

CAMBIOS EN LA EXPRESIÓN DE PARVOALBUMINA EN NEURONAS DEL NUCLEO ACCUMBENS EN RATAS TOLERANTES A LA METADONA.

Andrés Alberto Quintero V*; Adriana Medina M.**; Mauricio Palacios G.***;
Oscar Gutiérrez M. ****

RESUMEN

Los fenómenos de tolerancia a opioides se han relacionado con modificaciones de los receptores y sus funciones en las estructuras mesolímbicas, entre ellas el Núcleo Accumbens. Este núcleo se ha vinculado directamente con la regulación opioide del dolor, por lo cual una sobreestimulación con metadona podría generar tolerancia al efecto analgésico y cambios en este núcleo. Utilizando técnicas de inmunohistoquímica se evaluó la expresión de la parvoalbúmina en las neuronas (un marcador de la homeostasis del calcio intracelular) del Núcleo Accumbens, encontrándose que existe una mayor expresión de esta proteína en animales expuestos a metadona con respecto al control, que correlacionaba con las pruebas de tolerancia analgésica. Estos hallazgos sugieren una acción de entrada de calcio, posiblemente relacionada con fenómenos de "up regulation" de los receptores NMDA en este núcleo, lo cual puede ser uno de los mecanismos plásticos de tolerancia analgésica con opioides.

Abstract

Opioid tolerance phenomena have been related to changes in receptors and their functions in mesolimbic structures, among them, the Nucleus Accumbens. This nucleus has been directly related with opioid pain regulation; therefore a methadone overstimulation could generate changes in it, and tolerance to the analgesic effect. Using immuno-histochemical techniques, the parvoalbumine expression of the Nucleus Accumbens neurons was evaluated (an intracellular calcium homeostasis marker); a greater expression of this protein was found in animals exposed to methadone than in control ones, directly correlating to the analgesic tolerance tests. These findings suggest a calcium entry action, possibly related to "Up regulation" phenomena of the NMDA receptors in this nucleus, which could be one of the plastic mechanisms of analgesic tolerance to opioids.

INTRODUCCION

Los medicamentos opioides son las sustancias más usadas para manejar dolor severo (,) pero tienen la característica de generar tolerancia, pierden su potencia analgésica cuando son usados a la misma dosis durante periodos prolongados de tiempo(). Se han descrito cambios asociados al comportamiento de los receptores opioides y cambios en la función de otros receptores no opioides como el receptor para glutamato NMDA durante las etapas de tolerancia (). Cuando un agonista opioide es administrado de forma continua, su efecto analgésico disminuye con el tiempo y se recupera al aumentar la dosis del medicamento.

Los fármacos opioides actúan en los receptores de péptidos opioides endógenos, principalmente los receptores μ y κ (). El receptor μ pertenece a la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G, y se han descrito diversos subtipos de proteínas del tipo Gi/Go asociadas a él. Entre sus acciones está la inhibición de la Adenilato Ciclasa, disminución de AMPc y secundariamente la Protein Kinasa A (PKA) (). Los receptores opioides inducen la activación de Guanilil Ciclasa y la producción de GMPC, el cual está encargado de activar la Protein Kinasa C (PKC). Se ha descrito un aumento en la conductancia al potasio por apertura de canales de K⁺ inducida por la acción de los agonistas opioides y una disminución en la conductancia al Ca⁺⁺ al inhibir los canales de calcio dependientes de voltaje (4).

Los fármacos opioides pueden inducir analgesia activando los receptores opioides que se encuentran asociados a la primera y segunda neurona nociceptiva en las láminas I, II y V de Rexed en la médula espinal, disminuyendo la liberación de neurotransmisores excitatorios como glutamato y sustancia P, al mismo tiempo

*Odontólogo. Candidato a MSc en Farmacología- Universidad del Valle.

**MD., Candidata a PhD en Ciencias Básicas, Centro de Estudios Cerebrales, Universidad del Valle.

***MD., MSc en Farmacología. Docente de Farmacología, Centro de Estudios Cerebrales, Universidad del Valle.

****MD., MSc en Farmacología. Docente de Farmacología. Universidad del Valle.

que inducen cierto grado de hiperpolarización neuronal por el aumento en la conductancia del potasio (4,11).

Además de la regulación medular, los receptores opioides se encuentran en diversas estructuras límbicas como la corteza del cíngulo, la amígdala, el hipocampo y en los núcleos hipotalámicos. Estas áreas constituyen circuitos emocionales que influyen directamente la percepción del dolor, y su participación media en gran medida el efecto analgésico de los fármacos opioides.

El Núcleo Accumbens se localiza en la región ventral del núcleo caudado, y su citoarquitectura está constituida principalmente por neuronas multipolares medianas y grandes. En los mamíferos no primates, el 90% de estas neuronas son neuronas espinosas medianas, las cuales son neuronas GABAérgicas de proyección, y el 10% son interneuronas; de estas la mayoría son interneuronas GABAérgicas, y las restantes son neuronas colinérgicas, las cuales constituyen alrededor del 1% del total de las células del núcleo (10,14).

En los últimos años se ha descrito un papel importante de los opioides en la regulación del dolor relacionada con la actividad del núcleo accumbens. En roedores, las microinyecciones de morfina en el Núcleo Accumbens revirtieron la sensación de dolor causada por la inyección plantar de capsaicina (cita). Estudios inmunohistoquímicos han mostrado una gran presencia tanto de receptores opioides como neuronas productoras de péptidos opioides en el núcleo accumbens, dando esto un sustrato biológico para la acción analgésica de los medicamentos opioides en esta área (7,8,15).

Existen diversos cambios en los receptores opioides y no opioides y en su señal de transducción asociados a los periodos de tolerancia a los medicamentos opioides.

Como se ha descrito anteriormente, los receptores opioides, vía una proteína G tipo Gi/Go, poseen la capacidad de inhibir la Adenil Ciclasa, disminuyendo los niveles de AMPc; pero durante los periodos de tolerancia se ha demostrado que la Adenil Ciclasa es activada por el receptor. Como consecuencia se observa un aumento en los niveles de AMPc y una posterior activación de la PKA. Tanto la PKA y la PKC activan una enzima GRK (G-coupled Receptor Kinase) que se encarga de fosforilar al receptor opioide, induciendo que éste se desensibilice. Una vez el receptor está fosforilado y desensibilizado, es blanco para una proteína citoplasmática, arrestina, la cual se ancla al receptor y va a inducir su posterior endocitosis (11).

Al tiempo se observa un aumento en la expresión en membrana de los receptores para glutamato NMDA, además de una sensibilización de estos receptores.

Los receptores NMDA son canales para iones de calcio, sodio y potasio. El aumento en el número de receptores aumenta también la cantidad de calcio que entra a la célula. Este estudio pretende evaluar la expresión de la proteína atrapadora de calcio parvoalbúmina en el núcleo accumbens, durante el periodo de tolerancia a los opioides.

MATERIALES Y METODOS

Modelo de tolerancia a la Metadona. Se determinaron dos grupos de 7 ratas Sprague Dawley® con peso entre 150 y 250 g de peso, los cuales se mantuvieron en las siguientes condiciones: ciclos de luz /oscuridad de 12 horas, temperatura ambiental de 27°C, con agua y alimento (Kanina de Purina) ad libitum. Al primer grupo, se le administró una dosis de 9 mg/Kg/día de metadona vía oral durante 9 días; al segundo grupo se le administró un volumen de 0.3mL de NaCl 0.9%. Después de 30 minutos de la administración del fármaco, los dos grupos de animales fueron sometidos a la prueba nociceptiva de Hot Plate.

Hot Plate. Se precalentó el dispositivo a una temperatura de 55.0°C. Se determinó el tiempo de tolerancia al estímulo calórico, retirando el animal al mostrar alguna expresión de dolor (lamerse las patas delanteras, emisión de sonido, alzar una pata cuando esta en posición anatómica). Se examinaron diariamente todos los animales durante 9 días.

Procedimiento de perfusión.

Bajo anestesia general con éter inhalado, los animales fueron perfundidos con 250 cc De solución salina 0.9% y 300 c.c. de fijador PLP (paraformaldehído - lisina-periodato a pH 4.4) . Se extrajeron los cerebros y se fijaron durante 48 horas en PLP a un volumen 10:1 del volumen del espécimen.

Procedimiento de inmunohistoquímica.

Los cerebros fijados fueron montados para cortarlos en secciones coronales de 50µm en un vibrátomo Lancer®. Las secciones seleccionadas corresponden a las coordenadas bregma anterior + 1.7 mm del atlas estereotáxico de Paxinos.

Las secciones obtenidas se procesaron flotantes en pozos individuales, donde el procedimiento de inmunohistoquímica se inició con un bloqueo con suero normal en PBS (buffer fosfato salino pH 7,5) (anti Horse

normal serum, anti mouse ABC kit, PK-6102 Vector laboratories) durante 40 minutos. Posteriormente se incubó con el anticuerpo primario anti -parvoalbúmina en una dilución 1: 5000 en PBS (anti - parvoalbumin, Sigma-Aldrich) por una hora. Después de lavar las secciones tres veces por cinco minutos con PBS, se agregó el anticuerpo secundario biotinilado (anti mouse IgG, anti mouse ABC kit, PK-6102 Vector laboratories) y se incubó por 40 minutos. Después de lavar nuevamente con PBS, se agregó avidina (A + B reagent anti mouse ABC kit, PK-6102 Vector laboratories). Luego de 40 minutos se lavó de nuevo con PBS y se reveló con diaminobenzidina - nickel (DAB brown, sk - 4100, Vector laboratories).

Las secciones procesadas se montaron en placas de vidrio preparadas con solución cromoaluminio; se dejaron secar por 24 horas y se cubrieron con cubreobjetos fijados con Permunt®.

Procedimiento de microscopía y microfotografía.

Las placas obtenidas fueron analizadas directamente por microscopía de luz para su análisis cualitativo y luego fotografiadas digitalmente para facilitar el conteo celular. Los resultados del conteo fueron analizados estadísticamente utilizando GraphPad Prims 3.0 utilizando un análisis t-student.

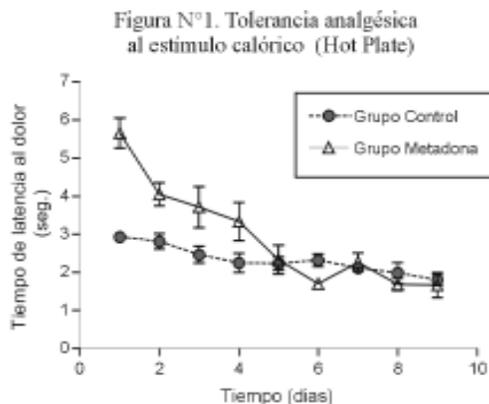
Comité de Ética

EL proyecto fue presentado y aprobado por el Comité de Ética en experimentación animal de la Facultad de Salud, de la Universidad del Valle.

RESULTADOS.

Prueba del Hot Plate

Después de 9 días de tratamiento farmacológico, el efecto analgésico evaluado en la prueba del Hot Plate mostró que el grupo con metadona disminuyó su tolerancia al dolor, hasta ser similar al control a partir del 5° día de tratamiento (Figura N°1).



Distribución de la inmunoreactividad a parvoalbúmina en el Núcleo Accumbens.

En los sujetos control, las células positivas para parvoalbúmina en el Núcleo Accumbens son neuronas multipolares medianas, con cuatro a seis troncos dendríticos de aspecto varicoso. Con esta morfología, sumada a la característica de ser positivas para parvoalbúmina sugiere que se trata de células GABAérgicas, y probablemente interneuronas (Foto N°1). Estas células reciben una poderosa aferencia glutamatérgica proveniente de la corteza cerebral.

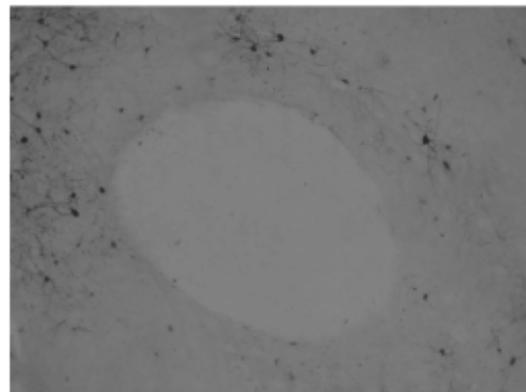


Foto N°1. Neuronas del núcleo Accumbens marcadas con parvoalbúmina, grupo control.

En los sujetos tolerantes a metadona, hay un incremento significativo del número de células marcadas para parvoalbúmina. Los árboles dendríticos de las neuronas positivas en los sujetos tolerantes son de mayor diámetro, y la extensión de las dendritas marcadas es mayor en estos casos (Foto 2).

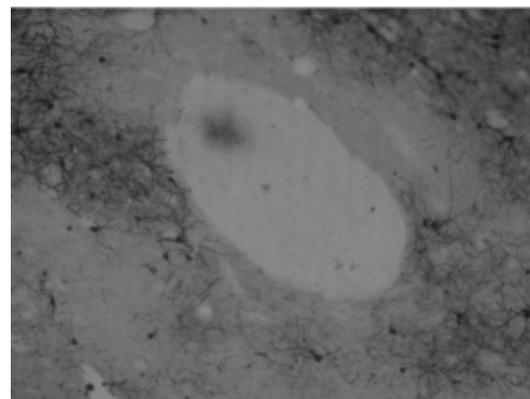


Foto N°2. Neuronas del núcleo Accumbens marcadas con parvoalbúmina, grupo con tolerancia a la metadona.

Al comparar el conteo de células en el Núcleo Accumbens, se encontró que la marcación para parvoalbúmina en las ratas control fue de 22.4 ± 3.39 células/4800 μ^2 , mientras que en los animales tratados con metadona se halló 28.89 ± 5.81 células/4800 μ^2 ($p < 0.001$), lo que significa que la expresión de esta proteína aumentó con la estimulación opioide.

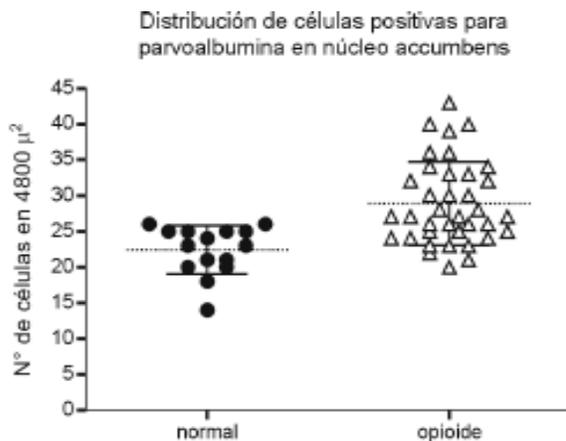


Gráfico 2. Comparación en el conteo de neuronas que expresan parvoalbúmina en el Núcleo Accumbens en los dos grupos

DISCUSION

El uso prolongado y repetido de agonistas totales opioides ha mostrado generar tolerancia al efecto analgésico de estos medicamentos. Gracias a la prueba del Hot Plate se pudo observar como el uso de un agonista total como la metadona en ratas generó tolerancia. La eficacia analgésica del medicamento varió del tal forma que al quinto día el grupo al cual se le administraba la metadona no tuvo una diferencia significativa con el grupo control respecto al tiempo de respuesta al estímulo nociceptivo generado por el Hot Plate (gráfico 1). Estos resultados están de acuerdo con otros autores que mostraron la aparición de tolerancia a la morfina al quinto día de uso en un modelo en ratas de inserción quirúrgica subcutánea de tabletas de morfina (12).

El Núcleo Accumbens es una estructura que recibe aferencias de neuronas glutamatérgicas de diferentes áreas corticales y estructuras límbicas como el hipocampo, la amígdala y la corteza prefrontal (14). En condiciones normales el Núcleo Accumbens posee una densidad moderada de receptores para glutamato del tipo NMDA. Estos receptores son canales iónicos permeables a calcio, y se ha demostrado que median fenómenos de plasticidad sináptica del tipo LTP y LTD fundamentales

en la actividad sináptica corticoestriatal. Se ha descrito una co-localización de los receptores NMDA con receptores opioides principalmente en axones, dendritas y terminales de las neuronas del Núcleo Accumbens (14,15,18). y una relación estrecha entre las funciones de estos dos sistemas de neurotransmisores. Estudios de comportamiento han mostrado que los receptores NMDA están involucrados en los procesos de tolerancia y dependencia generados por los fármacos opioides (17). Los receptores opioides regulan de forma presináptica y postsináptica la generación de potenciales postsinápticos excitatorios asociados a la función de los receptores NMDA (14)

En casos de tolerancia a fármacos opioides se ha descrito un Down-regulation de los receptores opioides y un Up-regulation de los receptores NMDA (17). Al verse aumentado el número de receptores NMDA los niveles de calcio que entran a la neurona vía este canal de iones se verán proporcionalmente aumentados. La neurona para realizar una homeostasis del calcio ejecuta cambios en sus proteínas atrapadoras de calcio como la parvoalbúmina.

Con los resultados obtenidos se puede sugerir que la estimulación de manera sostenida de los receptores opioides, induce una actividad de los receptores NMDA, que lleva a una entrada de calcio en las neuronas del Núcleo Accumbens. Estos hallazgos pueden relacionarse con los fenómenos de tolerancia analgésica observados. Aunque existen otros cambios plásticos asociados a la disminución del efecto analgésico, se podría proponer al Núcleo Accumbens como una de las regiones funcionales para plantear la búsqueda de mecanismos que disminuyan o eviten la pérdida analgésica de los medicamentos opioides.

Agradecimientos:

Este proyecto contó con la colaboración de Colciencias quien patrocinó al Dr. Andrés A. Quintero, por medio del programa "Jóvenes Investigadores". Al "Centro de Estudios Cerebrales" dirigido por el Dr. Hernán Pimienta y la Dra. Martha Escobar, por su apoyo logístico en varias de las etapas del presente proyecto.

REFERENCIAS

- Portenoy R K, Lesage P. Management of cancer pain. *Lancet* 1999; 353: 1695–1700
- Ballantyne J C. and Mao J. Opioid Therapy for Chronic Pain. *N Engl J Med* 2003;349:1943-53.
- Chavkin C., Mclaughlin J P, Cerver J P. Regulation of Opioid Receptor Function by Chronic Agonist Exposure: Constitutive Activity and Desensitization.

- Mol Pharmacol* 60:20–25, 2001
- 4 Quock R M., Burkey T H., Varga E, Hosohata Y, Hosohata K., Cowell S M, Slate C A., Ehlert F J., Roeske W R, Yamamura H I. The μ -Opioid Receptor: Molecular Pharmacology, Signal Transduction, and the Determination of Drug Efficacy. *PHARMACOLOGICAL REVIEWS* Vol. 51, No. 3. 503-532
 - 5 Hardman et al, Goodman and Gilman. Las bases farmacológicas de la terapéutica. Editorial Mc Graw Hill, novena edición, México 1996.
 - 6 Chakrabarti S, Rivera M, Yan S-z, Tang W-j., Gintzler A R. Chronic Morphine Augments Gbg/Gsa Stimulation of Adenylyl Cyclase: Relevance to Opioid Tolerance. *Molecular Pharmacology*, 54:655–662 (1998).
 - 7 Borsook D, LeBel A., McPeck B. Massachusetts General Hospital tratamiento el dolor. Editorial Marban. España 1999
 - 8 Bolay H, Moskowitz M A. Mechanisms of pain modulation in chronic syndromes. *NEUROLOGY* 2002;59(Suppl 2):S2–S7
 - 9 Haber, S. Johnson Gdowsky, M. The Basal Ganglia. In *The Human Nervous System*. Edited by Paxinos G and Mai, J. Elsevier 2004, p. 676-738.
 - 10 Svingos A L., Moriwaki A, Wang J B, Uhl G R., Pickel V M. Ultrastructural Immunocytochemical localization of m-Opioid Receptors in Rat Nucleus Accumbens: Extrasynaptic Plasmalemmal Distribution and Association with Leu5-Enkephalin. *J. Neurosci.* 1996, 16(13):4162–4173
 - 11 Tso PH, Wong YH. Molecular basis of opioid dependence: role of signal regulation by G-proteins. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2003 May-Jun;30(5-6):307-16.
 - 12 Yabaluri N, Medzihradsky F. Down-regulation of m-Opioid Receptor by Full but Not Partial Agonists Is Independent of G Protein Coupling.
 - 13 Heimer L, Zahm Ds, And Alheid GF. Basal ganglia. In: *The Rat Nervous System*, edited by Paxinos G. San Diego, CA: Academic, 1995, p. 579–628.
 - 14 Mulder Ab, Hodenpijl Mg, And Lopes Da Silva FH. Electrophysiology of the hippocampal and amygdaloid projections to the nucleus accumbens of the rat: convergence, segregation, and interaction of inputs. *J Neurosci* 18: 5095–5102, 1998.
 - 15 Gracy K. N, Svingos A L., Pickel V M. Dual Ultrastructural Localization of m-Opioid Receptors and NMDA-Type Glutamate Receptors in the Shell of the Rat Nucleus Accumbens. *J Neurosci* 15, 1997, 17(12):4839–4848
 - 16 Marek P, Ben-Ellyahu S, Gold M, Liebeskind JC (1991) Excitatory amino acid antagonists (kynureate acid and MK-801) attenuate the development of morphine tolerance in the rat. *Brain Res* 547:77–81.
 - 17 Trujillo KA (1995) Effects of noncompetitive N-methyl-D-aspartate receptor antagonists on opiate tolerance and physical dependence. *Neuropsychopharmacology* 13:301–307.
 - 18 Martin G, Nie Z, Siggins GR (1997) m-Opioid receptors modulate NMDA receptor-mediated responses in nucleus accumbens neurons. *J Neurosci* 17:11–22.
 - 19 M Jianren. NMDA and opioid receptors: their interactions in antinociception, tolerance and neuroplasticity. *Brain Research Reviews* 30 1999 289–304