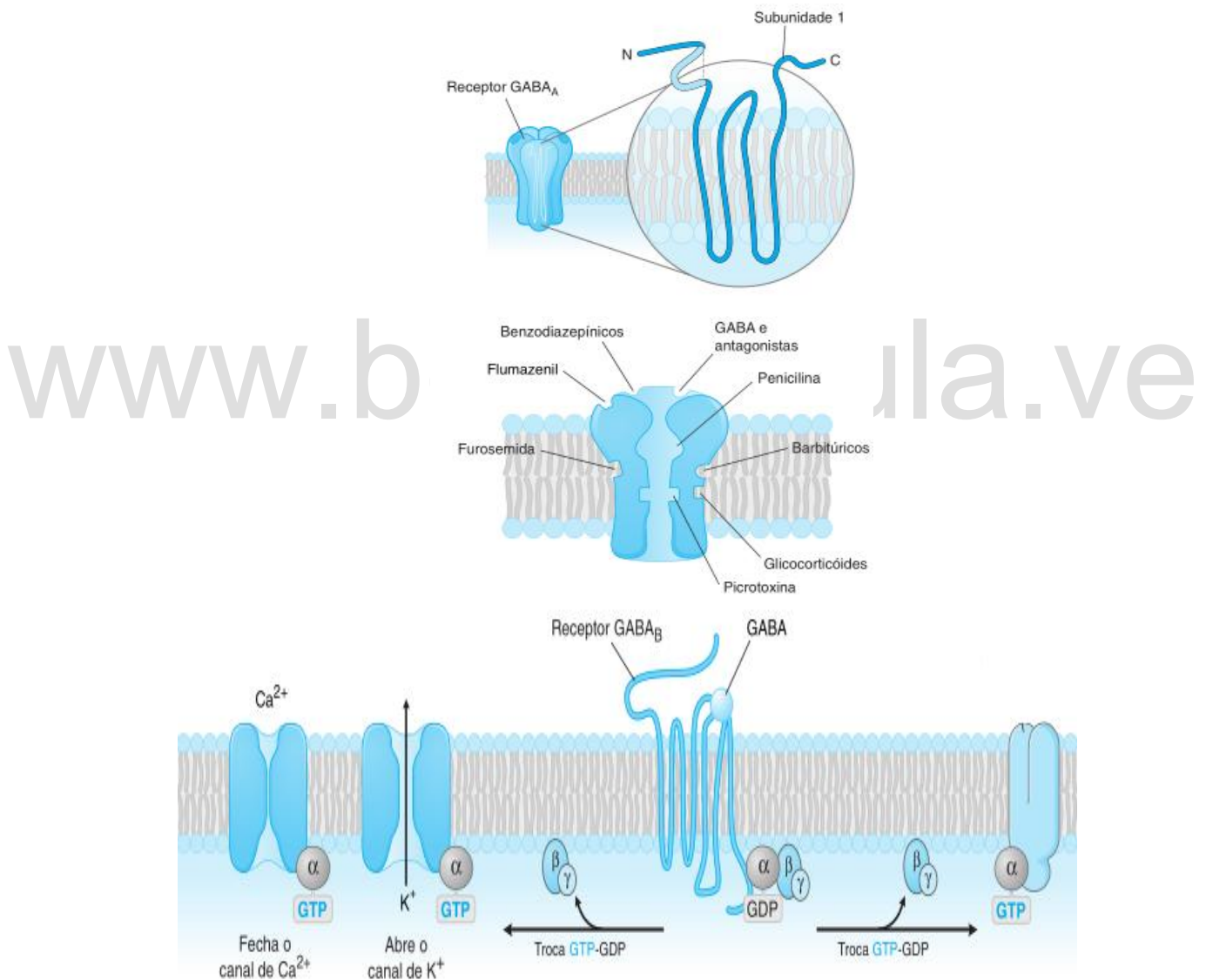


Figura 8. Representación esquemática de los receptores GABAérgicos. En la figura de la izquierda, se muestran los cuatro dominios de una subunidad atravesando la membrana y los diferentes agonistas del receptor ionotrópico GABA_A. En la derecha; obsérvese la señalización del

receptor GABAB, mostrándose la subunidad $\beta\gamma$ de la proteína G cerrando canales de calcio y abriendo canales de potasio, mientras que la subunidad α actúa sobre la enzima adenilato ciclasa (Forman y col., 2009).

GABA y su asociación con la adicción a opiáceos

Las drogas de abuso, tienen la capacidad de alterar la neurotransmisión GABAérgica; por ejemplo, la heroína y la morfina, al unirse sobre receptores μ -opioide en interneuronas GABAérgicas que proyectan hacia el area tegmental ventral, provocan una desinhibición de este núcleo cerebral, y por lo tanto, se produce un aumento de la transmisión de dopamina hacia el núcleo accumbens (Xi y col., 1998). Un efecto similar se ha observado en las interneuronas GABAérgicas del núcleo accumbens, en donde opiáceos, disminuyen las frecuencias de disparo de estas neuronas (neurona espinosa media), y por lo tanto se genera un descenso de la neurotransmisión GABAérgicas, por estas neuronas (Caille y col., 2004). Por otra parte, se ha asociado que aumento en los niveles de GABA en regiones cerebrales involucradas con la adicción, bloquea el consumo de heroína mediante la acción de los receptores GABA_B, estos resultados enfatizan, que posibles aumentos en los niveles de GABA podría estar correlacionado con la supresión de los efectos reforzantes de las drogas; mientras que, una reducción en la transmisión GABAérgica se asociaría con los efectos placenteros que inducen las mismas (Xi y Stein, 2000). Aunque se ha determinado como varían los niveles de GABA en el pálido ventral por drogas opiáceas como la heroína, no se han realizados trabajos que determinen si la morfina genera un efecto similar en dicho núcleo, por lo cual, es necesario determinar el posible efecto de dicha droga y la aplicación del antagonista naloxona sobre el sistema GABAérgico en el pálido ventral.

Microdiálisis intracerebral

La microdiálisis intracerebral consiste en la monitorización "*in vivo*" del líquido extracelular del cerebro; permite la toma de muestras continuas, hasta la administración de fármacos en animales con casi libre movimiento e incluso en personas para el estudio de enfermedades cerebrales (Lange y col., 1997; Revuelto y col., 2011)

La técnica está basada en la difusión de moléculas entre dos compartimientos separados por una membrana semipermeable. Un compartimiento corresponde al líquido cefalorraquídeo artificial y el otro al líquido intersticial del núcleo cerebral, de modo que, cuando la solución artificial alcanza la membrana donde ocurre la diálisis, se genera la difusión de moléculas por la diferencia química entre los compartimientos (Hernández y col., 1983). Las muestras o dializados obtenidos son recolectados para su posterior separación por electroforesis capilar y subsecuente identificación y cuantificación.

Electroforesis capilar

La electroforesis capilar es una de las técnicas más utilizadas en diferentes áreas de investigación por su alta versatilidad, ya que permite la separación de diferentes moléculas como iones, aminoácidos, péptidos, proteínas, ácidos nucleicos, fármacos u otros compuestos (Kostal, 2008). Esta técnica presenta diferentes ventajas como una alta sensibilidad, empleo de un volumen mínimo de la muestra, corto tiempo de separación y el uso de capilares con diámetros pequeños que permite la disipación de calor generado por la corriente eléctrica, que contribuyen con una óptima separación de los componentes en una muestra (Chopin, 2012).

La electroforesis capilar de zona es una de las modalidades más empleadas, la cual permite separar moléculas eléctricamente cargadas. Las muestras diluidas en un capilar lleno de una solución amortiguadora o buffer, pueden separarse cuando se aplica un campo eléctrico; los aniones y cationes se moverán hacia el electrodo correspondiente, separándose en diferentes zonas dependiendo de dos fuerzas: la fuerza electrosmótica y la fuerza electroforética. La primera, hace que todas las moléculas fluyan en un solo sentido hacia el electrodo negativo (cátodo) a causa del movimiento de cationes presentes en la superficie interna del capilar; mientras que la fuerza electroforética hacen que la moléculas migren según su carga eléctrica (ver figura 8), (Dalhoeven, 1995).

Las moléculas cargadas como agmatina y glutamato han sido separadas utilizando la electroforesis capilar de zona (Betancourt, 2012; Hernández, 1993), mientras que en el caso de GABA, al ser un aminoácido eléctricamente neutro o zwitterion, requiere una modificación de dicha técnica. La separación de éste neurotransmisor se logra agregando detergentes iónicos, como dodecil sulfato de sodio (SDS), al buffer de corrida, hasta generarse la formación de micelas (que interactúan con las moléculas) su carga negativa hacen que estas migren en contra de la fuerza electrosmótica que las impulsa hacia el electrodo negativo, induciendo la formación de una fase pseudo-estacionaria; entonces, la separación ocurre según el coeficiente de partición entre la fase móvil y la fase pseudo-estacionaria (figura 9). Esta técnica de separación se denomina como cromatografía electrocinética micelar (MECK, siglas del inglés que significan *Micellar Electrokinetic Chromatography*), (Terabe, 1989; Rada, 1999).

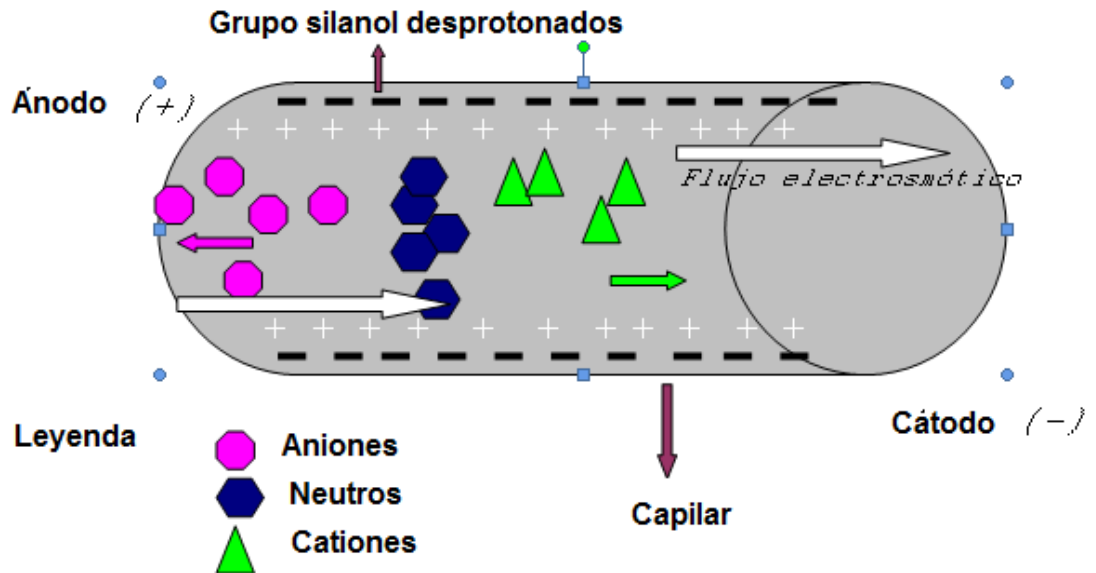


Figura 9. Electroforesis capilar de Zona (figura obtenidas de Skirzewski, 2005). Representación de moléculas con cargas negativas, positivas y neutras en el interior de un capilar bajo la fuerza electrosmótica significativamente mayor que la fuerza electroforética haciendo que la migración de las moléculas sean hacia el cátodo

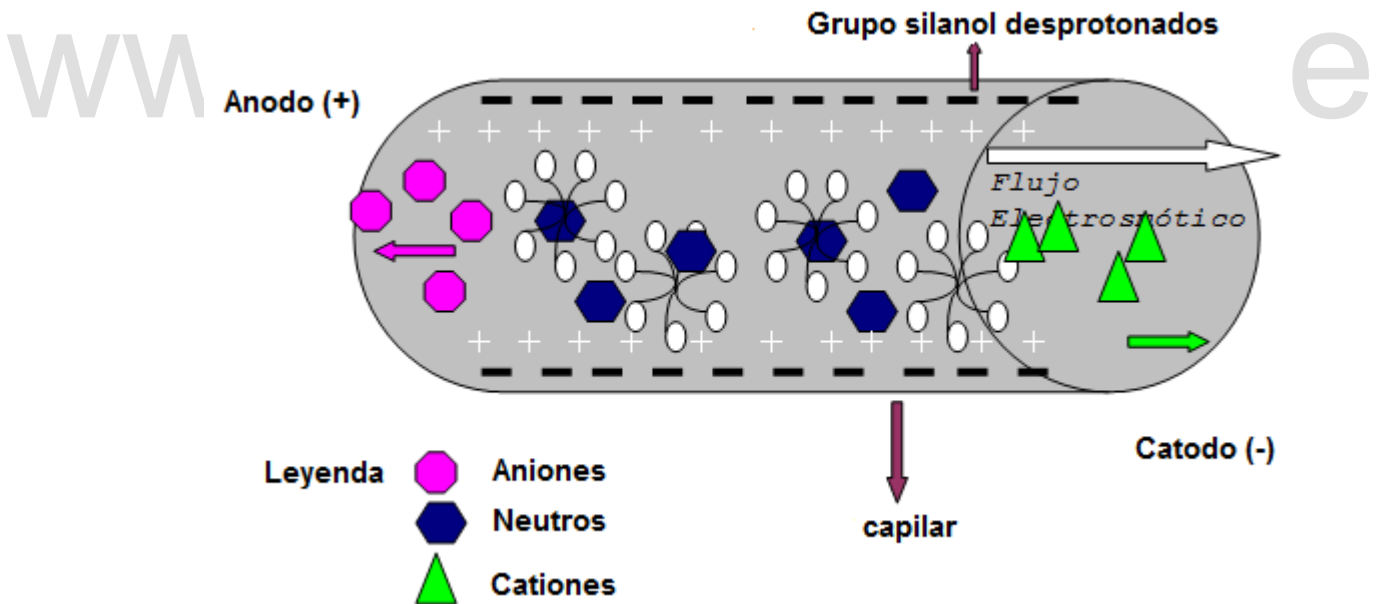


Figura 10. Representación de una cromatografía electrocinética micelar (figura obtenidas de Skirzewski, 2005). Las moléculas neutras migran conjuntamente con las micelas formadas a partir del detergente en el buffer de corrida, cuyas cargas negativas contrarrestan la fuerza electrosmótica formándose, por tanto, una fase pseudoestacionaria que migra según su coeficiente de partición.

Hipótesis

Tratamientos con morfina disminuyen los niveles de glutamato y acetilcolina en el núcleo accumbens de ratas (Rada y col., 1991; Sepúlveda y col., 1997). Debido a que estos neurotransmisores estimulan la liberación de GABA desde la neurona espinosa media hacia el pálido ventral, se esperaría, que en los tratamientos con morfina se reduzcan los niveles de GABA (en dicha región) en comparación con el tratamiento control y con naloxona.

Si los agonistas de los receptores μ -opioides como DAMGO (D-Ala-N-MePhe-Gly-ol) aumenta la neurotransmisión glutamatérgica desde la amígdala y núcleo accumbens hacia el pálido ventral (Napier y Mitrovic, 1999), entonces, se esperaría que tratamientos con morfina también incrementen los niveles de glutamato en el pálido ventral contrariamente a los tratamientos controles o después de la inyección con el antagonista naloxona.

Dado que la morfina reduce los niveles de enzimas asociadas a la biosíntesis de agmatina en el cerebro de ratas (Aricioglu y col., 2002), se esperaría, que las inyecciones aguda y/o crónicas de morfina reduzcan los niveles de la amina; contrariamente a los tratamientos controles y con naloxona en los dializados obtenidos desde el pálido ventral de ratas.

www.bdigital.ula.ve

Objetivos generales

- ✓ Determinar las variaciones del tratamiento agudo y crónico con morfina sobre los niveles extracelulares de agmatina, glutamato y ácido γ -aminobutírico (GABA) en el pálido ventral de ratas.
- ✓ Determinar el efecto del antagonista naloxona sobre los niveles de agmatina, glutamato y ácido γ -aminobutírico (GABA) en el pálido ventral de ratas”.

Objetivos específicos

- ✓ Fabricar cánulas guías y de microdiálisis
- ✓ Implantar bilateralmente cánulas guía en el pálido ventral de ratas mediante cirugía estereotáxica.
- ✓ Aplicar inyecciones intraperitoneales de los tratamientos agudo y crónico con morfina.
- ✓ Aplicar inyecciones intraperitoneales del antagonista naloxona para inducir el síndrome de abstinencia
- ✓ Recolectar muestras de microdiálisis intracerebral antes y después de las inyecciones de morfina o naloxona.
- ✓ Conjugar las muestras obtenidas en microdializadas del pálido ventral con isotiocianato de fluoresceína (FITC).
- ✓ Cuantificar las concentraciones de agmatina, glutamato y GABA mediante la técnica de electroforesis capilar en zona y detección de fluorescencia inducida por láser (CZE) y la cromatografía electrocinética micelar (MEKC).
- ✓ Realizar cortes histológicos con la finalidad de verificar la correcta implantación de las cánulas guías sobre el pálido ventral.

Justificación del problema

La adicción constituye uno de los problemas que genera un gran impacto social a nivel mundial. Es importante destacar, que los opioides conjuntamente con el cannabis, son las sustancias de abuso cuyo consumo se ha incrementado durante los últimos años. La heroína y otros opioides de uso médico, son las principales drogas implicadas en los fallecimientos debido a las sobredosis fatales que pueden causar. La morfina es un fármaco utilizado a nivel mundial por su capacidad analgésica para tratar enfermedades como el cáncer, procedimientos quirúrgicos u otros; sin embargo, no está exenta de que su uso se realice con fines recreativos, los individuos son altamente vulnerables al abuso por sus capacidades placenteras, de sedación y bienestar que conducen rápidamente a la dependencia. Por lo general, la heroína presenta una mayor demanda que la morfina en los adictos; no obstante, esta última es usada para la manufactura de heroína o bien cuando hay baja disponibilidad de este opiáceo aumenta el consumo de fármacos con propósitos médicos (lícitos) también obtenidos del opio (UNODC, 2014).

Sin duda alguna, el consumo de drogas influye negativamente sobre la sociedad y la calidad de vida de los individuos; resaltando sobre todo la alteración en los circuitos cerebrales haciendo que estos no puedan retornar a su funcionamiento normal, como por ejemplo aquellos asociados con la recompensa, la motivación, el aprendizaje y la memoria. Por ello, es necesario conocer con mayor profundidad los diferentes mecanismos neurobiológicos que se producen durante el proceso de adicción para contrarrestar los efectos nocivos que el consumo acarrea como tolerancia, dependencia y abstinencia.

El determinar las variaciones de diferentes neurotransmisores como agmatina, GABA y glutamato en el pálido ventral de ratas permitiría ahondar el estudio acerca del mecanismo de acción de las drogas de abuso y, aportarían posibles bases a futuras investigaciones como aquellas asociadas con el uso de fármacos que pudieran regular las alteraciones de dichos neurotransmisores durante el proceso de adicción; con la finalidad de restablecer la función normal del cerebro, prevenir las recaídas y disminuir el deseo de consumir las drogas.

Materiales y métodos

Material biológico

Se utilizaron ratas machos de la cepa Sprague-Dawley, con pesos comprendidos entre los 280 y 320 (± 1) g. Estos animales fueron adquiridos en el Bioterio de la Universidad de los Andes (BIOULA) y mantenidos en jaulas individuales con agua y comida *ad libitum*. La habitación en la que fueron alojadas se mantuvo con períodos de luz-oscuridad de 12 horas/12 horas.

Reactivos.

- ✓ Ketamina HCl 50 mg/ml (Ketaset®. Fort Dodge Animal Health, USA)
- ✓ Xilacina (Seton 2% ® Laboratorios CALIER S.A.)
- ✓ Iodopolivinilpirrolidona al 10% (Betadine® Laboratorios Farma, S.A.)
- ✓ Acrílico autopolimerizante polvo (NovaCryl. Urident, C.A; Venezuela.)
- ✓ Acrílico autopolimerizante líquido (NovaCryl. Urident, C.A; Venezuela.)
- ✓ Cloruro de sodio, NaCl (Merck)
- ✓ Cloruro de potasio, KCl (Sigma)
- ✓ Cloruro de calcio, CaCl₂ (Sigma)
- ✓ Cloruro de magnesio, MgCl₂ (Merck)
- ✓ Peróxido de hidrogeno 3% p/v (Alcoholes Valencia, C.A; Venezuela)
- ✓ Cloroformo (Baker Analyzer, Mexico)
- ✓ Formaldehido (IQE, S.A; España)
- ✓ Carbonato de Sodio (Merck, Germany)
- ✓ Bicarbonato de Sodio (Sigma chemical C.A; USA)
- ✓ Hidróxido de Sodio (Baker Analyzer, USA)
- ✓ Acetona (Fluka, Switzerland)
- ✓ Isotiocianato de fluoresceína (FITC isómero I) (Sigma Aldrich, Germany)
- ✓ Acido γ -aminobutírico (Sigma Chemical Co., USA)
- ✓ Acido L-glutámico (Sigma Chemical Co., USA)
- ✓ Agmatina (Sigma Chemical Co., USA)
- ✓ Dodecilsulfato de sodio (Sigma chemical C.A; USA)
- ✓ Borato de Sodio hexahidratado (Merck, Germany)
- ✓ Acetonitrilo (Baker Analyzed, USA).

Soluciones

Solución Ringer modificada: 136 mM NaCl, 3,7 mM KCl, 1,2 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 10 mM NaHCO₃ pH 7,4.

Solución de formaldehído al 4% v/v.

Solución de cloruro de sodio al 0,9% p/v.

Buffer Carbonato: NaCO₃ 20mM, NaHCO₃ 20mM, pH 9,0.

Buffer Borato- SDS: 55mM de borato de sodio, 120mM de dodecilsulfato de sodio, acetonitrilo al 2% v/v.

Solución de NaOH 1M.

Solución Derivatizante: 1,28x10⁻³ M de FITC en acetona y buffer carbonato 20 mM pH 9,0 (1:1).

Solución estándar de Agmatina: 4,38x10⁻³ M de agmatina en buffer carbonato 20 mM y 5 µL de solución derivatizante.

Solución estándar de GABA: 9,70x10⁻³ M de GABA en buffer carbonato 20 mM y 5 µL de solución derivatizante.

Solución estándar de Glutamato: 6,78x10⁻³ M de glutamato en buffer carbonato 20 mM y 5 µL de solución derivatizante.

Equipos

- ✓ Instrumento estereotáxico para animales pequeños.
- ✓ Bomba de perfusión sp210iw Syringe pump (WPI).
- ✓ Cámara de microdiálisis con unión giratoria Swivel (fabricado en el Laboratorio de Fisiología de la Conducta).
- ✓ Bomba de perfusión.
- ✓ Guillotina para animales pequeños (Whamann MFG, C.O; USA).

- ✓ Cámara de sacrificio por anestesia con vapores de cloroformo.
- ✓ Aparato de Electroforesis capilar acoplado a detección por fluorescencia inducida por un láser de ion Argón a 488nm (modelo R2D2, Meridiálisis, Venezuela).
- ✓ Balanza analítica BP211D (0,01mg).
- ✓ pHmetro.
- ✓ Plancha electromagnética.
- ✓ Vibratomo.
- ✓ Centrífuga micro-capillares modelo MB (Intenc. Equip. Co., Boston, USA).
- ✓ Plancha electromagnética modelo SP47235 (Barnstead/Thermolyne, Iowa,USA).
- ✓ Sistema de generación de vacío (CM Sorensen Co., Inc., USA).
- ✓ Sistema generador de agua ultrapura Milli-Q Plus 18MΩ (Millipore S.A., Molsheim, Francia)

Material para cirugía y otros

- ✓ Bisturí.
- ✓ Pinzas hemostáticas
- ✓ Guantes de cirugía.
- ✓ Algodón.
- ✓ Tornillos de joyero de 1mm de diámetro.
- ✓ Destornillador.
- ✓ Legra ósea.
- ✓ Trepanador.
- ✓ Jeringas de 3 ml.
- ✓ Jeringas de insulina de 1 ml.
- ✓ Tubos de polietileno: PE-10, PE-20, PE-50, PE-60.
- ✓ Capilar sellado en un extremo para recolección de muestras dializadas en las ratas
- ✓ Cánulas:

Cánulas Guías: Se realizaron con tubos de acero inoxidable de 21ga y 10mm de largo, los cuales presentaron un punto con estaño a 4mm a partir de un extremo (con la finalidad de sujetar la cánula guía al cemento acrílico a modo de inmovilizarla en el cráneo del animal). Para prevenir la entrada de contaminantes al cerebro, se fabricaron tapas o estiles que son insertados a través de la cánula guía (ver figura 10). Estos son de acero inoxidable y constan de dos tubos: un tubo de 21ga de

5mm en cuyo interior se acopla otro tubo de 26ga de 16mm; una vez insertado en el interior de la cánula guía, el estilete deben sobresalir 1mm de la misma.

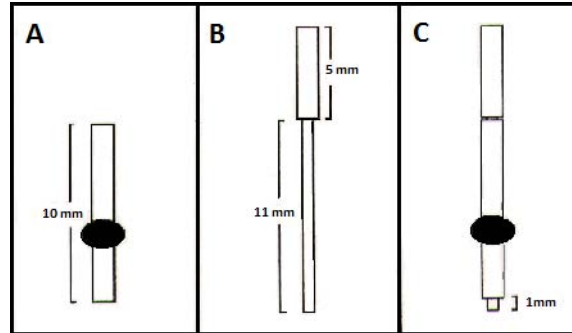


Figura 11. Dibujo esquemático acerca de los tamaños de la cánula guía y estilete. A) Punto negro hace referencia a la soldadura estaño en la cánula guía B) Estilete C) Estile insertado en la cánula guía, evitando la obstrucción de ésta. Fuente?

Cánula de microdiálisis: Estas cánulas se fabricaron con capilares de sílica fundida (el cual atraviesa el interior de cánula), y tubos de acero inoxidable dispuestos de la siguiente manera: la primera tubería constituye la entrada de la cánula que conecta con el sistema de perfusión, presenta un calibre de 29ga insertado en el interior de un segundo tubo de 21ga. Desde la mitad interna del mismo, se encuentra conectado otro tubo de 26ga en cuyo extremo posee una membrana de celulosa de 2mm de largo donde ocurre la diálisis; permitiendo el paso de moléculas con un peso molecular menor a los 6000 daltons (Hernandez y col., 1983; Hernandez y col., 1986). Por el extremo que sobresale del capilar de sílica fundida, se realiza la recolección de muestras. La cánula de microdiálisis se conecta con el sistema de perfusión a través de un tubo de polietileno 10 (PE-10) y se mantiene fija a la cánula guía mediante un trozo de PE-50 para evitar el desplazamiento de la sonda de microdiálisis de la cánula guía (para mayor comprensión ver figura 12).

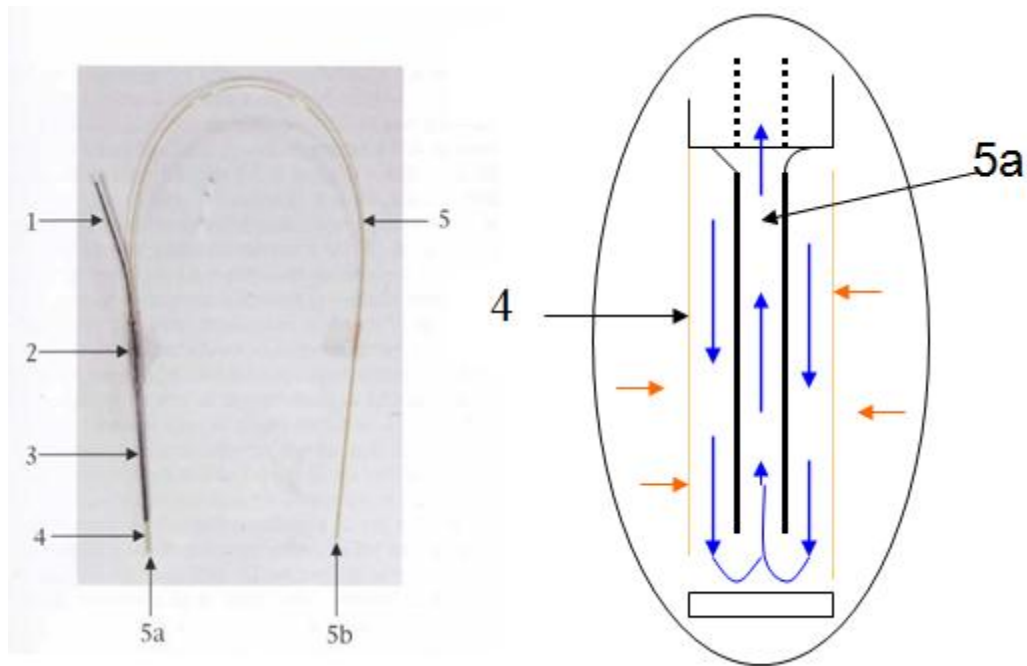


Figura 12. Ilustración esquemática de la cánula de microdiálisis intracerebral. 1. Zona por donde ingresa la solución Ringer artificial a través del tubo de 29ga. 2. Tubo de acero de 21ga. 3. Tubo de acero inoxidable de 26 ga. 4. Membrana semipermeable de celulosa. 5. 5a. Capilar de sílice. 5b. Región donde se recolecta la muestra a través de capilar de sílice.

Implantación de la cánula guía:

Las ratas fueron anestesiadas con una combinación de ketamina (50mg/kg) y xilacina (10mg/kg) inyectadas intraperitonealmente; luego se depiló la parte superior de la cabeza y se fijó el animal al aparato estereotáxico. Antes de la implantación de la cánula guía, se realizó una incisión con el bisturí en sentido antero-posterior de la cabeza del animal hasta exponer el cráneo, luego se verificó la nivelación entre el bregma (cisura craneal fronto-parietal) y lambda (cisura craneal parieto-occipital) (Ver figura 13). Seguidamente se realizaron cuatro perforaciones en el cráneo mediante el trepanador, para insertar cuatro tornillos con la finalidad de fijar la corona de policrilato al cráneo. Por último, se colocó estereotáxicamente dos cánulas guías apuntando cada una hacia el pálido ventral, siguiendo las siguientes coordenadas de acuerdo al atlas de Paxinos y Watson (1997): 0,0 mm antero-posterior (AP; tomando como referencia en 0, la intersección de las suturas sagital y coronal conocida como Bregma); 2,2 mm lateral (L) a la línea media y 5,0 mm de profundidad ó ventral (V) con respecto a la superficie del cráneo. Finalmente, se cubrió el cráneo con cemento acrílico; una vez fraguado se colocó una coronilla realizada con el mismo material con el fin de proteger la cánula guía ya bloqueada con el estilete (descrito anteriormente). Finiquitada la cirugía, se retiró el animal del aparato estereotáxico, dejándolo recuperar por un periodo mínimo de ocho días previos a la realización de la microdiálisis.

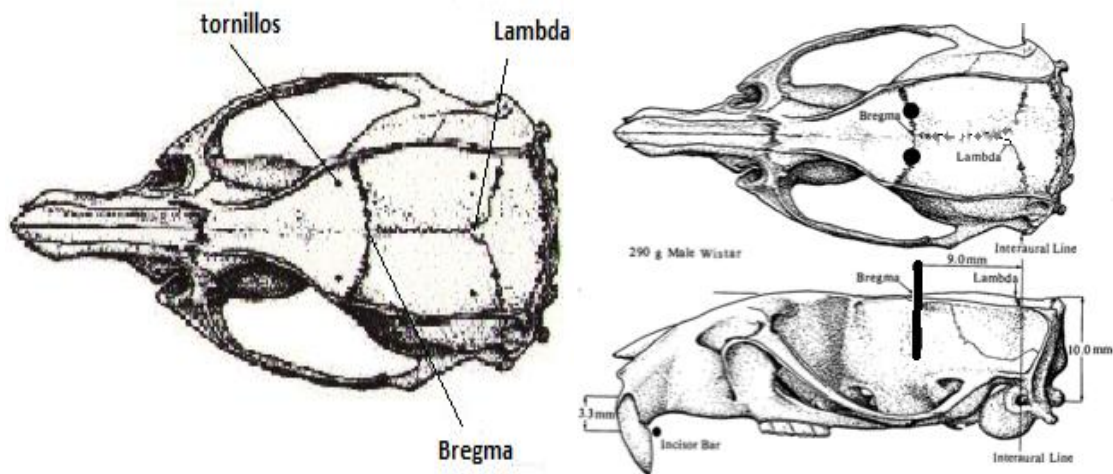


Figura 13. A) Señalización de las suturas sagitales lambda y Bregma y ubicación aproximada de los tornillos en la superficie del cráneo B) Ilustración de la ubicación de las cánulas guías sobre el cráneo de las ratas.

Sesiones de microdiálisis intracerebral

Las cánulas de microdiálisis fueron conectadas a una bomba de perfusión, la cual envía una solución de líquido cefalorraquídeo artificial o solución ringer modificada a un flujo de $1\mu\text{l}/\text{min}$. Las muestras fueron tomadas usando capilares de hematocritos sellados por un extremo.

Se trabajaron con dos grupos de animales, en las mismas condiciones de ensayo, durante un periodo de ocho días: Un grupo control (sin acceso a la morfina) y un grupo experimental (tratado con morfina).

El grupo control recibió inyecciones intraperitoneales de solución salina 0,9% v/v, 1mL/kg (vehículo), 2 veces al día, durante siete días, y en el día octavo, una sola inyección de naloxona (5 mg/kg).

El grupo experimental recibió inyecciones intraperitoneales de morfina (disuelta en vehículo), 2 veces al día y en dosis progresivamente mayores, durante el transcurso del ensayo:

1. El primer y segundo día, la dosis aplicadas fueron de 10 mg/kg.
2. El tercer y cuarto día, la dosis aplicadas fueron de 20 mg/kg.
3. Durante el quinto, sexto y séptimo día de tratamiento, las dosis aplicadas fueron de 30 mg/kg.

4. En el octavo día, se aplicó una sola inyección de naloxano 5 mg/Kg.

La toma de muestras se realizó cada dos minutos, de la siguiente manera:

1. Recolección de 3 muestras basales (antes de la inyección de solución salina o morfina).
2. Recolección de 7 muestras inmediatamente después de la inyección de solución salina o morfina.
3. Recolección de 3 muestras (30 min después de la última recolección).
4. Recolección de 3 muestras (60 min después de la última recolección).

Se realizaron tres sesiones de microdiálisis que corresponden al primer, séptimo y octavo día de tratamiento. Es importante señalar que, en el primer día de experimento, la cánula de microdiálisis fue insertada en una de las cánulas guía (cánula guía ipsilateral), mientras que en el séptimo día de diálisis, la sonda se insertó en la cánula guía contralateral, para evitar la reinscripción de la cánula en la misma zona del tejido. Finalmente, durante el octavo día de tratamiento, los animales fueron mantenidos en la caja de diálisis conectada al sistema de perfusión desde el séptimo día de tratamiento. Una vez finalizada la microdiálisis intracerebral, los animales fueron retornados a sus jaulas.

Derivatización de las muestras:

La derivatización de las soluciones patrones de GABA, glutamato, agmatina y de cada una de las muestras, consistió en un proceso de conjugación química con el isotiocianato de fluoresceína (FITC). El proceso de conjugación de los componentes de las muestras, se realizó al mezclar 2 μ L de solución derivatizante con 2 μ L de muestras colectadas, requiriendo de al menos 24 horas de incubación a temperatura ambiente y en completa oscuridad. Finalmente, las muestras se guardaron a -20°C hasta el momento de realizar las corridas electroforéticas, tapadas y en cámara húmeda para ralentizar la evaporación de solvente.

Electroforesis Capilar acoplada a un sistema de detección por fluorescencia inducida por láser

El aparato de electroforesis capilar está equipado con un láser de ion argón que emite un rayo de luz de 488 nm. Este rayo es reflejado mediante un espejo dicróico centrado en 510 nm. El láser incide sobre la ventana de un capilar a través de un objetivo de 0.85 NA. La ventana donde incide el rayo láser se realizó quemando la cubierta externa de poliamida del capilar de sílica, que presenta una longitud aproximada de 64 cm, diámetro interno de 25 μ m, y diámetro externo de 346 μ m. La fluorescencia

emitida por las moléculas es captada y conducida hacia un tubo foto-multiplicador una vez que la misma atraviesa un sistema de filtros.

La inyección de las muestras se realizó desde el extremo anódico del capilar mediante una inyección hidrodinámica a través del aparato aplicando una presión de 10 p.s.i y 0,5 s de inyección; seguidamente el capilar se sumergió en el reservorio con el buffer respectivo. Al finalizar las corridas electroforéticas, el capilar se lavó con 6min NaOH/ 5min H₂O/ 5 min buffer borato o carbonato para mantener acondicionada la pared del capilar y su permeabilidad.

Con la finalidad de determinar el tiempo de retención aproximado de cada neurotransmisor, se realizó la corrida de estándares de agmatina, glutamato y GABA (conjugado de cada molécula con el FITC). Para determinar con precisión el pico de interés, procediendo a la realización de "spiking" (mezcla entre la muestra con la solución estándar del analito). Luego de la corrida electroforética, se obtuvo un pico de mayor altura que corresponde al neurotransmisor de interés, el cual debería presentar una ubicación y/o tiempo de retención similar a un pico de menor tamaño presente en la muestra (los parámetros establecidos en las corridas se resumen en la figura 14). Para medir glutamato y agmatina se utilizó la variante de electroforesis capilar en zona y para la separación de GABA se empleó la cromatografía electrocinética micelar.

Es importante resaltar, que basándonos en trabajos previos donde determinaron las condiciones óptimas para la separación de moléculas neutras como GABA en dializados cerebrales mediante la técnica de electroforesis capilar, empleamos inicialmente como buffer de corrida 23mM de Borato, 120mM SDS, 1% de ACN, pH 9,25 (Rada y col., 1999). Sin embargo, tales condiciones fueron modificadas por la difícil separación del analito, debido al cambio de equipo de electroforesis capilar utilizado al inicio de las corridas electroforéticas. Las condiciones evaluadas fueron las siguientes:

pH óptimo de la fase móvil: se evaluaron diferentes medidas de pH entre las que se encontraron 10,25 11,25 y 12,25. No se observó la separación del analito de interés; por el contrario, aumento el tiempo de resolución y la intensidad de la corriente a medida que se incrementaba el pH del medio. En base a lo obtenido, se conservó el pH del buffer de corrida inicial (9,25)

Concentración de disolvente: se probaron tres concentraciones diferentes de acetonitrilo, siendo esta de 1%, 1,5% y 2%. Ningunas de las concentraciones evaluadas logro la separación del analito. En contraste; se utilizo metanol como disolvente químico empleando las mismas concentraciones del disolvente anterior. Al no observarse cambios relevantes en la separación del pico de interés empleando metanol, no se alteró la concentración ni el tipo de disolvente en la solución.

Concentración de SDS: se ensayaron las diferentes concentraciones de SDS 110mM, 123mM, 125mM, 130mM y 140mM de SDS; no se obtuvo la separación del pico de interés a pesar de observarse

una buena resolución de los picos en las corridas electroforéticas. De acuerdo a lo obtenido, no se modifico la concentración del surfactante

Concentración de Borato: se empleó una mayor concentración de borato conforme al protocolo realizado por Páez y colaboradores (2000), donde usaron 34mM de borato. A pesar de observarse la separación de algunos picos, no correspondieron con el pico de interés, razón por la cual se aumento aún más la concentración de borato desde 40mM hasta 60mM (realizando aumentos cada 5mM). Se observó una mejor separación de los picos a medida que se incrementaban las concentraciones y con ello un mayor tiempo de resolución de los picos. A partir de la concentración de 50mM de borato, se logró una separación “parcial” de un pico correspondiente a GABA; sin embargo, se obtuvo una mejor separación utilizando una concentración de 55mM de borato.

Es importante destacar, que se modificó un parámetro a la vez, manteniendo constante el resto de las condiciones fisicoquímicas de la solución. Por otro lado, la determinación de los parámetros de la fase móvil se realizó de forma cualitativa a través de la observación de la separación de GABA utilizando como mínimo cuatro muestras por cada condición a evaluar. Para determinar la posible separación de GABA se realizaron los spiking requeridos por cada condición. Finalmente se compararon los resultados dentro de cada parámetro evaluado.

Parámetros electroforéticos	Buffer carbonato	Buffer borato
Analito a detectar	Agmatina- Glutamato	GABA
Composición y pH del buffer	Carbonato y bicarbonato de sodio pH 9,5	Borato de sodio, SDS, acetonitrilo ph 9,45
Tiempo de corrida	15	20
Ganancia	1	1
Diferencia de potencial a través del capilar (kV)	21	29
Resolución (1-500) ms	2	2
Voltage del fotomultiplicador (1-1000) V	500	500
Intensidad mínima	0	0
Parametros del capilar		
Diámetro interno/externo (µm)		25/346
Longitud (cm)		50-64

Figura 14. Parámetros del capilar y electroforéticos establecidos en las corridas electroforéticas.

Procesamiento de datos y análisis estadístico

Para determinar las variaciones en los niveles de agmatina, glutamato y GABA en el pálido ventral de ratas en las diferentes fases de tratamientos, se midió la altura de los picos de cada neurotransmisor obtenidos de las corridas electroforéticas de cada muestra. A partir de cada valor medido (como unidades de fluorescencia), se procedió a calcular el porcentaje de normalización de la siguiente manera:

$$\% \text{ Normalizado} = (A/B). 100$$

Donde:

A= tamaño del pico de neurotransmisor de interés.

B= promedio de los tamaños de los picos de los neurotransmisores en las muestras basales.

Con respecto a los cambios en las concentraciones basales de los neurotransmisores en los diferentes grupos experimentales y durante cada tratamiento, se tomó en cuenta el tamaño del estándar y su concentración.

$$X = C.B/A$$

Donde:

A= tamaño del pico estándar.

B= concentración del estándar.

C= tamaño del pico del neurotransmisor en la muestra.

X= concentración del neurotransmisor en la muestra.

Las variaciones en los niveles de neurotransmisores en los grupos experimentales y en las diferentes fases de tratamiento fueron examinados con un ANOVA de dos vías con medidas repetidas, seguido de comparaciones múltiples con el test de Bonferroni. Los resultados obtenidos al comparar las concentraciones basales de los neurotransmisores en los diferentes experimentos se evaluaron mediante el ANOVA de una vía con medidas repetidas y comparaciones múltiples con el test de Bonferroni. Debido a que los datos no cumplían con algunos supuestos para la aplicación de la estadística paramétrica, se procedió a un proceso de transformación de los datos obtenidos, con la finalidad de que estos se mostrasen en una nueva escala de relaciones y corregir el cumplimiento de los supuestos para la aplicación del ANOVA en ambos casos.

Histología

Con la finalidad de verificar un correcto posicionamiento de la cánula en el pálido ventral, se realizaron cortes histológicos utilizando un vibrátomo, donde se obtuvieron cortes coronales; previamente

las ratas fueron sacrificadas al colocarlas en una cámara con un exceso de cloroformo, luego se perfundieron intracardíacamente con solución salina 0,9% (p/v), y luego con formaldehído al 4% v/v. Finalmente se decapitaron para extraer el cerebro del cráneo, los mismos se mantuvieron en formaldehído al 4% por 8 días para garantizar la fijación del tejido. Con la ayuda del atlas de Paxinos y Watson (1997), se logró determinar la ubicación de la sonda, tomando como punto de referencia la comisura blanca anterior (Ver figura 15).

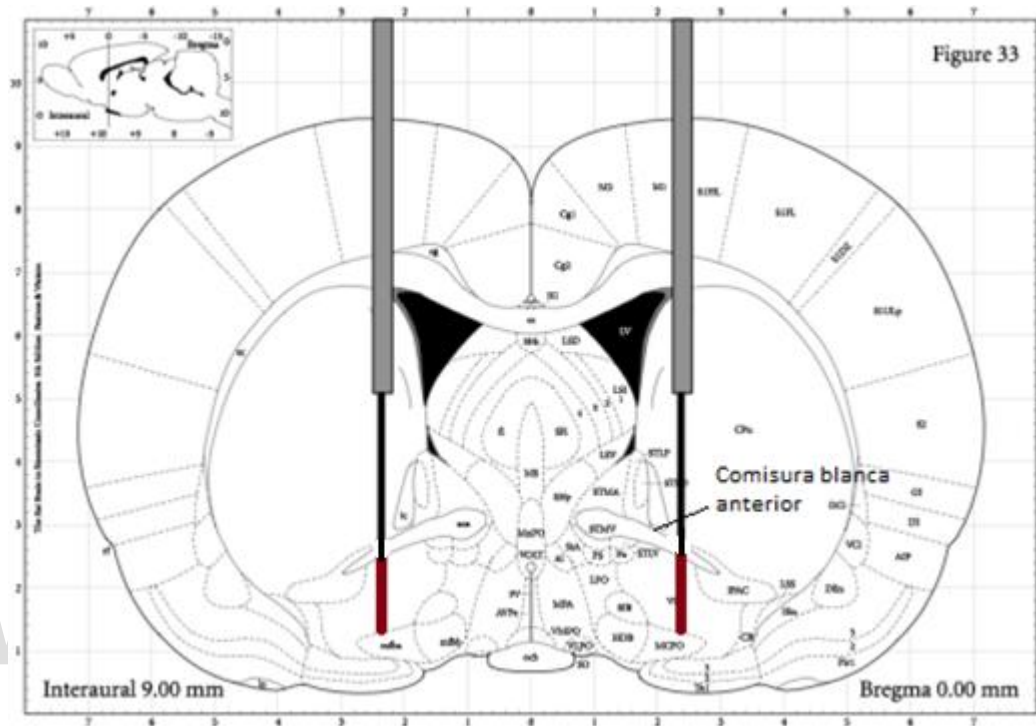


Figura 15. Imagen del corte coronal en Bregma 0,0 del atlas de Paxinos y Watson (1997). Posicionamiento de las cánulas sobre el pálido ventral atravesando la comisura blanca anterior.

Resultados

Niveles de agmatina en el pálido ventral de ratas durante el primer día de tratamiento con morfina (fase aguda)

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el porcentaje normalizado de agmatina del grupo experimental, al contrastarse con el grupo control. Obsérvese en el gráfico 1, una disminución en los niveles de agmatina luego de la inyección del vehículo, sin embargo, el cambio no fue significativo.

Niveles de agmatina en el pálido ventral de ratas durante el séptimo día de tratamiento con morfina (fase crónica)

No se observaron cambios estadísticamente significativos en el porcentaje normalizado de agmatina durante la fase crónica de tratamiento con morfina. En el gráfico 2, se observa un destacado incremento en los minutos 8 ($151,65 \pm 65,12$) % y 14 ($180,65 \pm 91,89$) % en las ratas tratadas con morfina (n=9) con respecto a el grupo control (n=6).

Niveles de agmatina en el pálido ventral de ratas en el octavo día de tratamiento con naloxona

Se hallaron cambios estadísticamente significativos al determinar el efecto del antagonista naloxona sobre los niveles de agmatina en las ratas previamente tratadas con morfina, específicamente en el minuto 50 ($173,35 \pm 65,12$) % ($F(1, 207) = 5,05$ $p = 0,02$ $n=15$). Es importante destacar, que hasta el minuto 54 ($128,22 \pm 24,44$) % se mantuvo un ligero ascenso en comparación con el grupo control; dicho cambio no arrojó significancia (ver gráfico 3).

Concentraciones basales de agmatina en el pálido ventral en los diferentes días de tratamientos con morfina

Se encontró un cambio significativo en la concentración basal de agmatina en el octavo día de tratamiento (previo a la inyección del antagonista naloxona ($F(1,7) = 45,84$ $p = 0,04$) al contrastarse con el grupo control. En el gráfico 4, se puede observar, que al comparar el grupo control con el primer y séptimo día de tratamiento con morfina, no se encontraron cambios significativos. Sin embargo, se apreció una tendencia a disminuir en las concentraciones.

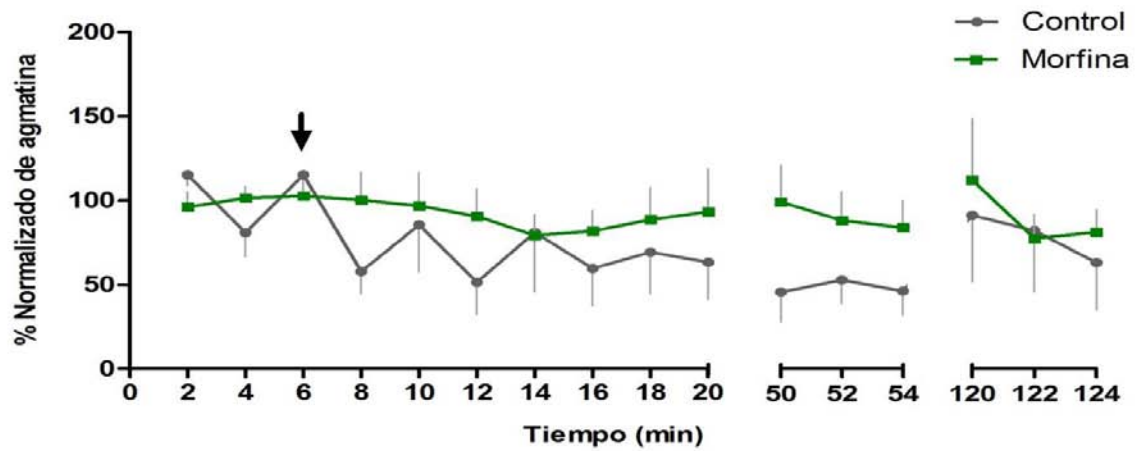


Gráfico 1. Porcentaje normalizado de agmatina durante el tratamiento agudo con morfina. La flecha negra indica el momento de inyección de morfina o solución salina en el grupo experimental (n=9) y control (n=6), respectivamente.

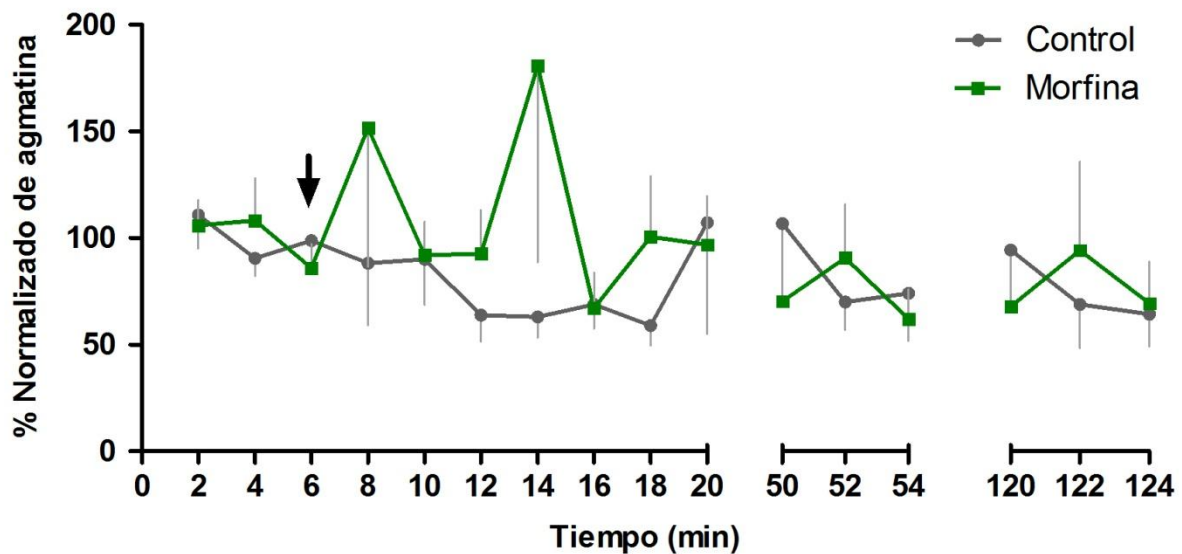


Gráfico 2. Porcentaje normalizado de agmatina durante el séptimo día de tratamiento con morfina (fase crónica). La flecha negra indica el momento de inyección de morfina o solución salina en el grupo experimental (n=9) y control (n=6).

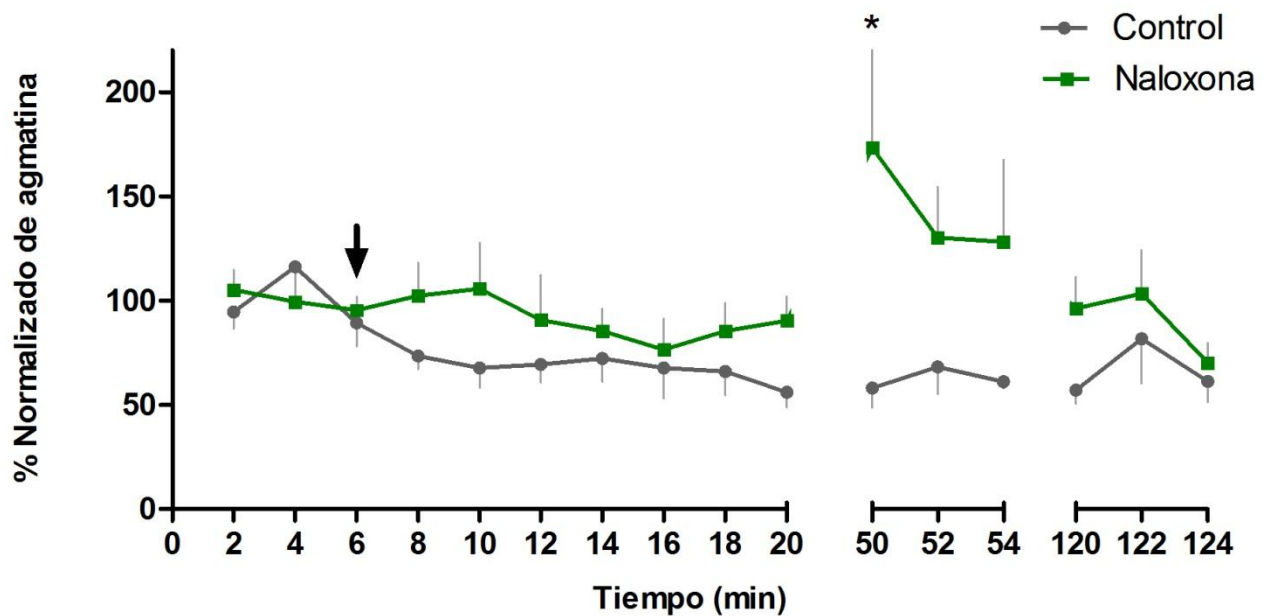


Gráfico 3. Porcentaje normalizado de agmatina durante el octavo día de tratamiento con naloxona (inducción de abstinencia). Obsérvese el aumento en el porcentaje normalizado de agmatina en el grupo experimental (n=9) a partir del minuto 50; en comparación al grupo control (n=6). La flecha negra indica el momento de inyección del antagonista naloxona.

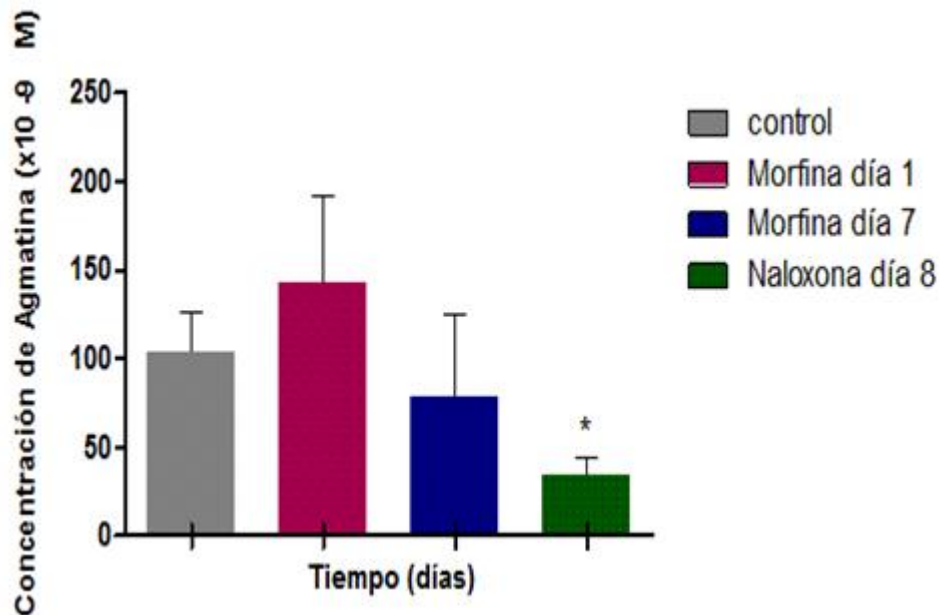


Gráfico 4. Valores absolutos de agmatina en las muestras basales en el primer, séptimo y octavo día de tratamientos con morfina. Obsérvese la notoria diferencia entre las concentraciones del grupo control (104,09 ± 22,48) nM y el primer día de tratamiento con morfina (control interno) (142,72 ± 49,35) nM. Por otro lado, en el séptimo (78,34 ± 47,02) nM y octavo día de tratamiento (34,74 ± 8,22) nM se

destaca una disminución en las concentraciones basales de agmatina en comparación con el grupo control.

Niveles de glutamato en el pálido ventral de ratas durante el primer día de tratamiento con morfina (fase aguda)

Se hallaron diferencias estadísticamente significativas al comparar el porcentaje normalizado de glutamato en el grupo experimental (n=8) al compararse con el grupo control (n=6); encontrándose un aumento a partir del minutos 50 ($189,26 \pm 33,34$) % (F (1,176)= 13,40 p=0,00), 54 ($167,54 \pm 32,79$) % (F(1, 176)=6,24 p=0,01) hasta los minutos 120 ($198,06 \pm 25,03$)% (F(1,176)= 14,34 p=0,00), 122 ($202,07 \pm 29,12$)% (F (1,176)= 12,13 p=0,00), y 124 ($174,08 \pm 21,10$) % (F (1,176)= 13,107 P=0,00) (ver grafico 5).

Niveles de glutamato en el pálido ventral de ratas durante el séptimo día de tratamiento con morfina (fase crónica)

El porcentaje normalizado de glutamato durante el séptimo día de tratamiento con morfina no arrojó cambios estadísticamente significativos; a pesar de observarse un incremento del neurotransmisor luego de la inyección con morfina durante el minuto 8 ($166,88 \pm 48,60$ %) (ver gráfico 6).

Niveles de glutamato en el pálido ventral de ratas durante la inducción de la abstinencia en el octavo día de tratamiento con naloxona

Se observaron cambios estadísticamente significativos en el porcentaje normalizado de glutamato al inducir la abstinencia en el grupo experimental (n=8) en comparación con el grupo control (n=6). Luego de la inyección con el antagonista, se observaron oscilaciones con tendencia a incrementar, produciéndose cambios significativos a partir del minuto 20 ($166,48 \pm 40,22$)% (F(1,176)=6,06 p= 0,01) manteniendo la misma tendencia en los minutos 50 ($163,26 \pm 40,22$)% (F(1,176)=5,52 p= 0,02), 52 ($208,37 \pm 59,55$)% (F(1,176)=6,75 p= 0,01), hasta los minutos 120 ($160,97 \pm 34,03$)% (F(1,176)=4,814p= 0,03) y 122 ($201,03 \pm 52,53$)% (F(1,176)=5,49 p= 0,02), a pesar del gran error estándar registrado.

Concentraciones basales de glutamato en el pálido ventral de ratas en los diferentes días de tratamientos con morfina

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas al comparar las concentraciones basales de glutamato en los diferentes tratamientos. Nótese en el gráfico 8, que el grupo control presentó una concentración ligeramente mayor ($3,44 \pm 7,81$) μM que las concentraciones basales del séptimo ($2,33 \pm 7,47$) μM u octavo día de tratamiento ($2,37 \pm 4,71$) μM .

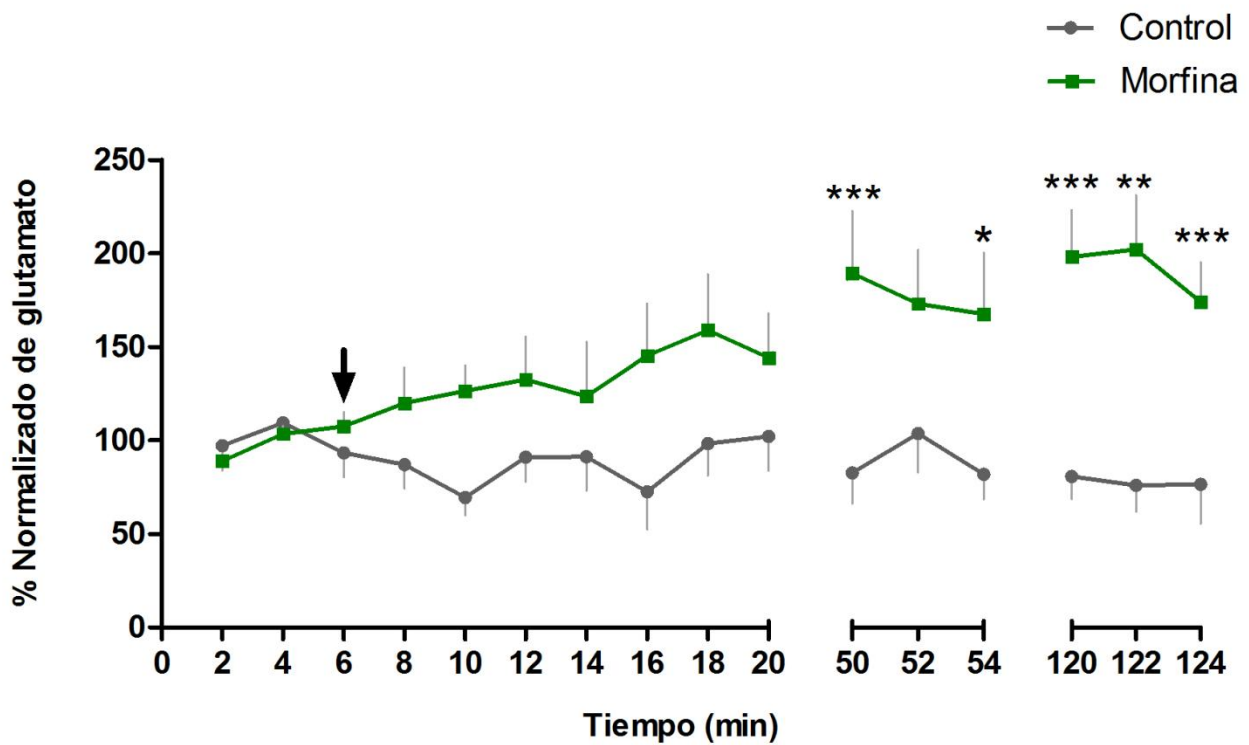


Gráfico 5. Porcentaje normalizado de glutamato durante el primer día de tratamiento con morfina (fase aguda). La flecha negra indica el momento de inyección de morfina o solución salina en el grupo experimental (n=8 y control (n=6).

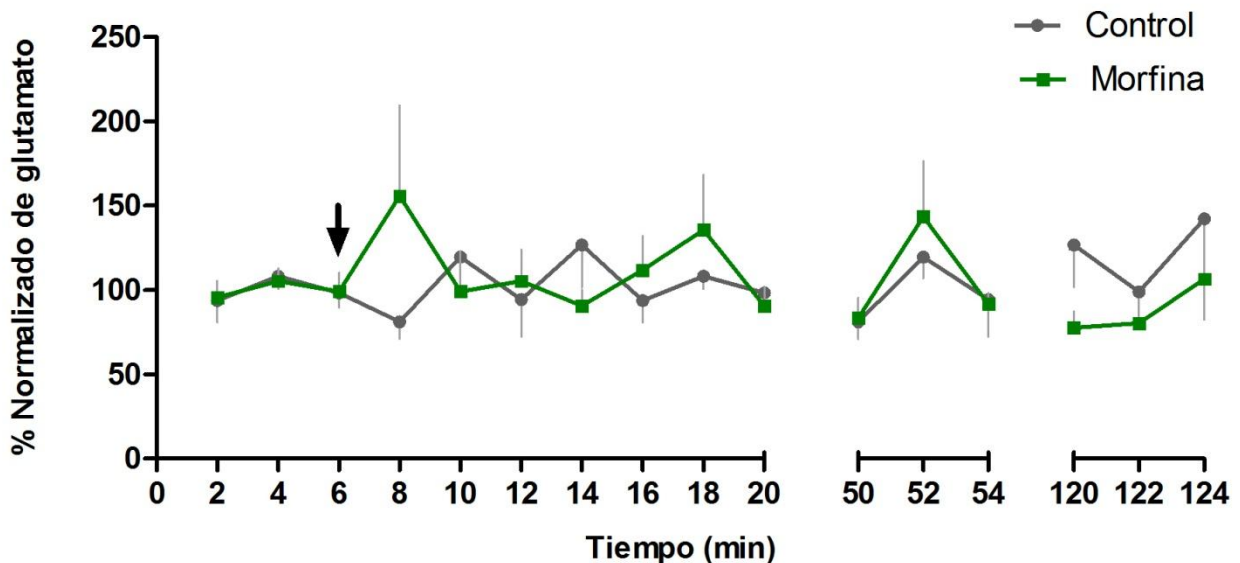


Gráfico 6. Porcentaje normalizado de glutamato durante el séptimo día de tratamiento con morfina (fase crónica). Apréciase la tendencia inalteradas luego de la inyección de morfina (indicada por la flecha negra) en el grupo experimental (n=8) al contrastarse con el grupo control (n=6).

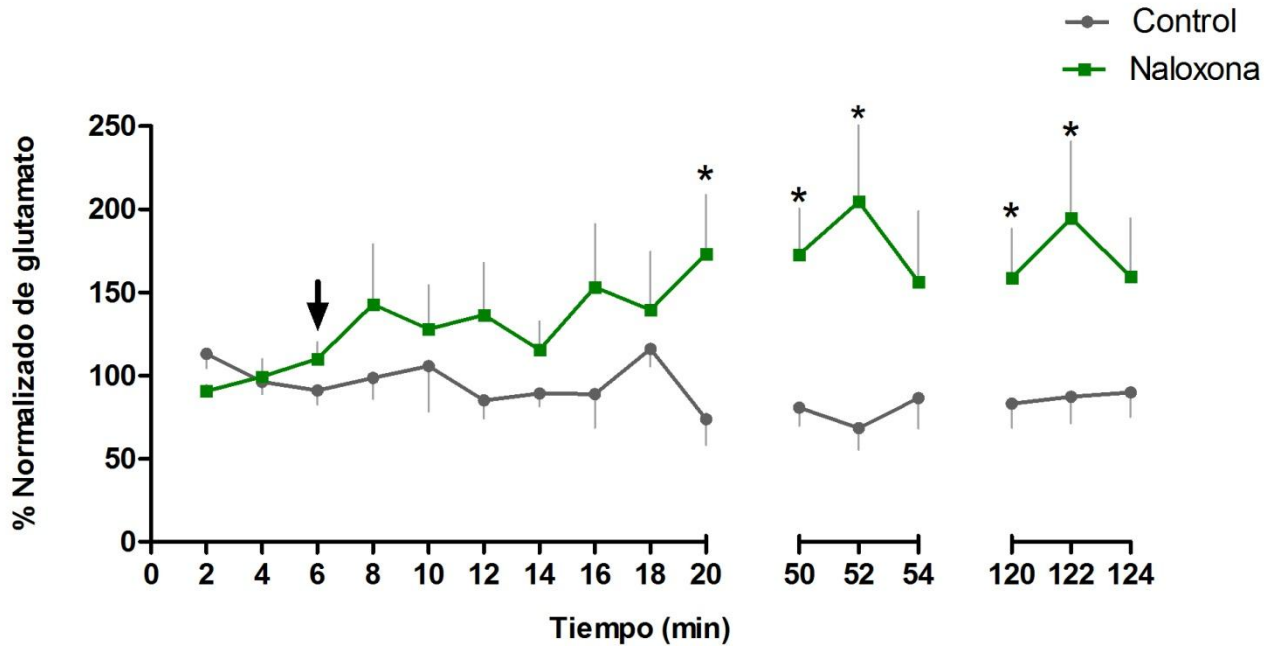


Gráfico 7. Porcentaje normalizado de glutamato durante el octavo día de tratamiento con naloxona (inducción de abstinencia). Nótese que luego de la inyección del antagonista (indicada por la flecha negra), los niveles de glutamato muestra una tendencia ascendente, de forma similar a la fase aguda de tratamiento con morfina (ver grafica 5).

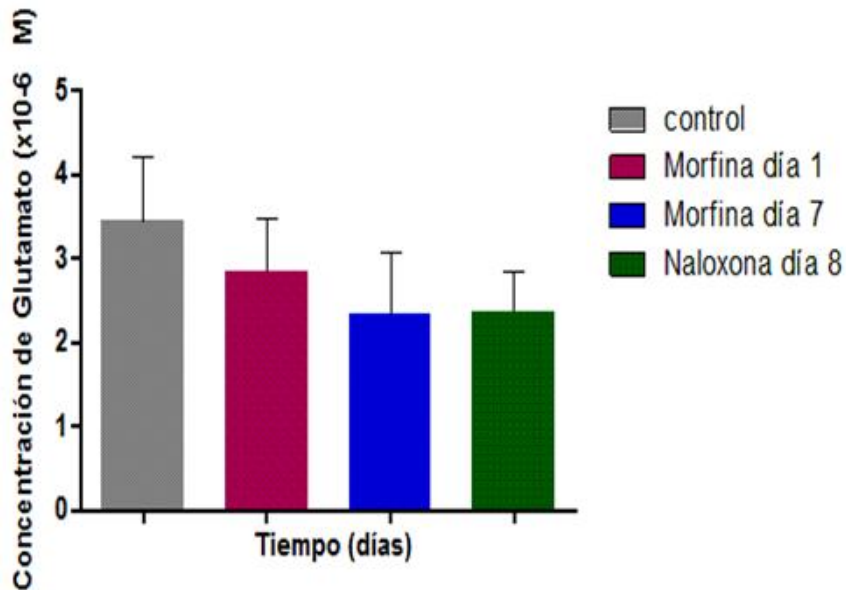


Gráfico 8. Valores absolutos de glutamato en los diferentes días de tratamiento con morfina y el grupo control.

Niveles de GABA en el pálido ventral de ratas durante el primer día de tratamiento con morfina (fase aguda)

Luego de inyectar la primera dosis de morfina correspondiendo con la fase aguda de tratamiento, el porcentaje normalizado de GABA se mantuvo cercano a los valores basales; no obstante, a partir del minuto 16 ($52,66 \pm 15,42$) % ($F(1, 160)= 6,07$ $p= 0,01$) se genera un descenso conservando la misma tendencia en los minutos 50 ($56,57 \pm 16,82$) % ($F(1,160)= 5,02$ $p=0,02$), 54 ($54,78 \pm 15,23$) % ($F(1,160)= 5,48$ $p=0,02$) y 122 ($54,58 \pm 12,10$) ($F(1,160)= 4,53$ $p=0,03$) % (ver gráfico 9).

Niveles de GABA en el pálido ventral de ratas durante el séptimo día de tratamiento con morfina (fase crónica)

Durante el séptimo día de tratamiento con morfina, se hallaron diferencias estadísticamente significativas al comparar el porcentaje normalizado de GABA del grupo experimental ($n=7$) con el grupo control ($n=6$). Luego de la inyección de morfina se observó una reducción significativa en los niveles porcentuales de GABA a partir del minuto 18 ($54,80 \pm 7,97$) % ($F(1,160)= 5,93$ $p= 0,01$) y 20 ($59,06 \pm 8,24$) % ($F(1,160)= 5,90$ $p= 0,01$); manteniéndose el descenso durante los minutos 50 ($51,31 \pm 6,93$) % ($F(1,160)= 5,09$ $p= 0,02$) y 54 ($59,75 \pm 9,33$) % ($F(1,160)= 5,27$ $p= 0,02$) hasta el minuto 120 ($51,60 \pm 8,29$) ($F(1,160)= 9,09$ $p= 0,00$), (ver gráfico 10).

Niveles de GABA en el pálido ventral de ratas durante la inducción de abstinencia con el antagonista naloxona en el octavo día de tratamiento

No se encontraron cambios estadísticamente significativos al comparar el porcentaje normalizado de GABA después de la inducción de la abstinencia en las ratas tratadas con morfina con respecto al grupo control. Obsérvese en el gráfico 11 una compensación en el porcentaje de GABA luego de inyectar el antagonista en comparación con los tratamientos con morfina, cuyo efecto genera una reducción en los niveles de dicho neurotransmisor (ver gráficos 9 y 10).

Concentraciones basales de GABA en el pálido ventral en los diferentes días de tratamientos con morfina

Al comparar las concentraciones basales de GABA entre el grupo control y los diferentes días de tratamientos con morfina no se obtuvieron cambios estadísticamente significativas (ver gráfico 12). El grupo control ($871,83 \pm 278,24$) nM presentó una concentración similar a la concentración basal de GABA obtenida en el primer día de tratamiento con morfina ($786,00 \pm 358,82$) nM, mientras que las concentraciones basales del neurotransmisor en el séptimo ($581,87 \pm 279,68$) nM y octavo día de tratamiento con la morfina ($460,77 \pm 185,42$) nM tendieron a disminuir.

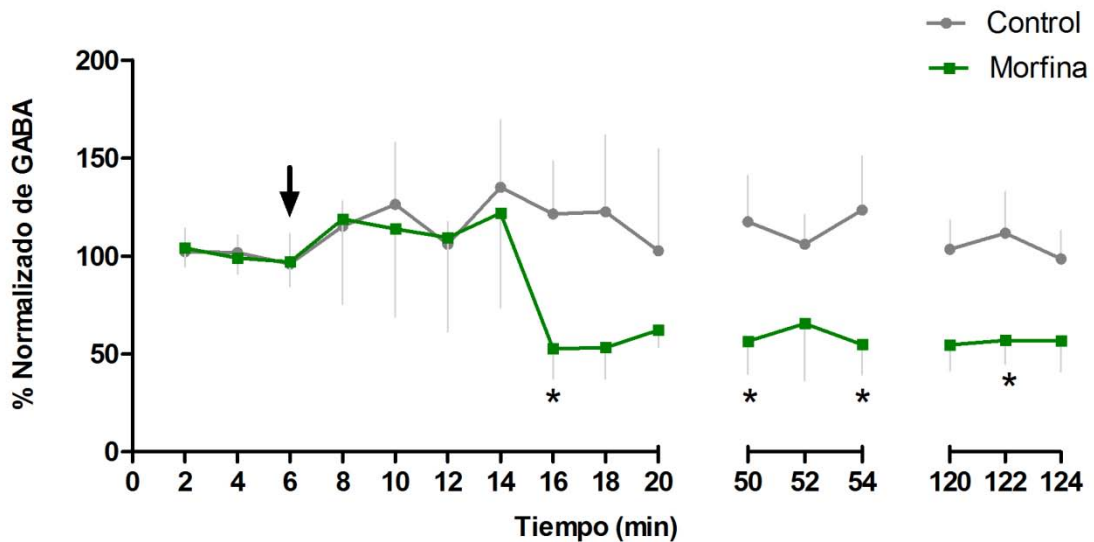


Gráfico 9. Porcentaje normalizado de GABA durante el primer día de tratamiento con morfina (fase aguda). Nótese que el porcentaje de GABA tiende a disminuir en el grupo experimental (n= 7) en comparación con el grupo control (n= 6). La flecha negra indica el momento de inyección de la morfina.

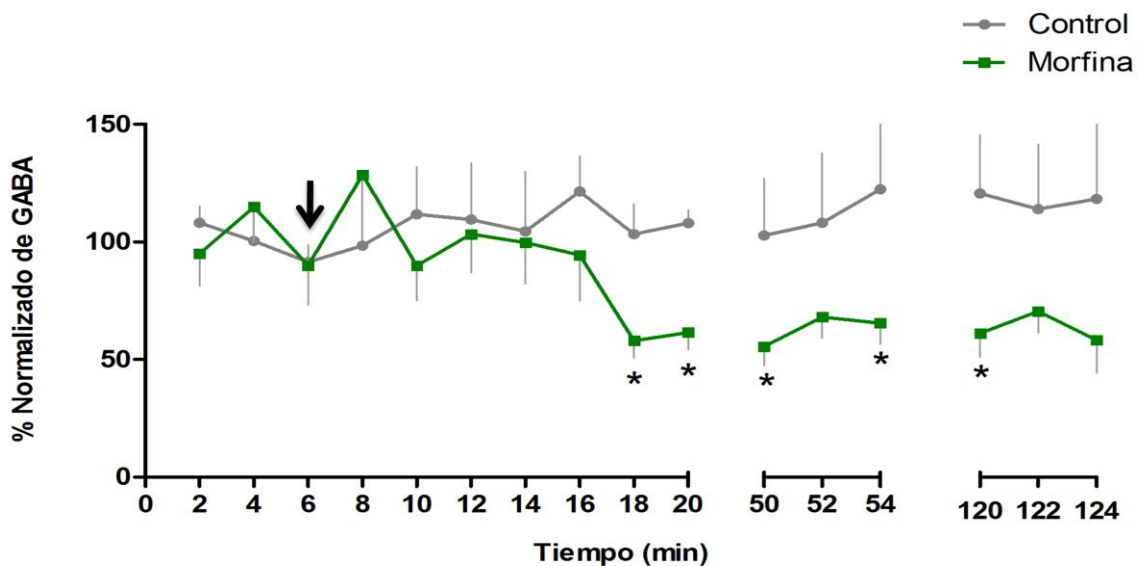


Gráfico 10. Porcentaje normalizado de GABA durante el séptimo día de tratamiento con morfina (fase crónica). La flecha negra indica el momento de inyección de morfina o solución salina en el grupo experimental (n=7) y control (n=6).

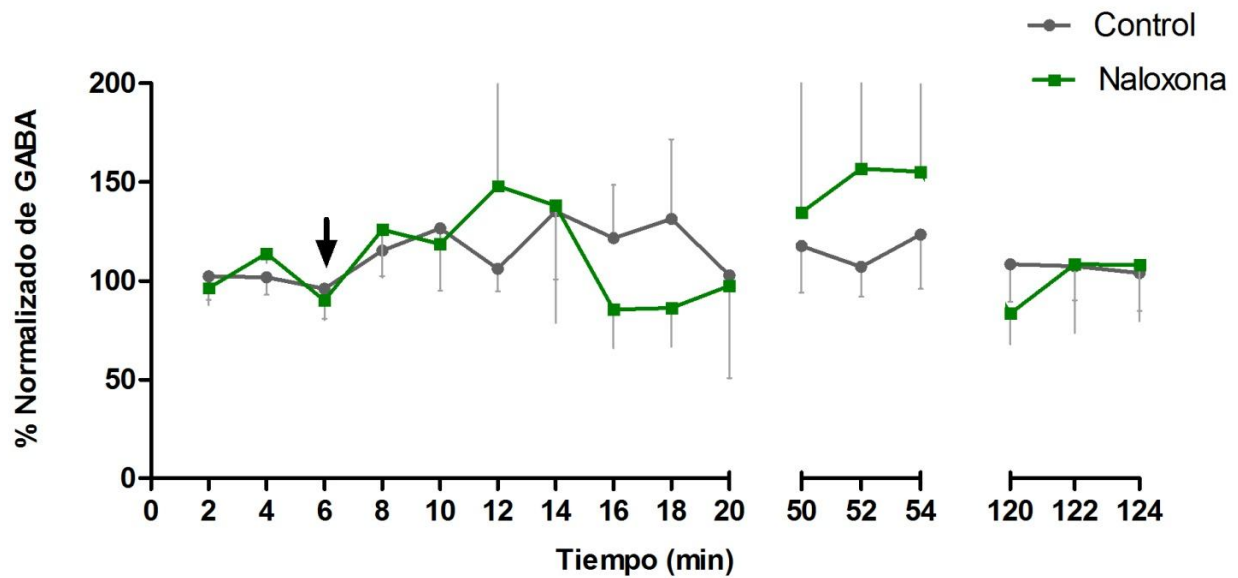


Gráfico 11. Porcentaje normalizado de GABA durante el octavo día de tratamiento con el antagonista naloxona (inducción de la abstinencia). La flecha negra indica la inyección del antagonista naloxona.

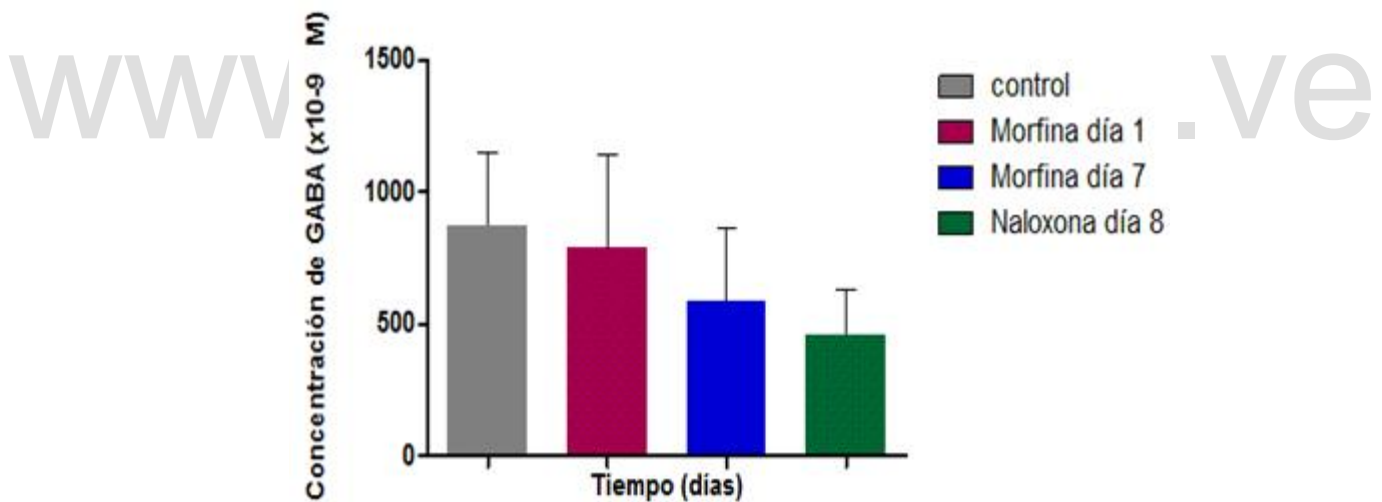


Gráfico 12. Valores absolutos de GABA en las muestras basales en el primer, séptimo y octavo día de tratamientos con morfina y el grupo control.

Verificación de la cánula de diálisis

Mediante la obtención de los cortes coronales realizados en los cerebros extraídos de las ratas utilizadas en los experimentos, se logro verificar el posicionamiento efectivo de las cánulas de microdiálisis correspondiendo con las coordenadas estereotáxicas establecidas, de esta forma, se garantizó que la toma de muestras del líquido extracelular se haya realizado de forma correcta en el pálido ventral.

Es importante resaltar, que también se incluyeron muestras cuyos dializados hayan sido extraídos desde una ubicación de 0,12mm desde el bregma, debido a que la membrana de diálisis aun se mantenía situada en el sitio de interés (ver figura 16), por el contrario, se descartaron las muestras de aquellas ratas cuyas cánulas de microdiálisis fueron insertadas en otras regiones cerebrales adyacentes al núcleo en cuestión.

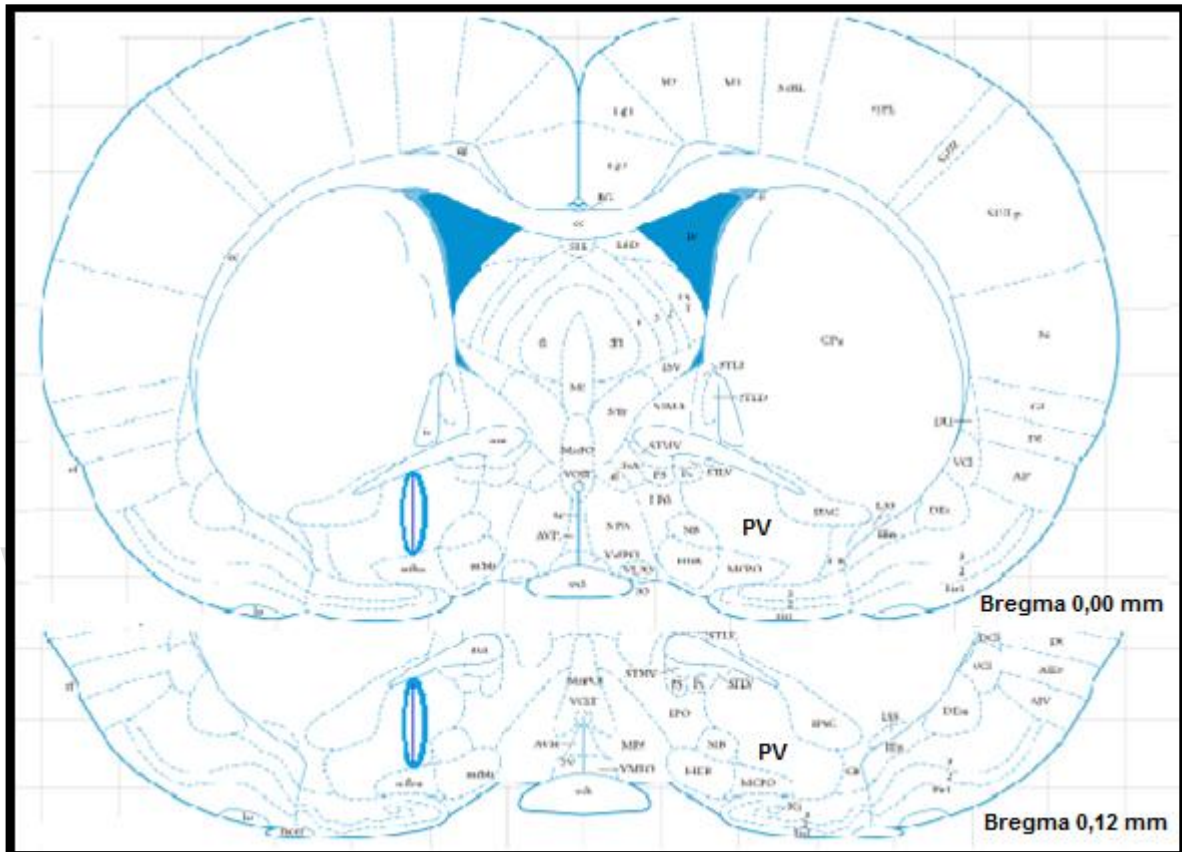


Figura 16. Representación esquemática de la ubicación de la membrana de diálisis dentro del pálido ventral. Obsérvese que las membranas de diálisis representadas como líneas de color azul oscuro, se mantienen en el pálido ventral (PV), a pesar de estar ubicadas en dos secciones coronales diferentes (bregma 0,00mm y 0,12mm). La figura ovalada de color azul claro hace referencia a la región aproximada en que las membranas fueron insertadas en los animales.

Discusión

Agmatina

Diversos estudios han demostrado que la agmatina exógena atenúa la dependencia y el síndrome de abstinencia ocasionado por tratamientos crónicos con morfina (Aricioglu y col., 1997); sin embargo, aún no está claro, si la amina endógena pudiera presentar una función similar en el pálido ventral con la misma efectividad.

De acuerdo a la hipótesis propuesta se esperaba que los niveles de agmatina disminuyeran en los tratamientos con morfina, debido a que este opiáceo parece alterar la biosíntesis de agmatina. Aricioglu y Regunathan (2002) encontraron que tratamientos crónicos con morfina reduce la actividad de la arginina descarboxilasa (ADC), y por lo tanto, disminuye los niveles de agmatina detectados en homogenizados cerebrales; mientras que la actividad de la agmatinasa resultaba inalterada, concluyendo que los bajos niveles de la amina eran causados en gran parte, por alteración en su biosíntesis, más que por su degradación (Aricioglu y Regunathan, 2002). No obstante, los niveles medidos de las enzimas y la agmatina fueron realizados en homogenizados de todo el cerebro, sin tomar en cuenta una región específica del órgano, y aunque la respuesta a las aplicaciones de morfina desencadene el mismo efecto en todas las células que expresen receptores μ -opioides, al tratarse de una red neuronal la neurotransmisión podría cambiar en un núcleo específico, como por ejemplo el pálido ventral. Es de resaltar que con los homogenizados cerebrales midieron el contenido de agmatina del "pool" intracelular, y desde el punto de vista fisiológico no es funcional, así que es difícil interpretar los hallazgos de los experimentos con homogenizados.

Aunque los niveles de agmatina durante el primer y el séptimo día de tratamiento con morfina se mostraron inalterados, la concentración de la amina en el último día de tratamiento previo a la inyección del antagonista, se encontró significativamente disminuida. No se podría concluir con certeza que la morfina altere la síntesis de agmatina (en vista que no se miden las enzimas ADC y la agmatinasa en el núcleo cerebral en estudio), sin embargo, el tratamiento crónico con morfina pudiera alterar la concentración de la amina en el pálido ventral.

Durante la inducción del síndrome de abstinencia, se observó un aumento en los niveles de agmatina en las ratas que fueron tratadas con morfina, estos resultados fueron contrarios a los reportados por Aricioglu y Regunathan (2002), quienes luego de inducir la abstinencia con naloxona, observaron una disminución de ADC y agmatina incluso de forma más pronunciada que en las ratas tratadas con morfina. Sin embargo, dichos autores expresaron que tales cambios pudieron haberse afectado por el hecho de no remover los pellet de morfina, implantados subcutáneamente en las ratas

antes de inducir la abstinencia durante el ensayo, y probablemente los efectos que observaron fueron los provocados por la morfina. Como aclaramos en el primer párrafo de la discusión, la medición de cualquier neurotransmisor mediante la técnica de homogenizados cerebrales tiene la inconveniencia de medir el neurotransmisor total (“pool” intracelular que es la mayor cantidad y neurotransmisor liberado), de manera que una disminución en los niveles de agmatina como los observados por Aricioglu y colaboradores, pudieran sugerir una mayor liberación del neurotransmisor seguido de su catabolismo con una reducción del “pool” intracelular y correspondiéndose con los hallazgos de los resultados de esta tesis.

Una posible explicación al incremento de agmatina después de la inyección del antagonista naloxona, pudiera estar asociado a los niveles de AMPc. Durante la fase aguda de tratamiento se ha destacado una reducción en los niveles de AMPc (Nestler, 2004; Nestler y Aghajanian, 1997); mientras que, la abstinencia se ha caracterizado por una hiperexcitación celular, en donde se incrementa los niveles de AMPc y con ello probablemente se expresen proteínas como la arginina descarboxilasa; lo que pudiera incrementar los niveles de agmatina al inducir la abstinencia.

Otra interpretación acerca del ascenso de agmatina después de la inyección de naloxona pudiera asociarse con los elevados niveles de glutamato en el pálido ventral durante la abstinencia; es decir, la neurotransmisión de la amina en el pálido ventral podría haber aumentado como mecanismo regulatorio ante el incremento del neurotransmisor excitatorio luego de la fase crónica de tratamiento. Se ha reportado que la agmatina ejerce un efecto neuroprotector en numerosas alteraciones en las que se encuentra vinculado glutamato (Moretti y col., 2014); asociándose a dicho neurotransmisor con la producción de óxido nítrico; debido a que, cuando se activa el receptor NMDA se produce la entrada de calcio al interior celular; este ion se une a la calmodulina asociada a la enzima óxido nítrico sintasa neural (ONSn), y en presencia de arginina u otros cofactores necesarios para su activación, produce la síntesis de citrulina y óxido nítrico (ON) (Garthwaite y col., 1989). Este agente puede interactuar con especies reactivas de oxígeno y el ion superóxido e inhibir la cadena transportadora de electrones, disminuyendo la producción de energía y contribuir con la degradación del ADN en las neuronas (Saavedra y col., 2004).

Se ha determinado que la agmatina suprime el incremento de citrulina, y por tanto los niveles de ON, en el núcleo accumbens de ratas tratadas con morfina a las que se les indujo abstinencia con naloxona (Yananli y col., 2007). Es importante resaltar el efecto neuroprotector de la agmatina en ratas sometidas a una lesión cerebral en el hipocampo, encontrándose que los niveles de glutamato y óxido nítrico disminuyeron en presencia de la amina (Kuo y col., 2007). Asimismo, en cultivos de neuronas de hipocampo en un medio con agmatina y altas concentraciones de glutamato y su receptor NMDA, se encontró un descenso en los marcadores de daño celular como el lactato deshidrogenasa, la degradación de β - tubulina y reducción en la fragmentación del ADN (Wang y col., 2006). Además se ha observado que tratamientos con agmatina provocaron una disminución significativa en los síntomas de abstinencia

como saltos, Wet dog shake o “movimiento de perro mojado”, ptosis, castaño de dientes y diarrea fueron mitigados hasta abolidos, dependiendo de la dosis de agmatina utilizada (Aricioglu y col., 1997; Wang y col., 2011).

Mediante un estudio realizado en homogenizados de cerebros de ratas, se logró determinar que la agmatina inhibe la actividad de la óxido nítrico sintasa neural (Galea y col, 1996) al aumentar la actividad NADPH oxidasa de la enzima e incrementar los niveles de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en el sitio activo, alterando los grupos prostéticos presentes en la enzima y por tanto promoviendo su inactivación (Demady y col., 2001).

Actualmente, no se ha encontrado que la agmatina interactúe con los receptores opioides, y produzca la reducción en el síndrome de abstinencia ocasionado por la morfina u otras drogas derivadas de opio. Sin embargo, se ha propuesto que la amina pudiera interferir con la cascada de señalización, intracelular específicamente con la activación de de PKA y CREB, disminuyendo la fosforilación y expresión de proteínas neurales (Aracioglu y col., 2004); de esta forma, el incremento de agmatina podría regular la expresión de receptores como los NMDA.

Por otra parte, se ha determinado que elevados niveles de glutamato en el núcleo accumbens provocado por la abstinencia, promueve la expresión de subunidades del receptor NMDA; no obstante, dicha expresión disminuye por tratamientos previos con agmatina (Wang y col., 2011). Yang y Reis (1999) hallaron que la agmatina a pH fisiológico bloquea los receptores NMDA (pero no los receptores AMPA o Kainato), debido a que el grupo guanidinio se encuentra cargado positivamente e interactúa con el poro del canal, razón por la cual, otras moléculas derivadas de agmatina como putrescina y espermina (solo presentan grupos aminos), son incapaces de atenuar las corrientes provocadas por el receptor; de esta forma, la agmatina también sería capaz de frenar la toxicidad provocada por glutamato mediante su unión a receptores o canales.

Un mecanismo diferente mediante el cual agmatina podría compensar el aumento de la neurotransmisión glutamatérgica, consiste en el bloqueo de los canales de calcio. Al disminuir la entrada de este ion en la terminación presináptica, se reduciría la liberación de glutamato, debido a que su secreción es dependiente de calcio (asimismo los niveles de óxido nítrico se verían afectados). Se desconoce el mecanismo específico de bloqueo, se presume que podría ser a través de la obstrucción directa de agmatina sobre los canales de calcio; sin embargo, se necesita más evidencia para determinar cómo ocurre dicha acción (Weng y col., 2003).

Resulta interesante indagar acerca del papel de la agmatina en la dependencia causada por drogas de abuso, sin duda alguna parece estar vinculada con un efecto neuroprotector; sin embargo, es necesario conocer el origen de las proyecciones de agmatina sobre el pálido ventral y cómo estas se

alteran y/o son reguladas. Los núcleos cerebrales que son fuente de agmatina y, además, proyectan al pálido ventral son: la amígdala, el núcleo accumbens y el área tegmental ventral (Otake y col., 1998; Root y col., 2015); dichas estructuras están asociados con el sustrato neurobiológico de la adicción a las drogas, por lo tanto, no sorprendería que parte de la agmatina pálidal provenga de estas regiones.

Glutamato

El tratamiento agudo con morfina aumentó los niveles de glutamato en el pálido ventral, este efecto ha sido observado en otras investigaciones, donde drogas como heroína y etanol también producen un efecto similar (Caille y Parson, 2004; Kemppainen y col., 2015). Cabe destacar, que las aferencias glutamatérgicas hacia el pálido ventral surgen desde el núcleo basolateral de la amígdala (Fuller y col., 1987), la corteza prefrontal (Sesack y col., 1989) y el núcleo subtálmico (Turner y col., 2001).

Se ha determinado que las neuronas piramidales del núcleo basolateral de la amígdala expresan sobre su superficie receptores μ -opioides. Investigaciones han descrito el mecanismo de acción de la morfina sobre los mismos, destacando una posible activación de una cascada de señalización donde se activa una quinasa regulada por señales extracelulares (ERKs), que fosforila a una proteína sobre las vesículas sinápticas denominada como sinapsina I, cuya función es mantenerlas unidas al citoesqueleto. Cuando ocurre la fosforilación, la sinapsina pierde afinidad por las vesículas facilitando la exocitosis de glutamato por las neuronas de la amígdala (Greengard, 1993; Yang y col., 2014; Zhang y col., 2015). Se desconoce si esta vía activada por la morfina sea la causante de la liberación de glutamato desde el núcleo basolateral de la amígdala hacia el pálido ventral, sin embargo, no se descarta la posibilidad de la ocurrencia de este mecanismo.

Por otra parte, la estimulación eléctrica de la CPF promueve la liberación de glutamato a través de una proyección que atraviesa el núcleo accumbens hacia el pálido ventral (Sesack y col., 1989). Interneuronas corticales GABAérgicas expresan receptores μ -opioides, cuya activación causa inhibición de las neuronas glutamatérgicas de la corteza prefrontal (Taki y col., 2000). Probablemente, la morfina al unirse a dichos receptores disminuya la liberación de GABA, desinhibiendo las neuronas glutamatérgicas y conduciendo a la liberación de glutamato; aún falta evidencia para demostrar que este proceso pudiera activar el pálido ventral; no obstante, se ha inferido que este mecanismo pudiera ocurrir en la corteza prefrontal medial para activar otras regiones inervadas por este núcleo como el accumbens y el hipotálamo durante el comportamiento apetitivo (Baldo, 2016). Este proceso también ha sido descrito en otras regiones, como la corteza orbital ventrolateral, la cual se encuentra inhibida por neuronas GABAérgicas que presentan receptores μ -opioides en su superficie y, además, aplicaciones de agonistas del receptor como DAMGO reduce las corrientes postsinápticas inhibitorias GABAérgicas sobre este núcleo, promoviendo su desinhibición (Qu y col., 2015). Probablemente, estos mecanismos descritos contribuyan con el incremento de glutamato en el pálido ventral.

Es importante destacar, que el tratamiento agudo con morfina induce sensibilización motora, así que es posible que incrementos de glutamato en el pálido ventral estén vinculados con esta conducta, en vista que, la inyección de agonistas de los receptores ionotrópicos de glutamato en el pálido ventral induce un aumento de la actividad motora (Kalivas y col., 1999), mientras que aplicaciones de antagonistas de estos receptores intra- PV produce un efecto contrario (Dallimore y col., 2006). Aún no se ha determinado el mecanismo por el cual el transmisor excitatorio en el PV pudiera provocar sensibilización, posiblemente la liberación de glutamato en este núcleo, estimule **algunas** neuronas GABAérgicas que proyectan hacia el tálamo mediodorsal; se ha determinado que la inyección de agonistas GABAérgicos en el tálamo mediodorsal promueve el incremento de la actividad motora en ratas (Kalivas y col., 1999). Por otra parte, han sugerido que el aumento sea ocasionado como una pérdida de control del mecanismo que regula la entrada de glutamato al núcleo pálido ventral (Caille y Parsons, 2004). Es posible que la liberación de glutamato desencadene adaptaciones a largo plazo en el PV pudiendo estar asociado con el mantenimiento o inducción de la sensibilización de forma similar que el ATV, en donde las drogas de abuso promueven la liberación de glutamato y la expresión de subunidades GLU1 del receptor AMPA, incrementando así la sensibilidad de las neuronas hacia dicho neurotransmisor (Carlezon y Nestler, 2002).

Durante el séptimo día de tratamiento los niveles de glutamato se encontraron inalterados al ser comparado con el tratamiento control. Un resultado similar se observó en el núcleo accumbens luego de que ratas fueron sometidas a tratamientos crónicos con morfina, atribuyendo este efecto a la aparición de tolerancia (Sepúlveda y col., 1997). Es probable que tratamientos crónicos con morfina promuevan un mecanismo de desensibilización en los receptores μ -opioides presentes en neuronas piramidales de la amígdala y la corteza prefrontal, produciéndose como consecuencia reducción en la liberación de glutamato hacia el pálido ventral (en comparación con el incremento obtenido en la fase aguda). Cabe destacar, la participación de los receptores ionotrópicos de glutamato en la inducción de tolerancia a la morfina, encontrándose que tratamientos crónicos con el opiáceo incrementa la expresión de la subunidad NR1 del receptor NMDA en el núcleo accumbens (Wang y col., 2011) mientras que su bloqueo a través del antagonista MK-801 disminuye dicha tolerancia (Trujillo y Akil, 1991). El mecanismo por el cual, estos receptores promueven la tolerancia ha sido descrito, estableciéndose que tanto el receptor μ -opioide como los receptores NMDA pueden ser localizados juntos en dendritas (a nivel postsináptico), cuando se activan los receptores NMDA y AMPA, estos promueven la activación de la proteína kinasa C (PKC γ) que a su vez fosforila los receptores μ -opioides y los inactiva (Sánchez y col., 2010). Posiblemente, un proceso similar al descrito pudiera ocurrir en algunas neuronas del pálido ventral o incluso en los núcleos que lo inervan, lo que favorecería la desensibilización de los receptores μ -opioides y la aparición de tolerancia; de igual forma, podría activarse la fosforilación de los receptores μ -opioides por otras proteínas kinasas capaces de inducir la internalización del receptor y reducir su efecto (ver figura 17).

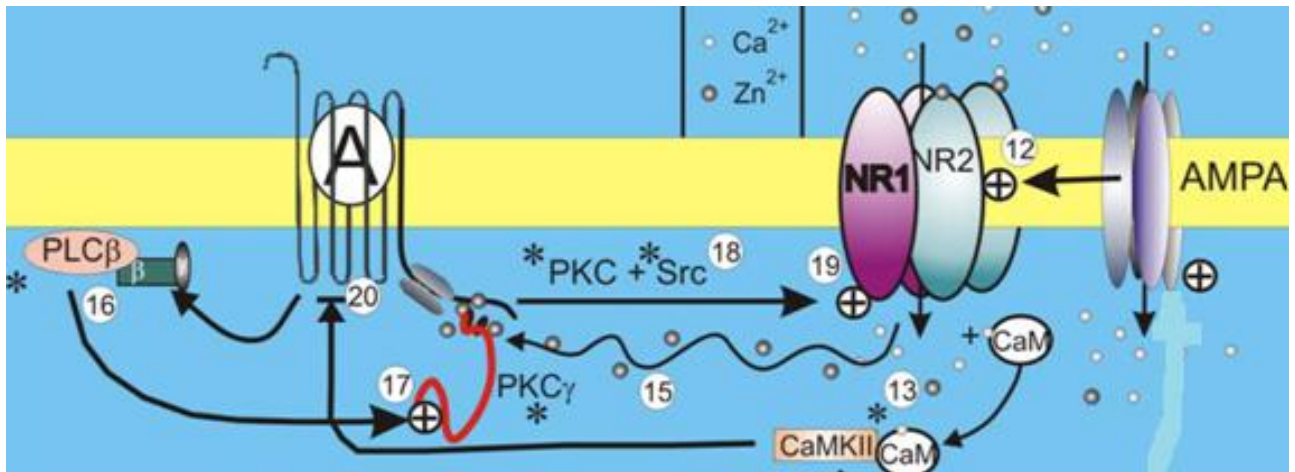


Figura 17. Representación esquemática de la interacción entre el receptor μ -opioides con los receptores NMDA y AMPA. Cuando se activan los receptores NMDA y AMPA permiten la entrada de iones como zinc y calcio, este último, a su vez, permite activar la kinasa dependiente de calmodulina (CaMKII) que frena la producción de óxido nítrico por la ONSn. Altos niveles de óxido nítrico y zinc en regiones adyacentes al receptor μ , es capaz de reclutar a la PKC γ y fosforilar el dominio C-terminal del receptor opioide en el interior citoplasmático e inactivarlo. Cabe destacar, que la PKC γ fosforila la subunidad NR1 del NMDAR favoreciendo la entrada de calcio al interior neuronal (diagrama y descripción tomada de Sánchez y col., 2010).

En el octavo día de diálisis se encontraron los niveles de glutamato elevados, se esperaba que los resultados fueran contrarios a los obtenidos; en vista que, el antagonista naloxona bloquea el efecto de la morfina sobre los receptores μ . Se podría suponer que la liberación de glutamato al PV durante esta fase, provenga de otras regiones cerebrales como por ejemplo el núcleo subtálmico. El pálido ventral es capaz de activarse por estimulación eléctrica del núcleo subtálmico (NST) y dicha activación esta mediada por glutamato (Turner y col., 2001). Sin embargo, no se han realizado investigaciones que expliquen cómo los receptores μ -opioides en el núcleo subtálmico, pudieran modular la transmisión sináptica en el pálido ventral, no obstante, se ha encontrado que agonistas μ -opioides (DAMGO y met-enkefalina) disminuyen la transmisión sináptica tanto inhibitoria como excitatoria en el núcleo subtálmico a través de la activación de receptores μ -opioides ubicados a nivel presináptico (Shen y Jhonson, 2002). Por otro lado, se ha localizado una moderada cantidad fibras encefalinérgicas y ARN mensajero que codifica para el receptor μ -opioides en el núcleo subtálmico, lo que haría inferir la posible localización de los receptores μ -opioides a nivel postsináptico en algunas neuronas de dicho núcleo (Delfs y col, 1994; Wamsley y col., 1980). Es posible que la morfina, mediante su mecanismo de acción, pudiera disminuir la activación del NST, reduciendo la liberación de glutamato hacia el PV cuando tratamientos con morfina son aplicados, lo que hace probable que la inyección del antagonista naloxona pudiera revertir este efecto e incrementar la neurotransmisión glutamatérgica hacia el PV durante la inducción de la abstinencia, coincidiendo así con los resultados encontrados durante esta fase de tratamiento.

Cabe destacar, que se han encontrado aumentos del neurotransmisor excitatorio en locus coeruleus y el núcleo accumbens en ratas que fueron tratadas previamente con morfina e indujeron la abstinencia con naloxona (Aghajanian y col., 1994; Sepúlveda y col., 1997). En el trabajo realizado por Sepúlveda y colaboradores (1997), se relacionó el rápido incremento de glutamato en el núcleo accumbens (luego de la inyección de naloxona), con la inducción de la abstinencia. De la misma manera, los niveles incrementados de glutamato en el pálido ventral se pudieran asociar con el estado aversivo que se genera luego que se induce la abstinencia; sin embargo, no se han realizado estudios donde exploren los niveles de neurotransmisores excitatorios en el pálido ventral luego de la inducción de abstinencia a opiáceos, por lo cual se requiere realizar más investigaciones al respecto para corroborar los resultados obtenidos. Por otro lado, no se descarta la posibilidad de que en los intervalos de tiempo no muestreados se haya producido alguna reducción en los niveles de glutamato, observándose solo el ascenso en dichos niveles en los minutos muestreados.

Finalmente, al comparar las concentraciones basales del neurotransmisor excitatorio en el séptimo y octavo día de tratamiento con respecto a los controles, no se encontraron cambios aparentes; este efecto podría ratificar los resultados obtenidos durante la fase crónica de tratamiento donde se infirió una posible tolerancia a los efectos de la morfina; aunado al hecho de que pudiera activarse notablemente los mecanismos que mantienen regulados los niveles extracelulares de glutamato, como por ejemplo la captación de glutamato a través de las glías, que promueve la metabolización y reciclaje de dicho aminoácido (Danbolt, 2001). Es viable inferir que en el interior del pálido ventral se desarrolle un mecanismo similar que contribuya a regular las concentraciones de glutamato compensando posibles alteraciones ocasionadas por tratamientos agudos y crónicos con morfina.

GABA

Los niveles disminuidos de GABA en el pálido ventral después de tratamientos con morfina podría apoyar las hipótesis propuestas por otros estudios, las cuales proponen que las drogas de abuso opiáceas, como la heroína, además de aumentar la liberación de dopamina en el núcleo accumbens, causa disminución en la liberación de GABA en el PV (Caille y Parsons, 2004; Jhonsson y North, 1992; Xi y Stein, 2000). Se ha encontrado una reducida actividad en las neuronas GABAérgicas del núcleo accumbens en presencia de morfina y heroína (Hakan y Henricksen, 1989), esto es debido a la presencia de receptores μ -opioides en la vía estriado pálido, específicamente sobre dendritas y soma de la neurona espinosa media (Olive y col., 1997; Svingos y col., 1997); por otro lado, se hallaron receptores μ -opioides en terminales presinápticos (procedentes del accumbens) y a nivel postsináptico en el pálido ventral; además, se ha sugerido la posibilidad que se encuentren en interneuronas GABAérgicas dentro del mismo núcleo (Mitrovic y Napier, 1995; Napier y Mitrovic, 1999); de esta forma, la morfina al unirse sobre su receptor en dichas regiones, cause hiperpolarización e inhibición de los canales de calcio, dificultando la liberación de GABA en el PV.

Se podría sugerir que el descenso de los niveles de GABA en el PV durante el tratamiento agudo con morfina, también sea ocasionado por la disminuida actividad de la neurona espinosa media ocasionado por los bajos niveles de glutamato en el núcleo accumbens (Sepúlveda y col., 1997). Martin y colaboradores (1997), indicaron que agonistas opioides del receptor μ son capaces de disminuir la liberación de glutamato sobre la neurona espinosa media, asimismo, los incrementados niveles de dopamina en el accumbens ocasionado por la morfina (Pothos y col., 1991), al unirse sobre los receptores D_2 inhibitorios presentes en terminales presinápticos glutamatérgicos en dicha región (Nicola y col., 2000; Yamamoto y Davi, 1992), podría contribuir con la reducción en la excitación de la neurona espinosa media y la liberación de GABA en el pálido ventral. De forma similar que el neurotransmisor glutamatérgico; los niveles de acetilcolina durante el tratamiento agudo con morfina se han encontrado reducidos (Rada y col., 1991; Sepulveda y col., 1997), debido a la presencia de receptores μ -opioide en interneuronas acetilcolinérgicas del núcleo accumbens (Lapchak, 1989); esta reducción posiblemente disminuya la activación de los receptores muscarínicos M_1 sobre las neuronas GABAérgicas que salen de dicho núcleo hacia el pálido ventral, lo que se traduciría en una reducción en los niveles de GABA en la región palidal.

Es interesante resaltar que durante la fase crónica de tratamiento con morfina, se mantienen reducidos los niveles de GABA en comparación con el sistema glutamatérgico, que parece estar sujeto a tolerancia en la misma etapa de estudio, lo que permite especular sobre diferentes explicaciones a tales resultados. Es posible que se altere la expresión y/o regulación de los receptores μ -opioide durante tratamientos crónicos con morfina en el accumbens y/o en el pálido ventral, de manera, que mantenga inhibidas las neuronas GABAérgicas que proyectan al PV. Investigaciones han hallado, que tratamientos agudos con morfina incrementa la internalización del receptor μ opioide en dendritas del accumbens mediante endocitosis (Debic y col., 2003, 2005; Muñoz y col., 2007); posiblemente durante la fase crónica de tratamiento el receptor μ -opioide podría encontrarse insertado nuevamente en las membranas mediante el proceso de internalización y posterior recirculación, de esta manera, se facilitaría la resensibilización durante el tratamiento crónico. Sí por el contrario, frecuentes inyecciones de morfina induce inactivaciones del receptor μ -opioide a través de su fosforilación, es probable que aumente la expresión de nuevos receptores en las membranas que contrarreste los posibles receptores fosforilados. Por otro lado, aunque los niveles de glutamato y acetilcolina no se mantienen reducidos en el accumbens durante la fase crónica de tratamiento con morfina (Rada y col., 1991; Sepulveda y col., 1997), probablemente no sean capaces de estimular la liberación de GABA sobre el pálido ventral, posiblemente el efecto predominante sea el del sistema dopaminérgico, cuyos niveles incrementados en la fase crónica de tratamiento con morfina (Pothos y col., 1991) mantenga inhibidos dichos neurotransmisores e incluso las neuronas espinosas medias que expresen receptores inhibitorios D_2 sobre su superficie, lo que pudiera asociarse con la inhibición de estados aversivos y la facilitación del comportamiento adictivo y mantenimiento de altos estados de motivación por la droga (Hoebel y col., 2009).

Por otro lado, se pudiera inferir que los niveles del neurotransmisor excitatorio durante la fase crónica de tratamiento, podrían estimular la actividad de algunas neuronas GABAérgicas, y promover la liberación parcial de encefalinas hacia el pálido ventral, las cuales se han localizado en dichas neuronas sobre la misma vía estriado-pálidal (Olive y Maidment, 1998; Zahm y col., 1984); se ha hallado que inyecciones de morfina o heroína promueve la liberación de encefalinas sobre el pálido ventral (Olive y col., 1995; Olive y Maidment, 1998); lo que pudiera mantener reducido los niveles de GABA en dicho núcleo. Asimismo, otros trabajos han descrito un proceso similar, expresando que inyecciones de cocaína reduce los niveles de GABA en el pálido ventral, posiblemente por la liberación de glutamato desde la corteza prefrontal hacia el núcleo accumbens core, lo que pudiera activar neuronas espinosas media de la región y promover la liberación de encefalinas, que al unirse sobre receptores mu opioide en las mismas neuronas GABAérgica, o sobre el palido ventra, facilitaría la reducción en la liberación de GABA (Torregrossa y Kalivas, 2008).

A pesar de no haberse encontrado cambios significativos en los niveles de GABA en el pálido ventral luego de precipitarse la abstinencia, el antagonista logró contrarrestar los bajos niveles del neurotransmisor encontrándose una leve tendencia a aumentar hasta finalmente estabilizarse. Actualmente, no se han medido los niveles de GABA luego de la inducción del síndrome de abstinencia a opiáceos en el PV, sin embargo, se esperaba que dichos niveles fueran contrarios a los encontrados durante el tratamiento agudo y crónico con morfina, pues posiblemente, la activación de los receptores μ -opioides que inhibían a las neuronas GABAérgicas (del accumbens y PV), se bloquearían por el antagonista permitiendo la liberación de GABA hacia el pálido ventral (ver figura 18). De la misma forma, se ha encontrado que el antagonista naloxona es capaz de aumentar la liberación de glutamato y acetilcolina en el nucleo accumbens en ratas dependientes de morfina (Rada y col., 1991; Sepulveda y col., 1997), lo que facilitaría la liberación de GABA hacia el pálido ventral.

Es importante resaltar, que han asociado la elevación en los niveles de GABA con la regulación de la abstinencia; estudios han utilizado fármacos para incrementar los niveles de dicho neurotransmisor e inhibir la liberación de neurotransmisores excitatorios durante el síndrome de la abstinencia (Salehi y col., 2011); se ha encontrado que tratamientos con vigabatrin (inhibidor irreversible de la enzima GABAtransaminasa, (Leach y Brodie, 1998)) reduce el síndrome de abstinencias en ratas recién nacidas (Santoro y col., 2016). Sin embargo, inyecciones de este mismo fármaco, de forma sistémica en ratas dependientes de morfina potencia los síntomas físicos que aparecen luego de la inyección con el antagonista naloxona; como “wet dog shake o movimiento de perro remojado”, castaño de dientes y saltos (Sayin y col., 1998). No obstante, faltan investigaciones que logren determinar los núcleos cerebrales asociadas con dicho estado, en vista que, los niveles de GABA en diversas regiones pudieran regular de diferentes maneras la abstinencia.

Por otro lado, inyecciones de vigabatrin en el pálido ventral aumenta la inmovilidad en ratas durante el test de nado forzado y reduce la preferencia por sacarosa (mediante el test de preferencia a sacarosa), asociándose dichos resultados con la aparición de estados depresivos como disforia y anhedonia (Skirzewski y col., 2011), síntomas que también pueden producirse durante la abstinencia a las drogas. De igual forma, aumentos de los niveles de GABA en el PV disminuye el consumo de heroína (Xi y Stein, 2000) y bloqueo de los receptores μ -opioides con el antagonista naloxona en el pálido ventral, induce aversión (empleando altas dosis) y frena la adquisición de cocaína (Skoubis y Maidment, 2003). Se podría concluir, que una posible consecuencia del aumento de GABA en el PV pudiera relacionarse con estados motivacionales negativos o aversivos que surge cuando se interrumpe el consumo de droga.

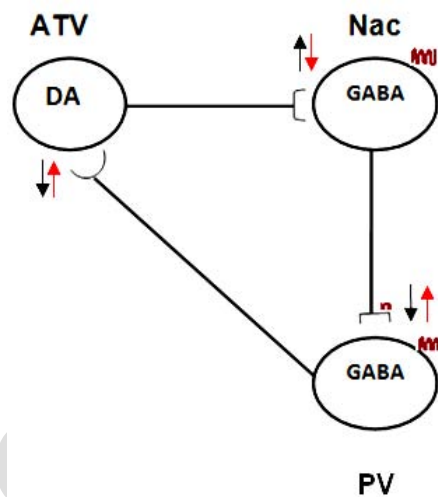


Figura 18. Resumen de los mecanismos de acción de la morfina y naloxona en el sistema mesolímbico. Las flechas indican la alteración en los niveles de neurotransmisores; el color negro de las mismas señala los cambios generados por la morfina y las rojas por naloxona. ATV= área tegmental ventral; Nac= núcleo accumbens; PV= pálido ventral. La morfina al unirse sobre los receptores μ -opioides reduce la liberación de GABA sobre el PV. Cuando se precipita la abstinencia con naloxona, posiblemente, se incrementen los niveles de GABA sobre dicho núcleo y las proyecciones GABAérgicas hacia el ATV; así se contribuiría con la inhibición de las neuronas dopaminérgicas y reducción en la liberación de su neurotransmisor sobre el Nac (Pothos y col., 1991; Xi y Stein, 2000). De esta forma el PV podría modular indirectamente la liberación de dopamina sobre el Nac, lo que también pudiera asociarse con el síndrome de abstinencia.

Por otro lado, la reducida liberación de GABA probablemente pueda estar regulada por la acción de los autoreceptores GABAérgicos (GABAb) ubicados en el núcleo accumbens o terminales presinápticas del PV (provenientes del accumbens), de manera que, el incremento de GABA durante la abstinencia pudiera regular de forma negativa su propia liberación; este hecho podría explicar la estabilización final en los niveles de GABA luego de la inyección del antagonista. Es importante destacar, que la activación

de los autoreceptores GABA_B inhiben los canales de calcio disminuyendo la concentración del calcio intracelular, y bloqueando la liberación de neurotransmisores y neuropéptidos desde las vesículas sinápticas (Bowery y col., 2002; Kaupmann y col., 2001). Finalmente al evaluar las concentraciones basales de GABA en los diferentes tratamientos con morfina y previo a la inyección de naloxona no se encontraron cambios significativos, sin embargo, se puede apreciar una tendencia a disminuir, es posible que se necesite incrementar el número de animales en la experiencia para obtener resultados más concluyentes.

www.bdigital.ula.ve

Conclusiones

- ✓ El tratamiento crónico con morfina redujo significativamente las concentraciones basales de agmatina en el octavo día de tratamiento, previo a la inyección del antagonista naloxona. Por el contrario, luego de la inyección del antagonista en las ratas tratadas con morfina se produjo un ascenso en los niveles de agmatina en el pálido ventral de ratas.
- ✓ El tratamiento agudo con morfina y luego de la inducción de la abstinencia con el antagonista naloxona, incrementaron los niveles de glutamato en el pálido ventral. Se hace necesario la corroboración de dichos resultados.
- ✓ La fase crónica de tratamiento con morfina no alteró los niveles de glutamato en el pálido ventral asociándose con la aparición de tolerancia.
- ✓ Los niveles de GABA en el pálido ventral fueron reducidos por los tratamientos agudo y crónico con morfina. Mientras que la inyección del antagonista naloxona, aunque no incrementó significativamente los niveles de dicho neurotransmisor, compensó su descenso.

www.bdigital.ula.ve

Perspectivas futuras

- ✓ Se sugiere la realización de trabajos que permitan determinar la fuente de agmatina en el pálido ventral, cómo la morfina podría alterar las enzimas asociadas con su biosíntesis (en dicho núcleo) y la posible asociación de agmatina con el síndrome de abstinencia.

- ✓ Es necesario determinar en futuras investigaciones, el núcleo neuronal específico que proyecta glutamato hacia el pálido ventral, cuando se induce el síndrome de abstinencia.

- ✓ Se requiere determinar la posible liberación de encefalinas durante el tratamiento crónico con morfina y, el papel de los autoreceptores GABAérgico GABA_B durante la abstinencia, en la regulación de la liberación de GABA sobre el pálido ventral.

- ✓ Se recomienda la toma de muestras sucesivas para observar posibles alteraciones continuas en el tiempo y evitar incógnitas acerca de las variaciones ocurridas en los intervalos no muestreados.

www.bdigital.ula.ve

Bibliografía

Aghajanian, G., Kogan, J y Moghaddam, B. (1994). Opiate withdrawal increase glutamate and aspartate efflux in the locus coeruleus: An in vivo microdialysis study. *Brain Research*, 636: 126-130.

Álvarez, Y y Farre, M. (2005). Farmacología de los opioides. *Adicciones*, 17 (2), 21- 40.

Aricioglu, F y Regunathan, S. (2002). Effect of chronic morphine treatment on the biosynthesis of agmatine in rat brain and other tissues. *Life Sciences*, 71: 1695-1701.

Aricioglu, F., Means, A y Regunathan, S. (2004). Effect of agmatine on the development of morphine dependence in rats: potential role of cAMP system, *European Journal of Pharmacology*, 504 (3): 191-197.

Aricioglu, F y Uzbay, T. (1997). Inhibitory effect of agmatine on naloxone- precipitated abstinence syndrome in morphine dependent rats. *Life Sciences*, 61(18): 1775-1781.

Asociación Americana de Psicología (APA). (1995). Manual de Diagnóstico y Estadísticos de los Trastornos Mentales, DSM-IV- TR (4^{ta} ed.). Barcelona: Masson

Baldo, B. (2016). Prefrontal cortical opioids and dysregulated motivation: a network hypothesis. *Trends in Neurosciences*, 39(6): 366-377.

Barnard, E., Skolnick, P., Olsen, R., Mohler, H., Sieghart, W., Biggio, G., Braestrup, C., Bateson, A y Langer, S. (1998). International Union of Pharmacology Subtypes of gamma-Aminobutyric Acid A Receptors: Classification on the Basis of Subunit Structure and Receptor Function. *Pharmacological Reviews*, 50(2): 291-313.

Betancourt, L., Rada, P., Paredes, D y Hernández, L. (2012). In vivo monitoring of cerebral agmatine by microdialysis and capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography B*, 880: 58–65

Borsodi, A., Caló, G., Chavkin, C., MacDonald C., Civelli, O., Cox, B. Opioid receptors: μ receptor. . Fecha de actualización: 10 de marzo de 2016 Fecha de última consulta: 6 de mayo de 2016. <http://www.guidetopharmacology.org/GRAC/ObjectDisplayForward?objectId=319>

Bowery, N., Bettler, B., Froeslt, W., Gallagher, J., Marshall, F., Raiteri, M., Bonner, T y Enna, S. (2002). Mammalian gamma-aminobutyric acid B receptors: structure and function. *Pharmacological Reviews*, 54(2): 247-264.

Brambilla, P., Perez, J., Barale, F., Schettini, G y Soares, J. (2003). GABAergic dysfunction in mood disorders. *Molecular Psychiatry*, 8: 721-737.

Broseta, I., Rodríguez, M., Stinus, L y Miñarro, J. (2002). Ethological análisis of morphine withdrawal with different dependence programs in male mice. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatr*, 26 (2): 335-347.

Caille, S y Parsons, L. (2004). Intravenous heroin self-administration decreases GABA efflux in the ventral pallidum: an in vivo microdialysis study in rats. *European Journal of Neuroscience*, 20: 593-596.

Carlezon, W y Nestler, E. (2002). Elevated levels of GluR1 in the midbrain: a trigger for sensitization to drugs of abuse? *TRENDS in Neurosciences*, 25 (12): 610-615.

Carnes, K., Fuller, T y Price, J. (1990). Source of presuntive glutamatergic/aspartergic afferents to the magnocellular basal forebrain in the rat. *Journal of Comparative Neurology*, 302 (4): 824-852.

Chen, M., Zhao, Y., Yang, H., Luan, W., Song, J., Cui, D., Dong, Y., Lai, B., Ma, L y Zheng, P. (2015). Morphine disinhibits glutamatergic input to VTA dopamine neurons and promotes dopamine neuron excitation. *Elife*, 1: 1-25.

Chopin, M. (2012). Principios básicos de electroforesis capilar: técnica analítica de separación de analitos. *Investigación en Discapacidad*, 1: 86-89.

Cooper, G. (2002). *The Cell: A Molecular Approach*. (2^{da} ed.). (pp. 527). New York, United States: ASM press.

Dalhoeven, G., Narahari, J., Rodriguez, N y Hernández, L. (1995). Simultaneous measurement of capillary electrophoresis fluorescent peaks and their corresponding spectra. *Journal Chromatography*, 18: 3729-3749.

Dallimore, J., Mickiewicz, A y Napier, C. (2006). Intra-ventral pallidal glutamate antagonists block expression of morphine-induced place preference. *Behavioral Neuroscience*, 120, (5): 1103-1114.

Danbolt, N. (2001). Glutamate uptake. *Progress Neurobiology*, 65:1-105.

Debic, H., Kim, K., Yu, I y Zastrow, M. (2005). Morphine promotes rapid arrestin- dependent endocytosis of μ -opioid receptors in striatal neurons. *The Journal of Neuroscience*, 25(34): 7847-7857.

Debic, H., Wein, M., Barrot, M., Colago, E., Rahman, Z., Neve, R., Pickel, V., Nestler, E., von Zastrow, M y Svingos, A. (2003). Morphine acutely regulates opioid receptor trafficking selectively in dendrites of nucleus accumbens neurons. *The Journal of Neuroscience*, 23(10): 4324- 4332.

Delfs, J., Kong, H., Mestek, A., Chen, Y., Yu, L., Reisine, T y Chesselet, M.(1994). Expression of mu opioid receptor mRNA in rat brain: an in situ hybridization study at the single cell Level. *The Journal Of Comparative Neurology*, 345: 46-68.

Demady, D., Jianmongkol, S., Vuletich, J., Bender, A y Osawa, Y. (2001). Agmatine enhances the NADPH oxidase activity of neuronal NO synthase and leads to oxidative inactivation of the enzyme. *Molecular Pharmacology*, 59: 24-29.

Di Chiara, G e Imperato, A. (1988). Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely moving rats (amphetamine/cocaine/ethanol/nicotine/opiates). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85: 5274-5278.

Di Chiara, G., Tanda, G., Bassareo, V., Pontieri, F., Acquas, E., Fenu, S., Cadoni, C y Carboni, E. (1999). Drug addiction as disorder of associative learning role of nucleus accumbens shell/extended amygdala dopamine. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 877: 461- 485.

Fernández, E. (2006). Neurobiología de la adicción a psicoestimulantes. *Revisión en Neurociencias*, 43(3): 147-154.

Forman, S., Chou, Y., Strichartz, G y Lo, E. (2009). Farmacología da Neurotransmisión GABAérgica y Glutamatérgica. Golan, D. Principios de Farmacología. (2^{da} ed.) (pp. 146-165). Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.

Fuller, T., Russchen F y Price, J. (1987). Sources of presumptive glutamergic/aspartergic afferents to the rat ventral striatopallidal region. *The Journal of Comparative Neurology*, 258(3): 317-338.

Galea, E., Regunathan, S., Eliopoulos, V., Feinstein, D y Reis, D. (1996). Inhibition of mammalian nitric oxide synthases by agmatine, an endogenous polyamine formed by decarboxylation of arginine. *Biochemical Journal*, 316: 247–249.

Garthwaite, J., Garthwaite, G., Palmer, R y Moncada Salvador. (1989). NMDA receptor activation induces nitric oxide synthesis from arginine in rat brain slices. *European Journal of Pharmacology*, 172: 413-416.

Greengard, P., Valtorta, F., Czernik, A y Benfenati, F. (1993). Synaptic vesicle phosphoproteins and regulation of synaptic function. *Science*, 259:1.

Hakan, L y Henriksen, J. (1989). Opiate influences on nucleus accumbens neuronal electrophysiology: dopamine and non-dopamine mechanisms. *The Journal of Neuroscience*, 9 (10): 3536-3546.

- Hardingham, G y Bading, H. (2003). The Yin and Yang of NMDA receptor signalling. *Trends Neuroscience*, 26: 81-90.
- Hernandez, L y Hoebel, B. (1988). Food reward and cocaine increase extracellular dopamine in the nucleus accumbens as measured by microdialysis. *Life Sciences*, 42 (18): 1705-1712.
- Hernandez, L., Lee, F y Hoebel, B. (1987). Simultaneous microdialysis and amphetamine infusion in the nucleus accumbens and striatum of freely moving rats: increase in extracellular dopamine and serotonin. *Brain Research Bulletin*, 19: 623-628.
- Hernández, L., Paez, X y Hamlin, C. (1983) Neurotransmitter extraction by local intracerebral diálisis in anesthetized rats. *Pharmacology Biochemist & Behavior*, 18: 159-162.
- Hernández, L., Stanley, B y Hoebel, B. (1986). A small removable microdialysis probe. *Life Science*, 39: 2629-2637.
- Hernández, L., Tucci, S., Guzman, N y Paez, X. (1993). In vivo monitoring in the brain by microdialysis and capillary electrophoresis with laser- induced fluorescence detection. *Journal of Chromatography A*, 652: 393-398.
- Hoebel, B., Avena, N., Bocarsly, M y Rada, P. (2009). Natural Addiction. A Behavioral and Circuit Model Based on Sugar Addiction in Rats. *Journal of Addiction Medicine*, 3: 33-41.
- Hubner, C y Koob, G. (1990). The ventral pallidum plays a role in mediating cocaine and heroin self-administration in the rat. *Brain Research*, 509: 20-29.
- Hyman, S., Malenka, R y Nestler, E. (2006). Neural Mechanisms of Addiction: The Role of Reward-Related Learning and Memory. *Annual Review of Neuroscience*, 29: 565–598.
- Jalabert, M., Bourdy, R., Courtin, J., Veinante, P., Manzoni, O., Barrot, M y Georges, F. (2011). Neuronal circuits underlying acute morphine action on dopamine neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 108: 16446-16450.
- Jhonson, S y North, R. (1992). Opioids excite dopamine neurons by hiperpolarization of local interneurons. *The Journal of Neuroscience*, 12 (2): 483-488.
- Kalivas, P., Churchill, L y Romanides, A. (1999). Involvement of pallidal-thalamocortical circuit in adaptive behavior. En: Jacqueline McGinty (comp.), *Advancing from the ventral striatum to the extended amígdala* (pp. 64-69). New York: Annals of the New York Academy of Sciences.
- Kaupmann K., Froelst W y Bettler B. (2001) GABA_B Receptors. *Encyclopedia of life sciences*, 1-7.

- Kemppainen, H., Nurmi, H., Raivio, Noora y Kiianmaa, K. (2015). Enhanced extracellular glutamate and dopamine in the ventral pallidum of alcohol-preferring AA and alcohol-avoiding ANA rats after morphine. *Frontiers in psychiatry*, 6: 1-8.
- Koob, G. y Le Moal, M. (1997). Drug abuse: hedonic homeostatic dysregulation. *Science*, 278: 52-58.
- Kostal, V., Katzenmeyer, J y Arriaga, E. (2008). Capillary electrophoresis in bioanalysis. *Analytical Chemistri*. 80 (12): 58-6.
- Kuo, S., Lo, C., Chio, C., Chang, C y Lin, M. (2007). Resuscitation from experimental traumatic brain injury by agmatine therapy. *Resuscitation*, 75: 506-514.
- Lange, E., Danhof, M., Boer, A y Breimer, D. (1997). Methodological considerations of intracerebral microdialysis in pharmacokinetic studies on drug transport across the blood–brain barrier. *Brain Research Reviews*, 25: 27-49.
- Lapchak, P., Araujo, D y Collier, B, (1989). Regulation of endogenous acetylcholine release from mammalian brain slices by opiate receptors: hippocampus, striatum and cerebral cortex of guinea-pig and rat. *Neuroscience*, 31: 313-325.
- Leach, J y Brodie, M. (1998) Tiagabine. *Lancet*, 351: 203–207.
- Li, G., Regunathan, S., Barrow, J., Eshraghi, J., Cooper R y Reis, D. (1994). Agmatine: an endogenous clonidine-displacing substance in the brain. *Science*, 263: 966 -969.
- Logrip, M., Koob, G y Zorrilla, E. (2011). Role of Corticotropin-Releasing Factor in Drug Addiction: Potential for Pharmacological Intervention. *CNS Drugs*, 25: 271-287.
- Luscher, C y Malenk, R. (2011). Drug-Evoked Synaptic Plasticity in Addiction: From Molecular Changes to Circuit Remodeling. *Neuron*, 69: 650-663.
- Martin, G., Nie, Z y Siggins, R. (1997). Mu opioid receptors modulate nmda receptor-mediated responses in nucleus accumbens neurons. *The Journal of Neuroscience*, 17(1): 11-22.
- Mitrovic, I y Napier, C. (1995). Electrophysiological demonstration of opioid μ , δ and κ receptors in the pallidum ventral. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 272: 1260-1270.
- Mogeson, G., Jones, D y Yim, C. (1980). From motivation to action functional interface between the limbic system and the motor system. *Progress in Neurobiology*, 14: 69-97.
- Moral, M y Fernández, L. (2009). Conceptos fundamentales en drogodependencias. Fernández, P., Quesada, J, Drogodependencia (3 ed.) (pp 1-25). Madrid, España: Editorial Médica Panamericana S.A.

- Moretti, M., Matheus, F., Oliveira, P., Neis, V., Ben, J., Walz, R., Rodriguez, A y Prediger, R. (2014). Role of agmatine in neurodegenerative diseases and epilepsy. *Frontiers in Bioscience*, 6: 341-359.
- Muñoz, M., Torre, E., Sánchez, P y Garzón, J. (2007). Morphine induces endocytosis of neuronal μ -opioid receptors through the sustained transfer of G α subunits to RGSZ2 proteins. *Molecular Pain*, 3 (19): 1-13.
- Napier, T. Muench, M. Maslowski, R y Battaglia, G. (1991). Is dopamine a neurotransmitter within the ventral pallidum/substantia innominata? *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 295: 183-95.
- Napier, T y Mitrovic, I. (1999). Opioid modulation of ventral pallidal inputs. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 877: 176-201.
- Nestler, E y Aghajanian, G. (1997). Molecular and cellular basis of addiction. *Science*, 278: 58-63.
- Nestler, E. (2004). Historical review: Molecular and cellular mechanisms of opiate and cocaine addiction. *Trends in Pharmacological Science*, 25: 211-218.
- Nicola, S., Surmeier, J y Malenka, R. (2000). Dopaminergic modulation of neuronal excitability in the striatum and nucleus accumbens. *Annual Review of Neuroscience*, 23:185–215.
- Olds, J y Milner, P. (1954). Positive reinforcement produced by electrical stimulation of septal area and other regions of rat brain. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 47(6): 419-427.
- Olive, F y Gass, J. (2015). Structural plasticity induced by drugs of abuse. *Frontiers in Pharmacology*, 6: 1-2.
- Olive, M y Maidment, N. (1998). Opioid regulation of pallidal enkephalin release: bimodal effects of locally administered mu and delta opioid agonists in freely moving rats. 285: 1310-1316.
- Olive, M., Anton, B., Micevych, P., Evans, C y Maidment, N. (1997). Presynaptic Versus Postsynaptic Localization of m and d Opioid Receptors in Dorsal and Ventral Striatopallidal Pathways. *The Journal of Neuroscience*, 17(19): 7471–7479.
- Olive, M., Bertolucci, M., Evans, C y Maidment, N. (1995). Microdialysis reveals a morphine- induced increase in pallidal opioid peptide release. *Neuroreport*, 6: 1093-1096.
- Olive, M y Maidment, N. (1998). Repeated heroin administration increases extracellular opioid peptide-like immunoreactivity in the globus pallidus/ventral pallidum of freely moving rats. *Psychopharmacology*, 139: 251-254.

- Otake, K., Ruggiero, D., Regunathan, S., Wang, H., Milner, T y Reis, D. (1998). Regional localization of agmatine in the rat brain: an immunocytochemical study. *Brain Research*, 787: 1-14.
- Paez, X., Rada, P y Hernandez, L. (2000). Neutral amino acids monitoring in phenylketonuric plasma microdialysates using micellar electrokinetic chromatography and laser-induced fluorescence detection. *Journal of Chromatography B*, 739: 247-254.
- Panagis, G., Miliaressis, E., Anagnostakis, Y y Spyraiki, C. (1995). Ventral pallidum self-stimulation: a moveable electrode mapping study. *Behavioural Brain Research*, 68: 165-172.
- Paxinos, G y Watson, C. (1997). The rat brain in stereotaxic coordinates. Sydney: Academic Press.
- Pierce, K y Lefkowitz, R. (2001). Classical and new roles of beta-arrestins in the regulation of G protein-coupled receptors. *Nature Review Neuroscience*, 2: 727-733.
- Pothos, E., Rada, P., Mark, G y Hoebel, B. (1991). Dopamine microdialysis in the nucleus accumbens during acute and chronic morphine, naloxone-precipitated withdrawal and clonidine treatment. *Brain Research*, 566: 348-350.
- Purves, D., Augustine, G., Fitzpatrick, D., Katz, L., LaMantia, A., y McNamara, J. (2007). Neurociencias. Buenos Aires, Argentina: Editorial Médica Panamericana.
- Qu, C., Huo, F., Huang, F y Tang, J. (2015). Activation of mu-opioid receptors in the ventrolateral orbital cortex inhibits the GABAergic miniature inhibitory postsynaptic currents in rats. *Neuroscience Letters*, 300: 1-6.
- Raasch, W., Schäfer, U., Chun, J y Dominiak, P. (2001). Biological significance of agmatine, an endogenous ligand atimidazoline binding sites. *Journal of Pharmacology*, 133: 755-780.
- Rada, P., Paez, X., Perez, J., Alba, G., Garcia, Y., Sachettoni, S., del Corral, J y Hernandez, L. (1999). Monitoring γ -aminobutyric acid in human brain and plasma microdialysis using micellar electrokinetic chromatography and laser induced fluorescence detection. *Journal of Chromatography B*, 735: 1-10.
- Rada, P., Pothos, E., Mark, G y Bartley, H. (1991). Microdialysis evidence that acetylcholine in the nucleus accumbens is involved in morphine withdrawal and its treatment with clonidine. *Brain Research*, 561: 354-356.
- Regunathan, S. (2006). Agmatine: Biological Role and Therapeutic Potentials in Morphine Analgesia and Dependence. *The American Association of Pharmaceutical Scientists Journal*, 56: 479-484
- Reis, D y Regunathan, S. (2000). Is agmatine a novel neurotransmitter in brain? *Trends in Pharmacological Sciences*, 21: 187-193.

- Revuelto, J., Egea, J., Muñoz, M y Murillo, F. (2011). La microdiálisis cerebral en el ámbito clínico actual. *Medicina Intensiva*, 36: 213-219.
- Robinson, T y Berridge, K. (1993). The neural basis of drug craving: an incentive sensitization theory of addiction. *Brain Research Reviews*, 18: 247-291.
- Robinson, T y Berridge, K. (2008). The incentive sensitization theory of addiction: some current issues. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 363: 3137- 3146.
- Root, D., Melendez, R., Zaborszky, L y Napier, C. (2015). The ventral pallidum: Subregion-specific functional anatomy and roles in motivated behaviors. *Journal Progress in Neurobiology*, 94: 1-302.
- Ruiz, M y Fuentes, J. (2008). Introducción a la Farmacología del sistema nervioso central, neurotransmisores y receptores. Farmacología básica y clínica. Madrid, España: Editorial Médica Panamericana.
- Saavedra, A., Calderón, E., Sierra, E., Cortés, C., Gaona, F y Clemente, M. (2004). Papel patofisiológico del óxido nítrico mitocondrial. *Mensaje Bioquímico*, 28: 27-43.
- Salehi, M., Kheirabadi, G., Maracy, M y Ranjkesh, M. (2011). Importance of gabapentin dose in treatment of opioid withdrawal. *Journal of Clinical Psychopharmacology*, 31: 593-596.
- Sánchez, P., Rodríguez, M y Garzón, J. (2010). Mu-opioid receptors transiently activate the akt-nNOS pathway to produce sustained potentiation of PKC mediated NMDAR-CaMKII signaling. *Plos One*, 5 (6): 1-13.
- Santoro, G., Shukla, S., Patel, K., Kaczmarzyk, J., Agorastos, S., Scherrer, S., Choi, Y., Veith, C., Carrion, J., Silverman, R., Mullin, D., Ahmed, M., Schiffer, W., Brodie, J y Dewey, S. (2016). A novel strategy for attenuating opioid withdrawal in neonates. *Journal of Addiction Research & Therapy*, 7 (4): 1-15.
- Sayin, U., Atasoy, S., Uzbay, T., Aricioglu, F y Koyuncuoglu, H. (1998). Gamma-vinyl-gaba potentiates the severity of naloxone-precipitated abstinence signs in morphine-dependent rats. *Pharmacological Research*, 38 (1): 45-51.
- Sepulveda, M., Hernández, L., Rada, P., Tucci, S y Contreras, E. (1997). Effect of the Precipitated Withdrawal on extracelular glutamate and aspartate in the nucleus accumbens of chronically morphine-treated rats: an in vivo microdialysis study. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 60: 255-262.

Sesack, S., Deutch, A., Roth, R y Bunney, B. (1989). Topographical organization of the efferent projections of the medial prefrontal cortex in the rat: an anterograde tract-tracing study with *phaseolus vulgaris leucoagglutinin*. *The Journal of Comparative Neurology*, 290: 213-242.

Shen, K. y Johnson, S. (2002). Presynaptic modulation of synaptic transmission by opioid receptor in rat subthalamic nucleus in vitro. *Journal of Physiology*, 541: 219-230.

Skirzewski, M. (2005). Neuroquímica y expresión diferencial genética de receptores del sistema colinérgico y GABAérgico en el núcleo accumbens y pálido ventral de ratas en un modelo animal de depresión. Tesis de Maestría. Universidad de los Andes, Mérida, Venezuela.

Skirzewski, M., López, W., Mosquera, E., Betancourt, L., Catlow, B., Chiurillo., Loureiro, N., Hernández, L y Rada, P. (2011). Enhanced GABAergic tone in the ventral pallidum: memory of unpleasant experiences? *Journal of Neuroscience*, 196: 131-146.

Skoubis, P y Maidment, N. (2003). Blockade of ventral pallidal opioid receptors induces a conditioned place aversion and attenuates acquisition of cocaine place preference in the rat. *Neuroscience*, 119: 241-249.

Svingos, A., Moriwaki, A., Wang, J., Uhl, G y Picke, V. (1997). Mu -opioid receptors are localized to extrasynaptic plasma membranes of gabaergic neurons and their targets in the rat nucleus accumbens. *The Journal of Neuroscience*, 17(7): 2585-2594.

Taki, K., Kaneko, T y Mizuno, N. (2000). A group of cortical interneurons expressing m-opioid receptor-like immunoreactivity: a double immunofluorescence study in the rat cerebral cortex. *Neuroscience*, 98 (2): 221-231).

Terabe, S. (1989). Electrokinetic chromatography: an interface between electrophoresis and chromatography. *Trends in Analytical Chemistry*, 8: 129-134

Torregrossa, M., Tang, X y Kalivas, P. (2008). The glutamatergic projection from the prefrontal cortex to the nucleus accumbens core is required for cocaine-induced decreases in ventral pallidal GABA. *Neuroscience Letter*, 438 (2): 142-145.

Trujillo, A y Akil, H. (1991). Inhibition of Morphine Tolerance and Dependence by the NMDA Receptor Antagonist MK-801. *Science*, 251: 85-87.

Turner, M., Lavin, A., Grace, A y Napier, C. (2001). Regulation of limbic information outflow by the subthalamic nucleus: excitatory amino acid projections to the ventral pallidum. *The Journal of Neuroscience*, 21(8): 2820-2832.

United Nations Office on Drugs and Crime, World Drug Report. (2014). (14 ed.). New York.

Unterwald, E., Horne-King, J y Kreek, M. (1992). Chronic cocaine alters brain mu opioid receptors. *Brain Research*, 584: 314-318.

Unterwald, E., Kreek, M y Cuntapay, M. (2001). The frequency of cocaine administration impacts cocaine-induced receptor alterations. *Brain Research*, 900: 103-109.

Valverde, O y Maldonado, R. (2005). Neurobiología de la adicción a opiáceos. *Adicciones*, 17(2): 41-56

Villarejo, M., Murillo, J y Alvarado, H. (2000). Farmacología de los agonistas y antagonistas de los receptores opioides. *Educación e investigación clínica*, 1: 106-137.

Volkow, N., Koob, G y McLellan, T. (2016). Neurobiologic Advances from the Brain. Disease Model of Addiction. *New England journal of medicine*, 374: 363-371.

Wamsley, J., Young, W y Kuhar, M. (1980). Immunohistochemical localization of enkephalin in rat forebrain. *Brain Research*, 190: 153-174.

Wang, W., Iyo, A., Hidalgo, J., Regunathan, S y Zhu, M. (2006). Agmatine protects against cell damage induced by NMDA and glutamate in cultured hippocampal neurons. *Brain Research*, 1084(1): 210–216.

Wang, X., Wu, N., Su, R., Lu, X., Liu, Y y Li, J. (2011). Agmatine modulates neuroadaptations of glutamate transmission in the nucleus accumbens of repeated morphine-treated rats. *European Journal of Pharmacology*, 650: 200-205.

Weng, X., Gai, X., Zheng, J y Li, J. (2003). Agmatine blocked voltage-gated calcium channel in cultured rat hippocampal neurons. *Acta Pharmacologica Sinica*, 24(8): 746-750.

Williams, J., Ingram, S., Henderson, G., Chavkin, C., Zastrow, M., Schulz, S., Koch, T., Evans, C y Christie, M. (2013). Regulation of mu-opioid receptors: desensitization, phosphorylation, internalization, and tolerance. *Pharmacological Reviews*, 65: 223- 254.

Wise, R. (1978). Catecholamine theories of reward: A critical review. *Brain Research*, 152: 215-247.

Wise, R. (1987). The role of reward pathways in the development of drug dependence. *Pharmacology & Therapeutics*, 35: 227-263.

Wise, R. (2002). Brain reward circuitry: insights from unsensed incentives. *Neuron* 36(2): 229-240.

Wise, R., Spindler, J y Gerberg, G. (1978). Neuroleptic-induced "anhedonia" in rats: pimozide blocks reward quality of food. *Science*, 201: 262-264.

- Xi, Z y Stein, E. (1998). Nucleus accumbens dopamine release modulation by mesolimbic GABAA receptors- an in vivo electrochemical study, *Brain Research*, 798: 156–165.
- Xi, Z y Stein, E. (2000). Increased mesolimbic gaba concentration blocks heroin self-administration in the rat. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 294 (2): 613-619.
- Yamamoto, B y Davy, S. (1992). Dopaminergic Modulation of Glutamate Release in Striaturas Measured by Microdialysis. *Journal of Neuroehemistry*, 58 (5): 1736-1742.
- Yananli, H., Gören, M., Berkman, K y Aricioğlu F. (2007). Effect of agmatine on brain L -citrulline production during morphine withdrawal in rats: A microdialysis study in nucleus accumbens. *Brain Research*, 1132: 51-58.
- Yang, J., Yang, H., Du, X., Ma, Q., Song, J., Chen, M., Dong, Y., Ma, L y Zheng, P. (2014). Morphine and DAMGO produce an opposite effect on presynaptic glutamate release via different downstream pathways of m opioid receptors in the basolateral amígdala. *Neuropharmacology*, 86: 353-361.
- Yang, X y Reis, D. (1999). Agmatine selectively blocks the N-Methyl- D –Aspartate subclass of glutamate receptor channels in rat hippocampal. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 288: 544-549.
- Zahm, D., Zaborszky, L., Alones, V y Heimer, L. (1984). Evidence for the coexistence of glutamate decarboxylase and Met-enkephalin immunoreactivities in axon terminals of rat ventral pallidum. *Brain Research*, 325: 317-321.
- Zhang, J., Muller, J y McDonald, A. (2015). Mu opioid receptor localization in the basolateral amygdala: an ultrastructural analysis. *Neuroscience*, 303: 352-363.