



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

Modificación del proceso de adicción a la morfina por la administración de prostaglandina E2 (PGE2)

Tesis que para obtener el Grado de Doctor en Ciencias presenta Ariadna Jiménez González

Director de tesis: Dra. Claudia Gómez Acevedo

Comité tutor: Dr. Edgar Zenteno Galindo y Dr. Francisco Xavier Sotres Bayón

Ariadna Jiménez González

Ciudad de México, 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco inicialmente al programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México la oportunidad de haber realizado mis estudios de postgrado y al CONACYT por el apoyo recibido con la beca número 889179. Agradecemos también el apoyo financiero otorgado por la UNAM a través de PAPIIT (IN207928).

Aprecio infinitamente el apoyo recibido en el laboratorio de Farmacología Conductual, del Departamento de Farmacología de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Agradezco a mi tutora principal, la Dra. Claudia Gómez Acevedo con quien estaré siempre en deuda, por su paciencia, dedicación, tiempo pero sobretodo por la amistad y el apoyo incondicional que siempre me ha brindado; y a mis cotutores el Dr. Arturo Edgar Zenteno Galindo y el Dr. Francisco Sotrés Bayón por su atención, amabilidad y consejos, y en general por todo el apoyo que me ofrecieron para concluir mis estudios. Gracias a todos por sus enseñanzas.

Del mismo modo agradezco infinitamente a todos aquellos que estuvieron cerca durante estos años, entre ellos a aquellos profesores que me hicieron crecer todos los días con una enseñanza nueva: Dra. Leticia Parra Gámez, Biol. Jaquelina González Ríos, Dr. Gabriel Roldán Roldán, Dr. Marco Antonio Sotomayor y Dr. Rafael Lazo Gómez, muchas gracias a todos.

A mi compañera, quien se convirtió en mi amiga; Katia, quien estuvo durante todo el camino a mi lado, aprendiendo juntas.

A mi familia, abuela Yolanda, Ernestina, Ciro, Vladi, Carmela, mi hermano Erick, a Paulina Cruz, quienes siempre estuvieron impulsandome y quienes creyeron en mi hasta en los peores momentos.

A mis padres, quienes me dieron todo para que llegara hasta donde estoy, quienes siempre me enseñaron que yo podía lograr lo que me propusiera sin importar la dificultad, quienes me enseñaron a no tener miedo, a ellos a los que les debo TODO.

Y por supuesto a mi mejor amigo, mi maestro, mi compañero de vida, mi esposo Abraham Ochoa Aguilar. Sin ti nada de esto hubiera sido posible.

INDICE

AGRADECIMIENTOS	1
INDICE	2
ABREBIATURAS	4
RESUMEN	5
ABSTRACT	6
1. INTRODUCCIÓN	7
<i>Este proyecto nace como una estrategia para abordar un problema de salud mundial, la adicción, que actualmente carece de terapias farmacológicas seguras y eficaces. Si bien existe gran cantidad de evidencia del papel de la inflamación como mecanismo involucrado en la generación de adicción, poco se ha explorado a las moléculas pro- y anti- inflamatorias involucradas durante los procesos adictivos.</i>	7
<i>Esperamos que los datos obtenidos en este proyecto revelarán información novedosa que evidencie la importancia de los mecanismos inflamatorios como promotores y moduladores de los procesos adictivos, lo cual a su vez podría eventualmente llevar a la identificación, caracterización y evaluación de blancos farmacológicos que pudieran incorporarse como nuevos tratamientos complementarios a los esquemas actuales en el manejo terapéutico de la adicción.</i>	7
1.1. Adicción	7
1.1.1 Epidemiología	8
1.1.2 Estadios de la adicción	9
1.1.3 Sistema de recompensa	11
1.1.4 Modelos animales en el estudio de las adicciones	13
1.1.5 Neuroinmunología de las adicciones	14
1.2 Opioides	15
1.2.1 Tratamiento de la adicción a opioides	15
1.2.2 Tipos de opioide y su historia	16
1.2.3 Morfina	17
1.2.4 Fisiopatología del proceso adictivo a morfina	18
1.2.4.1 Bases neuroinmunológicas de la adicción a morfina	19
1.3 PGE2 y su relación con los procesos adictivos	22

2.RAZONAMIENTO CIENTÍFICO	23
2.1 justificación y planteamiento del problema	23
2.2 Hipótesis	24
2.3 Objetivo general	24
2.4 Objetivos particulares	24
3.MATERIAL Y MÉTODOS	24
3.1 Animales	24
3.2 Diseño experimental.	25
3.3 Cirugía para la implantación de cánula	25
3.4 Modelo de preferencia condicionada de sitio	26
3.4.1 Prueba de preferencia pre-condicionamiento	27
3.4.2 Condicionamiento	27
3.4.3 Prueba de preferencia post-condicionamiento	28
3.5 Fármacos	28
3.6 Análisis del tejido para identificar el sitio de la cánula	28
3.7 Análisis estadístico	29
4.RESULTADOS	30
4.1 Experimento 1: Para determinar la estabilidad y reproducibilidad del modelo	30
4.2 Experimento 2: Para determinar si la administración de morfina induce recompensa en el modelo de preferencia de sitio.	31
4.3 Experimento 3: Para determinar si la administración de PGE2 modifica la recompensa inducida por morfina	32
4.4 Experimento 4: para determinar si la administración de un fármaco antagonista de los receptores a PGE2 podía modificar el efecto de la prostaglandina en la recompensa inducida por morfina.	33
5.DISCUSIÓN	37
6.CONCLUSIONES	41
7.PERSPECTIVAS	42
8.REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42

ABREVIATURAS

CPP	Condicionamiento de preferencia de sitio
ICV	Intracerebroventricular
SN	Substancia Nigra
AVT	Área ventral tegmental
TH	tirosina hidroxilaza
DA	Dopamina
ED	Estriado dorsal
NAC	Núcleo accumbens
PLP	Potenciación a largo plazo
SNC	Sistema nervioso central
IP	Intraperitoneal
SC	Subcutáneo
M	Morfina
S	Control salina
SS	Control salina sham
SV	Control salina vehículo
SP	Salina con prostaglandina E2
SM	Sham con Morfina
MV	Morfina con vehículo
MP	Morfina con prostaglandina E2
ANOVA	Análisis de varianza de una vía

RESUMEN

La epidemia de adicción a opioides ha sido un problema de salud pública mundial, sin un tratamiento adecuado, que ha ido en aumento en los últimos años. Esta epidemia ha hido en incremento debido al hecho de que muchos pacientes con distintos tipos de dolor son comunmente tratados con opioides. Sin embargo, solo una pequeña fracción de pacientes con inflamación crónica desarrollan adicción. Este efecto protector puede ser debido a la Prostaglandina E2 ya que se ha encontrado que la inflamación no dolorosa inducida por carragenina reduce el reforzamiento inducido por morfina. Tomando esto en cuenta, la intención del presente estudio fue determinar si la administración de Prostaglandina E2 en el sistema nervioso central podría modular el reforzamiento inducido por la administración de morfina. Para probar esto, utilizamos el modelo de CPP con Prostaglandina E2 ICV y con antagonista del receptor de Prostaglandina E2 . Se utilizaron ratas tipo wistar macho a las cuales se les realizó una cirugía de colocación de una cánula intracerebroventricular bilateral y en el 7mo día postoperatorio se iniciaron sesiones de condicionamiento en el aparato de CPP. Se analizó la preferencia de sitio inducida por morfina S.C y como esto se veía modulado por la administración ICV de Prostaglandina E2 o su antagonista. Encontramos una reducción significativa del reforzamiento inducido por morfina posterior a la administración de Prostaglandina E2 . Por otro lado, encontramos que este efecto se abolía por el antagonismo del receptor de Prostaglandina E2 . Nuestros resultados sugieren que la Prostaglandina E2 podría disminuir el reforzamiento inducido por morfina lo que convertiría a esta molécula en una posible diana terapéutica alternativa importante a estudiar para modificar o incluso prevenir la adicción a opioides.

ABSTRACT

Opioid addiction epidemic has been an upsurging world health issue with no adequate treatment. This epidemic has been increased due to the fact that patients with several types of pain are commonly treated with opioids. However, only a small fraction of patients with chronic inflammation develop addiction. This protective effect may be due to PGE2 as it has been found that non-painful carrageenan inflammation reduces morphine induced reward. Taking this into account, the aim of this study was to determine if direct central nervous system PGE2 administration could modulate morphine induced reward. To test reward response, we used morphine conditionate place preference (CPP) model with and without PGE2 or PGE2R antagonist. Wistar rats were subject to a bilateral canula implantation surgery and conditioning sessions were initiated on the 7th post-surgical day on the conditioning placed preference apparatus. We analyzed morphine induced place preference and how central nervous system administration of either PGE2 or PGE2 antagonist could alter morphine induced CPP. We found a significant reduction of morphine induced reward after PGE2 administration. Moreover, we found that this effect was reversed by PGE2 receptor antagonism. Our data suggests that PGE2 may reduce morphine induced reward making it an important drug-target research alternative to explore the possibility of modifying or even prevent opioid addiction.

1. INTRODUCCIÓN

Este proyecto nace para abordar un problema de salud mundial, la adicción, que actualmente carece de terapias farmacológicas seguras y eficaces. Si bien existe gran cantidad de evidencia del papel de la inflamación como mecanismo involucrado en la generación de adicción, poco se ha explorado a las moléculas pro- y anti- inflamatorias involucradas durante los procesos adictivos.

Esperamos que los datos obtenidos en este proyecto revelarán información novedosa que evidencie la importancia de los mecanismos inflamatorios como promotores y moduladores de los procesos adictivos, lo cual a su vez podría eventualmente llevar a la identificación, caracterización y evaluación de blancos farmacológicos que pudieran incorporarse como nuevos tratamientos complementarios a los esquemas actuales en el manejo terapéutico de la adicción.

1.1. Adicción

La adicción, también llamada dependencia a sustancias (2, 3), es una enfermedad crónica y recidivante que se caracteriza por compulsión e impulsión en la búsqueda y la obtención de una sustancia de abuso. Esta búsqueda se da sin importar los riesgos, consecuencias y/o problemas sociales que conlleve. También involucra la dificultad para limitar su consumo y la presencia de un estado emocional lesivo conocido como síndrome de abstinencia, que se presenta cuando se limita el acceso a una sustancia de abuso (4, 5). Los conceptos de abuso de sustancias y dependencia de sustancias, antes del 2013, eran definidos como dos entidades patológicas diferentes (3); sin embargo, en últimas fechas se les define como un mismo constructo denominado: *desórdenes del uso de sustancias* y se clasifican en un rango que va de leve, moderado y severo según la cantidad de criterios diagnósticos que cumplan (5, 6). En el DSM-V el término adicción, es sinónimo de la clasificación “severo” de desórdenes del uso de sustancias. (6)

Dos características importantes de la dependencia a sustancias son la impulsión y la compulsión. La impulsión es la excitación o la tensión irresistible antes de cometer el acto, una

predisposición de tener reacciones no planeadas y rápidas sin importar las consecuencias, seguido de la culpa o arrepentimiento posterior a consumir la sustancia de abuso (5). Por el contrario, la compulsión es la ansiedad o estrés antes de cometer el acto caracterizado por acciones repetitivas o perseverantes, que se mitiga posterior al consumir la sustancia de abuso. La impulsión se asocia con el reforzamiento positivo mientras que la compulsión se asocia al reforzamiento negativo. (6, 7). A pesar de que la compulsión y la impulsión tienen respuestas contrarias, ambas coexisten en todas las etapas de la adicción (5). Existen dos tipos de comportamiento compulsivo, el consumo compulsivo de una sustancia de abuso y la búsqueda compulsiva de la sustancia de abuso (8). Ambas tienen sustratos anatómicos distintos por lo que es de suma importancia identificar en que se distinguen y conocer sus estadíos (8).

1.1.1 Epidemiología

Actualmente, las adicciones son un problema de salud mundial. Se calcula que aproximadamente 284 millones de personas hicieron uso de alguna sustancia de abuso en el año 2020; de los cuales 61.3 millones utilizaron algún tipo de opioide y solo 1 de cada 6 de estas personas se encuentran en tratamiento. Mundialmente se estiman aproximadamente 500,000 muertes al año asociadas al uso de sustancia de abuso y, de éstas, aproximadamente el 70% están relacionadas al uso de opioides de acuerdo a la organización mundial de la salud. (World Health Organization. "International Classification of Diseases for Mortality and Morbidity Statistics Eleventh Revision." World Health Organization: Geneva, Switzerland,2021). Por otro lado, se estima que 0.4% de la población de entre los 15-64 años consume opioides (9). De éstos, el 23% de los consumidores desarrollarán adicción (10). En fechas recientes, en Estados Unidos existe una crisis de muertes por sobredosis de opioides (68,630 muertes en 2020) (11); lo que sitúa a las adicciones a opioides como la primera causa de muerte por sustancia de abuso en EU (12). En México, las adicciones también representan un problema de salud pública si tomamos en cuenta la información publicada en 2021, en dónde se reporta que aproximadamente 2.5% de los mexicanos han probado un fármaco psicoactivo en el último año y que existen hasta 564,000 personas que ya han desarrollado dependencia a alguna droga psicoactiva en nuestro país (13).

1.1.2 Estadíos de la adicción

El proceso de adicción se lleva a cabo a través de tres etapas progresivas y cíclicas: 1) Intoxicación/atracones, 2) Abstinencia/afecto negativo y, 3) Preocupación/anticipación (deseo) (2, 5). Si este proceso se continúa de manera crónica se agrava, generando neuroplasticidad, cambios en el sistema de recompensa, en el sistema de estrés y en las funciones ejecutivas (5).

Intoxicación/atracones: Esta primera etapa comprende desde el inicio del consumo de la sustancia de abuso hasta cuando se terminan sus efectos hedónicos. Cuando se consume por primera vez una sustancia de abuso o, posteriormente, con las señales que se asocian a su consumo (ambientes, personas, lugares, etc.) las células del mesencéfalo liberan grandes cantidades de dopamina (14, 15). Esta liberación de dopamina se da de manera fásica activando al receptor de dopamina D1(16). La activación del receptor D1 es esencial en la primera etapa de la adicción ya que otorga las cualidades de recompensa a la sustancia de abuso y genera las respuestas de acondicionamiento, de asociación y de aprendizaje (17, 18). En humanos se han realizado estudios de imagen con tomografía por emisión de positrones dónde se encontró que el consumo de alcohol y cualquier sustancia adictiva libera dopamina y péptidos opioides en la estría ventral. (19, 20). La activación de la estría ventral lleva al reclutamiento del circuito de recompensa: estría dorsal- globo pálido – tálamo -corteza resultando en la formación de hábitos o habituación lo que lleva a la compulsión de la sustancia de abuso (21).

Abstinencia/afecto negativo: En la segunda etapa del proceso, cuando el efecto de la sustancia de abuso se disipa, se presenta el llamado síndrome de abstinencia, que se caracteriza por presentar irritabilidad, malestar, dolor físico y emocional, anhedonia, estrés crónico, depresión, ansiedad, disforia e hiperalgesia (22). Es importante comentar que una vez que el consumo de la sustancia de abuso se vuelve crónico, la misma dosis que la persona consumía de inicio no le genera la misma recompensa, hecho al que se le conoce como tolerancia. La tolerancia sucede porque, con el tiempo, la sustancia de abuso deja de liberar las mismas cantidades de dopamina que liberaba de inicio (23); y cuando esto sucede, los pacientes usualmente incrementan la dosis para lograr el mismo efecto. Cuando la sustancia de abuso se deja de

consumir, los niveles basales de dopamina se mantienen bajos, dejando al sistema de recompensa mucho menos sensible a estímulos (24, 25). De esta forma se incrementa el síndrome de abstinencia y por lo tanto las recaídas (26). El síndrome de abstinencia es una de las principales razones por la cual las personas adictas recaen. Esto es debido a que para aliviar estos síntomas vuelven a consumir la sustancia de abuso; a esto se le llama “reforzamiento negativo”(6). Por otro lado, el mismo consumo crónico y, por lo tanto, los incrementos de dopamina constantes, generan neuroplasticidad en los circuitos del sistema de recompensa y en el sistema de anti-recompensa sobre todo en la amígdala extendida (27). Normalmente el sistema de anti-recompensa se encarga de generar homeostasis en este sistema por medio de neurotransmisores como el factor liberador de corticotropina y la dinorfina (28). Sin embargo, en el cerebro de una persona adicta la neuroplasticidad generada por el consumo crónico de la sustancia de abuso hace que estos neurotransmisores y la vía hipotálamo – hipófisis – suprarrenales se encuentre desregulada. Esta desregulación causa elevación de la dinorfina, de la hormona adrenocorticotropa, corticoesterona y el factor liberador de corticotropina de la amígdala(5, 29). Todas estas alteraciones hacen que las personas se encuentren más susceptibles al estrés y a emociones negativas durante la etapa de abstinencia (25).

Preocupación/anticipación (deseo): Si la persona logra atravesar el proceso de abstinencia sin volver a consumir la sustancia de abuso, llega al estadio donde la principal manifestación es la preocupación y el deseo por la sustancia. Es durante esta etapa cuando el individuo retoma el comportamiento de búsqueda de la sustancia de abuso (5). En este estadio la principal razón de recaída ya no es para aliviar los síntomas del síndrome de abstinencia, sino la anticipación de los efectos de recompensa de la sustancia de abuso, es decir satisfacer el “deseo”(7). En estudios de imagenología se demostró que los niveles basales de dopamina en una persona con dependencia son bajos en el área orbitofrontal medial y lateral, y en el cíngulo anterior ventral y dorsal. Sin embargo, en episodios donde el deseo por sustancia de abuso está a niveles máximos se eleva la dopamina y se activa el sistema de recompensa (5). En personas dependientes, el deseo por la sustancia de abuso y por lo tanto las recaídas, pueden ocurrir por exposición temprana a las sustancia de abuso, exposición a señales que se asocian al contexto de consumo de la sustancia de abuso y por estrés (7). Cuando existe exposición temprana a sustancia de abuso se activan dos vías; neuronas dopaminérgicas que van del AVT al NAC, y

neuronas glutamatérgicas que van de la corteza prefrontal medial al núcleo acumbens y al globo pálido (30). Por otro lado, al haber exposición a señales asociadas al consumo de la sustancia de abuso, se activan proyecciones que van de la amígdala basolateral a la corteza prefrontal medial (31). Finalmente, el estrés aumenta la liberación de noradrenalina y de factor liberador de corticotropina activando la amígdala central y el núcleo de la cama de la estría terminal (4).

1.1.3 Sistema de recompensa

Los procesos adictivos tienen una relación fundamental con los efectos de la dopamina en diferentes áreas cerebrales. Considerando su importancia, primero se describirá la dopamina como molécula y sus sitios de actividad en el sistema de recompensa y posteriormente se hará una descripción de la relación entre estas diversas áreas para crear un sistema.

La DA es una catecolamina, que tiene una estructura química de catecol (un anillo de benceno con dos grupos OH, hidroxilo) con un sustituyente etilo que termina en un grupo amino (NH₂) - fenietilamina (C₈H₁₁NO₂). Se produce tanto en la SN como en el AVT por medio de un mecanismo bioquímico en el cual la fenilalanina es transformada en tirosina y posteriormente la tirosina es transformada, por medio de la enzima llamada TH, en el precursor de la dopamina la molécula conocida como L-DOPA. De hecho, uno de los métodos de medición de la dopamina es analizar la concentración de TH por inmunohistoquímica. Todos los grupos productores de DA se designan como grupo de células A. Estos grupos liberan catecolaminas, principalmente noradrenalina y dopamina, y éstos son subdivididos en grupos que contienen DA en áreas nombradas de la A8 a la A16. Las células del área A8 se encuentran principalmente en el campo retrorubral y el área A9 está localizada en la sustancia *nigra pars compacta* y tienen proyecciones al ED. Todas estas células constituyen la vía nigroestriatal, la cual está involucrada en el control motor y en el comportamiento de búsqueda de objetivos. (32, 33). Las células de las áreas A8 y A9 tienen proyecciones al estriado, a áreas del sistema límbico y a áreas corticales. Las células A10 se encuentran localizadas en el AVT y contienen proyecciones al NAC, a la corteza prefrontal y a otras áreas límbicas. Este grupo de células constituye las vías mesolímbicas y mesocorticales que están relacionadas con los reforzamientos positivos y negativos secundarios a la recompensa, así como la toma de decisiones (34). La disfunción en cualquiera de estas áreas se encuentra relacionada a diversos tipos de enfermedades

neuropsiquiátricas como la enfermedad de Parkinson, la adicción, la depresión y la esquizofrenia.

El AVT consiste en un 60-65% de neuronas dopaminérgicas, un 35% aproximadamente de neuronas GABAérgicas y en menor medida (2-3%) de neuronas glutamatérgicas (35). Las neuronas dopaminérgicas pueden ser subdivididas de acuerdo a su localización relativa a los ejes rostral/caudal o medial/lateral. Dentro de la parte lateral del AVT se encuentra un área conocida como área parabraquial pigmentada que se encuentra contigua a la sustancia nigra rostral y al núcleo paranigro. Todas estas áreas son ricas en neuronas dopaminérgicas. El AVT envía diversas proyecciones al NAC; por ejemplo, las neuronas dopaminérgicas en la región dorsolateral proyectan tanto a la corteza como al núcleo del NAC, así como a la corteza prefrontal media. Del mismo modo, las neuronas dopaminérgicas del AVT dorsomedial proyectan a la parte media de la corteza del NAC.

El NAC es el área ventral del estriado y es reconocido como el centro principal de la conducta asociada a la recompensa. Ésta incluye el aprendizaje y procesos motivacionales y está directamente relacionada con las vías dopaminérgicas del AVT. Está dividido en dos subregiones: una central llamada núcleo (“*core*” en inglés) que está localizada medial y ventralmente rodeando la comisura anterior y una capa externa conocida como corteza (“*shell*” en inglés) que se extiende lateralmente alrededor del núcleo y puede ser subdividida en área lateral y área medial. Estas estructuras son diferentes histológica, electrofisiológica y funcionalmente, y hacen conexiones aferentes y eferentes distintas, lo que sugiere que tiene funciones diferentes también (36). El NAC recibe, además de las vías dopaminérgicas provenientes del AVT, vías glutamatérgicas del hipocampo, la corteza prefrontal, la amígdala basolateral y el tálamo (37). Cabe mencionar que las vías dopaminérgicas en el AVT medial y posterior tienen proyecciones dopaminérgicas selectivas tanto al *shell* como al *core* medial mientras que las vías dopaminérgicas del AVT lateral posterior y anterior se proyectan al área lateral del *shell*. Por su parte, el núcleo recibe vías de la parte dorsal de la corteza prefrontal media y de la amígdala basolateral. Por otro lado, las proyecciones salientes también difieren entre estas regiones. Las vías principales de salida del NAC son al pálido ventral, al globo pálido y al hipotálamo lateral. El núcleo envía proyecciones al estriado dorsal y a la sustancia *nigra*

pars reticulata. La corteza, por su parte proyecta a la parte media del pálido ventral, al hipotálamo lateral, al AVT y a la amígdala central. Por lo tanto, es probable que el núcleo del NAC envíe proyecciones predominantemente al sistema motor involucrado con la ejecución de una acción mientras que la corteza esté conectada principalmente al sistema límbico subcortical. Basados en estos datos, se considera que estas estructuras tienen funciones diferentes, particularmente en relación con los comportamientos relacionados a la recompensa. Por ejemplo, se piensa que el *core* está involucrado en el aprendizaje y selección de acciones durante un comportamiento dirigido por metas mientras que el *shell* parece estar involucrado en respuestas emotivo-emocionales relacionadas con respuestas consideradas de valor (38, 39).

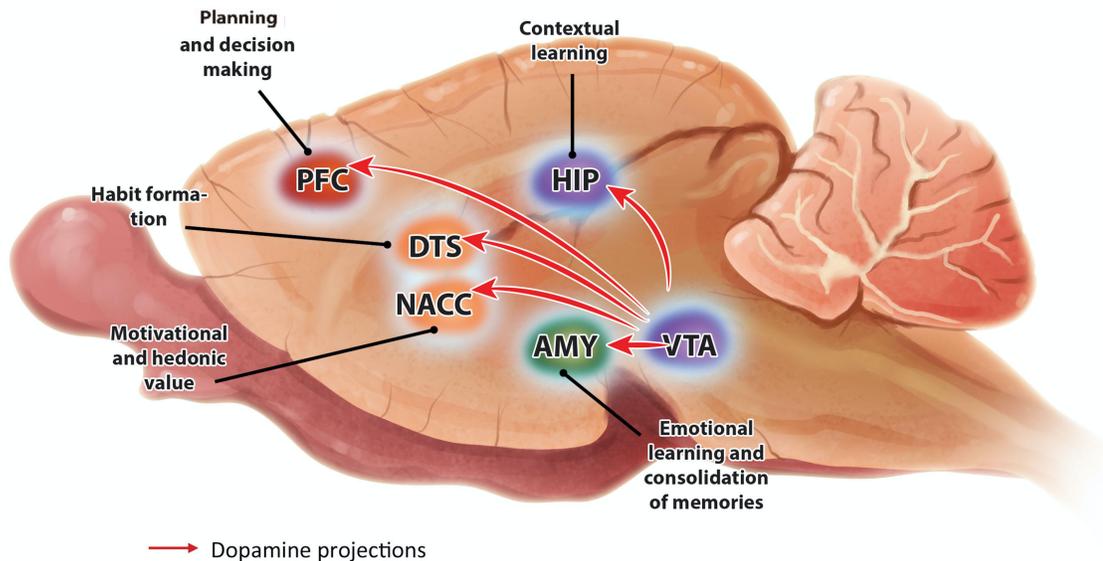


Figura 1. Sistema de recompensa (1). Esquema de las proyecciones dopaminérgicas primarias del Sistema de recompensa. El AVT (VTA) es la fuente principal de DA en el sistema de recompensa. La amígdala (AMY) contribuye en el aprendizaje emocional y la consolidación de la memoria. El NAC (NACC) es el componente central de la motivación y el valor hedónico. El ED (DTS) es la base para la formación de hábitos. La corteza prefrontal (PFC) está involucrada en la planeación y toma de decisiones. El hipocampo (HIP) es crucial en el aprendizaje asociado a contexto y a señales relacionadas con el consumo.

1.1.4 Modelos animales en el estudio de las adicciones

El estudio de las adicciones ha tenido grandes avances gracias a los modelos animales y a los estudios de imagenología en humanos. Debido a la complejidad del proceso de adicción se

han desarrollado varios modelos que intentan reproducir etapas específicas del proceso adictivo para aumentar la validez de los hallazgos; entre mayor concordancia exista entre los signos y síntomas específicos de cada etapa en particular, mayor es la validez del modelo (40).

Los especialistas reconocen que los modelos animales deben de tener 2 fortalezas principales: la habilidad para transformar a un animal sin contacto previo con el fármaco de abuso en un adicto y la capacidad de permitir el estudio de las consecuencias neuroquímicas, fisiológicas y farmacodinámicas de la exposición crónica a la sustancia de abuso. En estos modelos la variable dependiente principal es conductual, ya sea en forma de nivel de actividad, o tiempo que el animal pasa en un cuadrante relacionado con un estímulo condicionado o número de veces que presiona una palanca o cantidad total de fármaco ingerido, y se clasifican en modelos condicionados y no condicionados. En el presente proyecto utilizamos el modelo de CPP. CPP es un modelo basado en el condicionamiento clásico y ampliamente usado para estudiar conductas asociadas a la recompensa enfatizando la importancias de las señales ambientales y el contexto que son de suma importancia en el desarrollo de las conductas adictivas (41).

[1.1.5 Neuroinmunología de las adicciones](#)

En los últimos años, se ha demostrado ampliamente que el sistema inmune forma una parte crucial en el proceso de adicción (42). Cuando los opioides entran al cuerpo se genera una activación glial dependiente de TLR en la médula espinal y en el cerebro. De manera crónica las opioides generan una respuesta neuroinflamatoria, elevando los niveles de IL-1 β y TNF- α por activación del TLR4 (43). Esto lleva a un aumento del tono glutamatérgico y dopaminérgico, oponiéndose al efecto analgésico de los opioides y aumentando la dependencia, el síndrome de abstinencia y por lo tanto la adicción (7, 44).

Por otro lado, al bloquear los TLR y/o disminuir la activación glial durante el consumo de opioides, disminuye la alodinia y los efectos adversos de los opioides manteniendo su eficacia analgésica (44, 45). Además, en varios estudios se ha demostrado que el bloqueo completo o parcial de TLR4 disminuye el proceso de adicción en sus 3 estadios (7). También se ha visto que, con la administración de atenuadores de la glía, como el ibudilast, disminuye la concentración extracelular de la DA en el NAC (46) y se reduce significativamente la recompensa en el modelo de condicionamiento de preferencia de sitio (47). En otros estudios se demostró que la respuesta inflamatoria también puede afectar la liberación de dopamina en el SNC (48),

además se ha demostrado que la inflamación dolorosa inducida por carragenina disminuye la recompensa a la morfina en el modelo condicionamiento de preferencia de sitio (49). En este modelo de carragenina la respuesta inflamatoria se atribuye principalmente a la Prostaglandina E2 (50).

Las prostaglandinas son eicosanoides derivados de lípidos de membrana que cuentan con una gran variedad de funciones tanto inmunitarias como no inmunitarias. En este proyecto nos enfocaremos en la actividad de la Prostaglandina E2, debido a que existe evidencia que muestra su capacidad para suprimir rápidamente y en gran cantidad la expresión de los receptores TLR4 por incrementos en el AMPc intracelular (51). Por ejemplo, Degraaf y cols. (2014) demostraron que la administración de 200 nM DE Prostaglandina E2 es capaz de disminuir a las 24 hrs el 40% de la expresión de los receptores TLR4, y por lo tanto disminuir la liberación de TNF- α (52).

1.2 Opioides

Los opioides son un grupo de moléculas que se encuentran de manera natural en la planta *Papaver somniferum*, conocida también como planta del opio. Por más de 4,000 años, han sido usados para reducir el dolor o para causar euforia. En 1806, Sertürner aisló por primera vez el ingrediente activo de esta planta y lo llamó morfina en honor al dios griego del sueño, Morfeo. Desde su descubrimiento, este alcaloide débil fue usado para el manejo del dolor postoperatorio y como adyuvante anestésico. Por desgracia, la morfina rápidamente mostró un gran potencial adictivo, así como una baja seguridad en su uso. Debido a esto, diversos esfuerzos se han encaminado en la búsqueda de alternativas que puedan aliviar el dolor, pero sin el riesgo de inducir dependencia y/o adicción, como se describirá más adelante

1.2.1 Tratamiento de la adicción a opioides

Pese a la gran cantidad de información que se ha obtenido en los últimos años acerca de la base fisiopatológica de las adicciones, aún estamos lejos de tener un tratamiento óptimo para las personas adictas. Esta falta de eficacia en el tratamiento se debe a la alta tasa de recaídas que se presentan aún posterior a un largo periodo de abstinencia. En general se acepta que las adicciones requieren de un tratamiento multidisciplinario para lograr un control a largo plazo de la enfermedad y el automanejo de la persona adicta (53). Lo más importante para lograr un

tratamiento exitoso es que la persona se reconozca como adicto. Las personas que no se reconocen como tal o que se reconocen pero no aceptan tratamiento, generalmente dejan el tratamiento y recaen (54).

Para decir que el tratamiento fue exitoso algunos investigadores consideran que la pauta a tomar es la abstinencia mantenida. Sin embargo, la mayor parte de los profesionales de la salud reconocen como un tratamiento exitoso lograr que la persona mantenga de manera voluntaria un proceso de cambio en su estilo de vida, caracterizado por la mejora en su salud y bienestar, con una vida de auto-control, ciudadanía y esfuerzo para lograr su máximo potencial; a lo que definen como “recuperación” (54-56).

Hasta ahora el tratamiento para las adicciones que ha presentado mayor eficacia es el proporcionado por los centros de rehabilitación; en dónde se promueve la terapia individual y grupal por medio de personal calificado que los motivan a continuar en el tratamiento y a la participación de terapeutas que ayudan a eliminar los factores que predisponen al consumo de la sustancia de abuso; como el estrés ocasionado por problemas familiares, sociales y laborales. Un ejemplo de este tipo de programas es el de “Los 12 pasos” (57).

En cuanto a los tratamientos farmacológicos aún estamos muy lejos de tener un tratamiento eficaz y seguro. Actualmente los más usado como tratamiento para las adicciones a los opioides es el uso de agonistas como la metadona o agonistas parciales como la buprenorfina para disminuir los síntomas del síndrome de abstinencia y el deseo compulsivo de consumir el fármaco (58). Los antagonistas opioides como la naltrexona se usan para prevenir la muerte por sobredosis de opioides (59).

Recientemente se han empezado a probar nuevos tratamientos farmacológicos para ayudar en el tratamiento contra las adicciones; un ejemplo de esto es el ibudilast; un atenuador glial que actualmente se encuentra en protocolos clínicos.

[1.2.2 Tipos de opioide y su historia](#)

Las sustancias de tipo opioide son moléculas que pueden interactuar ya sea como agonistas o antagonistas con los receptores endógenos de opioides conocidos como Mu, Kappa y Delta. Los opioides naturales fueron conocidos por primera vez cuando en 1898 se sintetiza por primera vez la heroína y se pronunció su uso como una molécula más potente que la morfina.

En 1939 se descubre por serendipia la meperidina, la primera molécula con una estructura completamente diferente a la morfina. En 1946 se sintetiza por primera vez la metadona, una molécula no relacionada estructuralmente, pero con propiedades farmacológicas similares a la morfina. En 1942 apareció la nalorfina, considerado como el primer antagonista de opioides. Esta molécula tiene también un efecto analgésico a pesar de tener efectos antagónicos con otros opioides, debido a su capacidad de inducir respuesta agonista y antagonista al inyectarse con los receptores opioides. A pesar de su eficacia, clínicamente su uso fue moderado ya que produce ansiedad y disforia, sin embargo, esta molécula fue la precursora de la naloxona, un antagonista opioide específico (60).

Posteriormente se descubrieron algunas moléculas de tipo peptídico que pueden ejercer el efecto de los opioides de manera endógena y a estos se les dio el nombre de péptidos opioides. En 1975 se describieron por primera vez los pentapéptidos met-enkefalina y leu-enkefalina y se descubrió otra molécula que había sido previamente nombrada beta-endorfina, un fragmento de beta-lipotropina. En 1981 se descubrió otro grupo de péptidos que fueron definidos como dinorfinas. El cuerpo humano de manera endógena desarrolla estos péptidos los cuales forman parte de otra proteína precursora. En mamíferos existen 3 proteínas precursoras llamadas proencefalina, prodinorfina y proopiomelanocortina. De la proencefalina surgen seis met-enkefalinas y una leu-enkefalina. Por otro lado, de la prodinorfina también se sintetizan péptidos activos entre los que están la dinorfina A, la dinorfina B, la alfa-neoendorphina y la beta-neoendorfina. Por último, la proopiomelanocortina es precursora de la corticotropina, de la alfa-melanotropina y de la beta-endorfina.

Los opioides semisintéticos son sintetizados a partir de alcaloides opioides naturales y son estructuralmente similares a la morfina (oxicodona, hidróxido a, oximorfona y heroína). Los opioides sintéticos presentan una estructura química diferente a la morfina siendo un ejemplo muy común el fentanilo. El fentanilo fue desarrollado en 1960 y se usó inicialmente como analgésico e inductor anestésico. A partir de esa molécula surgieron otras como el sufentanil, remifentanil y el alfentanil los cuales tienen solo usos quirúrgicos (61).

[1.2.3 Morfina](#)

La morfina es un alcaloide natural que fue aislado, por primera vez en 1805, a partir de la planta del opio. Su estructura molecular fue determinada adecuadamente en 1927 y fue sintetizada

inicialmente en 1952, actualmente se formula principalmente como una sal sulfatada. Esta molécula consiste en 5 sistemas de anillos fusionados. Tiene 16 átomos de carbón siendo 5 de ellos asimétricos lo cual resulta en una levorotación molecular pronunciada, siendo activo el levoisómero mientras que el dextroisómero es inactivo. (62)

El manejo analgésico con este fármaco inicia, en pacientes que nunca han usado opioides, con una dosis baja de entre 2.5 y 10 mg por día. Esta última dosis se ha demostrado que aumenta las concentraciones plasmáticas hasta 400 ng/ml siendo la dosis mínima analgésica inicial reportada de 65 ng/ml. Una vez en suero, la vida media del fármaco se encuentra en un rango de entre 1.4 y 3.4 horas por lo que, siendo un fármaco con farmacocinética lineal, su administración clínica debe ser cada 4 horas. En cuanto a su distribución, a pesar de ser un fármaco poco liposoluble, se distribuye rápidamente del compartimento central a tejidos altamente perfundidos como los pulmones, el riñón o el hígado y tiene un volumen de distribución que oscila entre los 2.1 y los 4 L/kg. En el caso del SNC, debido a la poca solubilidad de la molécula, su paso a través de la barrera hematoencefálica es retardada y el efecto máximo no ocurre sino hasta 20 minutos después de la administración intravenosa. Posteriormente, el mecanismo de metabolismo más común de la morfina es el de la conjugación por glucuronidación, siendo el hígado el principal órgano involucrado. Este proceso aumenta la solubilidad en agua de la molécula lo que facilita su excreción. Aproximadamente el 90% de la morfina se transforma en conjugados de glucuronido como el M3G y el M6G. El M3G tiene una baja unión a los receptores de morfina, sin embargo, el M6G es un metabolito activo y tiene 45 veces más actividad que la morfina en los receptores μ cuando se administra vía intracerebroventricular. Ambos metabolitos son excretados vía renal y aumentan su tiempo de vida media en casos de insuficiencia renal (63).

[1.2.4 Fisiopatología del proceso adictivo a morfina](#)

Al igual que todas las sustancias de abuso, los opioides generan recompensa por aumento de dopamina en la vía dopaminérgica del mesencéfalo (7). De hecho, existen estudios electrofisiológicos que demuestran que la administración intravenosa, sistémica o local de la morfina incrementa la frecuencia de disparo de las neuronas dopaminérgicas del área ventral tegmental. Este aumento de frecuencia de disparo se asocia con la liberación de DA en el NAC

(64). La liberación de dopamina se debe a una desinhibición de las interneuronas inhibitorias de las neuronas dopaminérgicas del área tegmental ventral. Estas interneuronas tienen gran cantidad de receptores μ -opioides que cuando se unen opioides exógenos hiperpolarizan la membrana de las interneuronas, disminuyendo su actividad y por lo tanto la liberación de GABA (65). De esta manera al reducir la inhibición basal existe un aumento de liberación de DA en el NAC (7). Por otro lado, el consumo de opioides de manera crónica disminuye la expresión de los receptores μ en la superficie celular, reduce la afinidad que tienen estas moléculas por el receptor y por lo tanto disminuyen las señales intracelulares (66). Todo esto hace que disminuya la capacidad de los opioides para mantener un tono inhibitorio y por lo tanto la misma dosis de opioides no genera la misma liberación de dopamina.

Como ya hemos mencionado anteriormente, la dopamina es sumamente importante para generar el comportamiento de búsqueda de sustancia de abuso, sin embargo, para los efectos hedónicos, de recompensa y aprendizaje de la recompensa no es esencial (67). De hecho, se ha demostrado ampliamente que el incremento de dopamina no es la única vía por la cual los opioides generan adicción; existe evidencia de vías independientes de dopamina que generan los procesos de reforzamiento inducidos por opioides de entre los cuales, los mediados por el sistema neuroglial son los menos estudiados pero los más relevantes para nuestra investigación por lo que serán descritos a detalle en los próximos párrafos (68).

[1.2.4.1 Bases neuroinmunológicas de la adicción a morfina](#)

Como se comentó previamente, la relación que guarda el sistema inmune es fundamental para la instauración y el mantenimiento de un proceso adictivo a la morfina y a todos los opioides en general por lo que en las siguientes líneas ahondaremos más sobre esta premisa. Inicialmente discutiremos los efectos directos de la morfina en las células gliales y en el sistema neuroinmune en general. Posteriormente hablaremos de las interacciones de los opioides en la comunicación neuroglial y finalmente se expondrá cómo estos cambios producen alteraciones en la conducta de búsqueda y consumo de morfina.

Las células gliales pueden ser identificadas por marcadores generales como el IBA1, Cd11b y el CX3CR1 para la micróglia y por GFAP, S100b y GLT1 para los astrocitos. Tanto GFAP como IBA1 son marcadores que aumentan significativamente durante la activación glial o durante la presencia de daño. De hecho, como respuesta a un estímulo potencialmente dañino, se genera

una alteración morfológica y transcriptómica de ambos tipos de célula. Esta activación glial genera un aumento de tamaño del soma, un cambio de morfología y, generalmente, un aumento en la proliferación de las células. Además, una vez iniciado este proceso, tanto la microglia como los astrocitos liberan factores proinflamatorios que son, a su vez, moduladores de la respuesta neuronal y glial aledaña. De entre estas moléculas las citocinas proinflamatorias como el TNF- α , las interleucinas, las quimiocinas y/o las prostaglaninas son liberadas en una mayor concentración (69, 70). En el momento en que el complejo neuroastroglial se encuentra en contacto con una molécula opioide, se desencadenan diversos efectos. Por ejemplo, se ha encontrado que el tratamiento con morfina disminuye la expresión de las MCP-1 y MIP-1 β al mismo tiempo que aumenta la expresión de receptores CCR2b, CCR3 y CCR5 aparentemente por mecanismos involucrados en las vías MAPK y CREB (71). Del mismo modo, se ha encontrado que la activación de astrocitos con morfina induce la liberación de microRNAs como el miR-138, lo cual aumenta la activación de la microglia por un mecanismo relacionado con el TLR7 (72). Por otro lado, Liang y cols., (2016) demostraron que la morfina aumenta la síntesis de IL-1 β y la expresión del receptor P2X4R por un mecanismo dependiente del receptor TLR4 (73). Este hecho coincide con el hallazgo de una expresión aumentada de TLR4 en adolescentes, lo que podría tener relación con los mecanismos facilitadores para la adicción a opioides en aquellas personas que inician su uso durante la adolescencia (74). Por otro lado, se ha encontrado que la administración de morfina genera una liberación directa de TNF α mediada por una vía dependiente de NF-kb (75). También se ha encontrado que la exposición repetida con morfina aumenta significativamente la concentración de RNAm de la proteína CXCL12 así como su expresión en células del AVT por mecanismos epigenéticos (76). Una vez activado el sistema astroglial se genera también una alteración en los mecanismos neuronales adyacentes por varios mecanismos. Primero que nada, se ha demostrado que la liberación glial de citocinas y quimiocinas puede alterar la síntesis y liberación de diversos neurotransmisores así como la actividad neuronal y la plasticidad sináptica (77). Por otro lado, se ha demostrado en diversos estudios que el TNF α regula la actividad sináptica por mecanismos glutamatérgicos como el tráfico aumentado del receptor AMPA o la liberación de glutamato por los astrocitos (78). Al mismo tiempo, el TNF α disminuye la actividad de sinapsis inhibitorias ya que promueve la endocitosis de receptores GABA α y aumentan la excitabilidad sináptica aumentando receptores AMPA en la superficie de la célula (79). Así mismo, la IL-1 β aumenta la transmisión

excitadora del glutamato al aumentar la expresión de los receptores GluR1 en la membrana de las neuronas (80). Otras moléculas involucradas son las quimiocinas CXCL12 las cuales han mostrado ser capaces de incrementar la acción de las neuronas dopaminérgicas y cambiar el patrón de señalización de estas neuronas lo cual, aparentemente, contribuye a los efectos reforzantes de los opioides (81). Por otra parte se ha encontrado que un cofactor importante de la TH, la tetrahidrobiopterina se produce en una mayor concentración en condiciones proinflamatorias, lo que podría sugerir que la inflamación también aumenta la concentración de DA (77). También se ha encontrado que la inhibición directa de la actividad glial reduce la cantidad de dopamina liberada por la administración de morfina en células del estriado en el área del NAC. Este efecto se mantuvo incluso 3 horas después posteriores a la administración de morfina lo cual indica que la activación glial contribuye a los efectos de la morfina en la DA del NAC (46). Otro mecanismo involucrado es la creación y eliminación de sinapsis debido a la actividad glial, por ejemplo, se ha encontrado que la microglia poda sinapsis por medio de fagocitosis de las espinas dendríticas (82). De un modo diametralmente opuesto, se ha encontrado que la actividad de los astrocitos promueve la formación de sinapsis por un mecanismo mediado por medio de la secreción de trombospondinas (83). Otro tipo de mecanismo es un incremento persistente de la actividad de un complejo sináptico conocido como PLP, mismo que se encuentra relacionado no solo a las adicciones sino también en procesos importantes como la memoria. Esto cobra importancia porque se ha demostrado que los opioides inducen una PLP en vías de comunicación relacionadas con el consumo de la sustancia de abuso. Por ejemplo, se ha encontrado que, aunque de manera diferente, tanto la morfina como la heroína modulan al hipocampo por medio de PLP en ratas dependientes a opioides (84). Por otro lado, también se ha encontrado que la exposición prenatal a morfina inhibe la capacidad para generar PLP en áreas importantes para la memoria como el área CA3 del hipocampo en etapas más avanzadas del desarrollo (85).

Por último, en los próximos párrafos explicaremos la importancia de la Prostaglandina E2, una molécula en particular que ha mostrado tener una gran importancia en todos los procesos de inducción y mantenimiento de un proceso adictivo y que es la base de la investigación de esta tesis.

1.3 Prostaglandina E2 y su relación con los procesos adictivos

Como se comentó previamente, la Prostaglandina E2 es un producto de la ciclooxygenación del ácido araquidónico que es liberado por los fosfolípidos de membrana en situaciones de daño o inflamación. Por ejemplo, ha sido ampliamente demostrado que la inflamación inducida por formalina o carragenina aumenta la concentración de Prostaglandina E2 tanto a nivel local como en SNC (50). Cuando la Prostaglandina E2 se acopla a su receptor principal EP2 desata una serie de actividades antiinflamatorias que han mostrado ser relevantes para los procesos adictivos. La primera ocasión que se encontró este efecto antiinflamatorio fue cuando Zhang y colaboradores mostraron que la inyección de Prostaglandina E2 directamente en SNC alteraba la expresión de TNF α al mismo tiempo que redujo significativamente la activación microglial en el parénquima cerebral (86). Otro efecto importante que se ha encontrado de la actividad antiinflamatoria de la Prostaglandina E2 fue la protección que su administración induce en un modelo de daño neuronal inducido por hemina. Se encontró que cuando se administró un agonista específico del receptor EP2 en conjunto con la hemina se redujo un 55% del daño inducido por la hemina sin el agonista. Los autores consideraron que este efecto estaba relacionado con la actividad de AMPc y PKA (87). Otro ejemplo fue el que encontraron Liu y colaboradores cuando determinaron que la activación de receptores EP2 disminuían significativamente el daño causado por isquemia en neuronas hipocampales (88).

Aparte de que la Prostaglandina E2 ha mostrado efectos antiinflamatorios, también se ha encontrado que la actividad del receptor EP1 regula la inhibición mediada por GABA en células dopaminérgicas de la sustancia nigra pars compacta (89). Este efecto de la Prostaglandina E2 también ha mostrado estar relacionado con otras actividades dopaminérgicas como la susceptibilidad al estrés. Se encontró en un estudio de estrés social en ratones, que la vía PGE2-EP1 suprime la actividad de las neuronas dopaminérgicas del mesencéfalo y esto a su vez regula el comportamiento impulsivo. Además, se demostró que en ratones con constante fracaso social se encontraba aumentada la concentración de Prostaglandina E2 y la actividad en el receptor EP1, lo cual, como evento secundario, aparentemente lleva a una disminución de dopamina en el sistema mesocorticolímbico, lo que generaría un incremento de la evasión social en respuesta (90).

Es importante mencionar que, la actividad de la Prostaglandina E2 en los procesos adictivos y, principalmente, en los relacionados con opioides, pudiera haber sido demostrada en múltiples

ocasiones. Por ejemplo, en un estudio desarrollado por Suzuki en 1996 se encontró que en ratas tratadas con formalina y carragenina se atenuaba de manera significativa la preferencia de sitio inducida por morfina, metaanfetamina y cocaína (91). Este hallazgo corresponde con un principio clínico que ha sido ampliamente comentado en múltiples ocasiones. En pacientes que tienen dolor crónico con y sin inflamación, la probabilidad de presentar una conducta aberrante por consumo de sustancias se da en un porcentaje muy inferior a lo reportado para consumidores de opioides sin ninguna patología dolorosa siendo inferior al 0.19% comparado con el 10% reportado en condiciones no patológicas, sin embargo, no se había determinado si la inflamación por sí misma podía reducir los efectos reforzantes de la morfina (92). Tomando eso como antecedente, nuestro grupo de investigación llevó a cabo previamente un estudio en el cual se analizaba el efecto de la inflamación no dolorosa en el reforzamiento inducido por morfina encontrando que la aplicación de carragenina intraplantar sin un componente doloroso regulaba a la baja la preferencia de sitio inducida por la administración de morfina. Se encontró también que la administración de un antiinflamatorio no esteroideo en conjunto con la carragenina aumentaba de manera significativa el efecto de reforzamiento de la morfina generando una mayor preferencia de sitio (93). Con base en estos antecedentes y considerando la importancia de la actividad de Prostaglandina E2 en la respuesta inflamatoria inducida por carragenina, el presente estudio pretende demostrar que la administración de Prostaglandina E2 es directamente responsable por esta protección y que la actividad del receptor EP2 está íntimamente relacionada con la misma

2. RAZONAMIENTO CIENTÍFICO

[2.1 justificación y planteamiento del problema](#)

Este proyecto nace como una estrategia para abordar un problema de salud mundial, *la adicción*, que actualmente carece de terapias farmacológicas seguras y eficaces. Si bien existe gran cantidad de evidencia del papel de la inflamación como mecanismo involucrado en la generación de adicción, poco se ha explorado a las moléculas pro- y anti- inflamatorias involucradas durante los procesos adictivos.

Esperamos que los datos obtenidos en este proyecto revelarán información novedosa que evidencie la importancia de los mecanismos inflamatorios como promotores y moduladores de la recompensa y conductas asociadas al reforzamiento a opioides, lo cual a su vez podría

eventualmente llevar a la identificación, caracterización y evaluación de blancos farmacológicos dirigidos a ciertos receptores de Prostaglandina E2 que pudieran incorporarse como nuevos tratamientos complementarios a los esquemas actuales en el manejo terapéutico de la adicción.

2.2 Hipótesis

La administración de Prostaglandina E2 disminuirá las conductas de reforzamiento inducidas por morfina en el modelo de CPP.

2.3 Objetivo general

Evaluar el efecto de la administración en SNC de Prostaglandina E2 en la conducta de reforzamiento a la morfina en el modelo de CPP.

2.4 Objetivos particulares

1: Evaluar si la administración en SNC de la Prostaglandina E2 previene la conducta de reforzamiento a la morfina en el modelo de CPP.

2: Determinar si antagonistas del receptor E1/E2 modulan la conducta de reforzamiento a la morfina en el modelo de CPP.

3.MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 Animales

Se utilizaron ratas macho Wistar (220-280 g), los cuales fueron alojados en condiciones estandarizadas en un gabinete con control de ciclo luz/oscuridad de 12x12 hrs (luces apagadas a las 07:00 am y encendidas 07:00 pm), con temperatura y humedad estables. Se les proporcionó comida y agua *ad libitum*. Todos los procedimientos experimentales se realizaron con apego a las guías de manejo de animales de la NOM-062-ZOO-1999 y fueron aprobados por las Comisiones de Investigación y Ética de la Facultad de Medicina con el número de registro FM/DI/074/2017. El alojamiento y los experimentos se llevaron a cabo en el Departamento de Farmacología de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México. Los experimentos conductuales se realizaron en un área con iluminación controlada y atenuación de ruidos externos.

[3.2 Diseño experimental.](#)

Los animales fueron divididos aleatoriamente en los siguientes grupos experimentales:

1. Solución salina: Se condicionó administrando un volumen de 0.2 ml de Solución Salina SC. No se realizó cirugía.
2. Sham Salina: Se realizó la manipulación de la cirugía sin dejar cánulas, y se condicionó administrando un volumen de 0.2 ml de Solución Salina SC.
3. Sham Morfina: Se realizó la manipulación de la cirugía sin dejar cánulas, y se condicionó con 5 mg/kg morfina en un volumen 0.2 ml SC.
4. Morfina 5 mg/kg: Se condicionó con 5 mg/kg morfina en un volumen de 0.2 ml, SC. No se realizó cirugía.
5. Morfina 5 mg/kg + Prostaglandina E2/ICV 5 μ g: Se condicionó con 5 mg/kg morfina en un volumen de 0.2 ml SC y 5 μ g en un volumen de 5 μ L de Prostaglandina E2 ICV.
6. Morfina 5mg/kg + Prostaglandina E2 icv 5 μ g + Antagonista EP2: Se condicionó con 5 mg/kg morfina en un volumen de 0.2 ml SC y 5 μ g en un volumen de 5 μ L de Prostaglandina E2 ICV y se administró AH6809 (Antagonista EP2) 500 μ g/kg IP inmediatamente.

[3.3 Cirugía para la implantación de cánula](#)

Posterior a la preparación del área quirúrgica se realizó la inducción anestesia con una mezcla de Ketamina/Xilazina (80 y 10 mg/kg, respectivamente). Una vez que la rata estaba anestesiada, se realizó el rasurado del área quirúrgica y se colocó en el marco del estereotáxico (KOPF instruments, Tujunga, California). Se usó una solución de yodo como agente antiséptico antes de iniciar el procedimiento. Con el objetivo de disminuir el dolor post-operatorio se administró, vía SC, xilocaína (7mg/) como anestesia local. Se realizó una incisión hasta exponer Bregma y Lambda. Se obtuvo la coordenada 0 en Bregma y utilizando un taladro con fresa se realizaron dos trépanos para ambos ventrículos laterales, cuidando de no lesionar meninge, en las coordenadas: antero-posterior; -0.8. medio-lateral; + 2.5 y - 2.5; y dorso-ventral; -2.5. Utilizando estas coordenadas se introdujo la cánula doble de 0.42mm de ancho RWD®. Se fijó la cánula al cráneo con tornillos 1.4 x 2.5 mm RWD® y con resina acrílica (metilmetacrilato) Tone®. Toda la cirugía se realizó bajo microscopio.

Una vez que estaba fija la cánula bilateral se colocó el mandril (0.5 mm más largo que la cánula). Al final de la cirugía se aplicó neomicina tópica (0.350/100g) para prevenir cualquier infección

en el área quirúrgica. Los animales fueron colocados en un cojín térmico y se les aplicó gel en los ojos para evitar lesiones por ojos seco. Además, se administró 1ml de solución salina estéril (*i.p.*) para mejorar su recuperación. Su respiración y movimientos fueron vigilados hasta su completa recuperación de la anestesia. Finalmente, cada rata fue colocada en una caja individual limpia y se mantuvo en observación durante 1 semana antes de iniciar los experimentos conductuales. Durante esos 8 días de recuperación se cambió el aserrín diariamente, y se registró la cantidad de ingesta de agua y alimento.

3.4 Modelo de CPP

Para evaluar la recompensa se usó el modelo de CPP (94). Se usó el modelo sesgado, es decir que se consideró el sitio preferido basal reconocido por la rata en la prueba de preferencia precondicionamiento. El 100% de nuestras ratas prefirió de manera basal el compartimiento C. Se utilizó una caja de condicionamiento de sitio de tres compartimientos; 2 laterales (A y B) y 1 medio (C).

	A	B	C
<i>Tamaño</i>	30x23 cm	5x23 cm	30x23 cm
<i>Textura del suelo</i>	Rejilla de alambre	Liso	Liso
<i>Pared</i>	Blanca	Transparente	Rayas negras
<i>Luxes</i>	102 lx	18 lx	0.8 lx

Tabla 1. Características de la caja

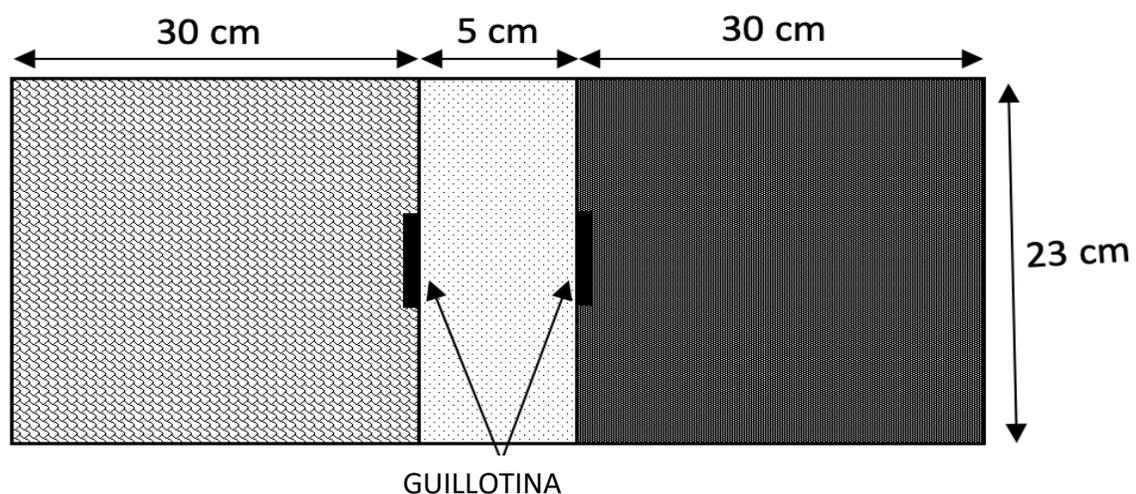


Figura 2. Aparato de Condicionamiento de Preferencia de sitio.

El modelo de CPP se realizó en un lapso de 6 días dividido en 3 fases: Prueba de preferencia pre-condicionamiento, condicionamiento y prueba de preferencia post-condicionamiento. Previo al inicio del modelo, se permitió a los animales 8 días completos de recuperación de la cirugía estereotáxica y se manipularon en el cuarto de conducta para disminuir la ansiedad.

3.4.1 Prueba de preferencia pre-condicionamiento

El día 10, las ratas se colocaron en el compartimento B y se les permitió explorar libremente la caja de conducta por 900 segundos. Su conducta fue videograbada para determinar en cuál compartimento pasaban más tiempo y así establecer su compartimento de preferencia basal.

3.4.2 Condicionamiento

El condicionamiento se llevó a cabo en 4 sesiones del día 11 al 14. Previo al inicio de cada sesión se administró la morfina por (s.c., 5 mg/kg), la Prostaglandina E2 (i.c.v.), vehículo (s.c., solución salina al 0.9%), agua estéril (i.c.v.) respectivamente. Iniciando con la administración i.c.v. y 5 minutos después la s.c. correspondiente al grupo. Inmediatamente después de la administración s.c. se colocó a la rata en el compartimento lateral correspondiente (A o C) y se dejó por 30 minutos. Se realizaron 2 sesiones alternadas por día con 6 horas de separación entre ellas (8:00 – 13:00 hrs).

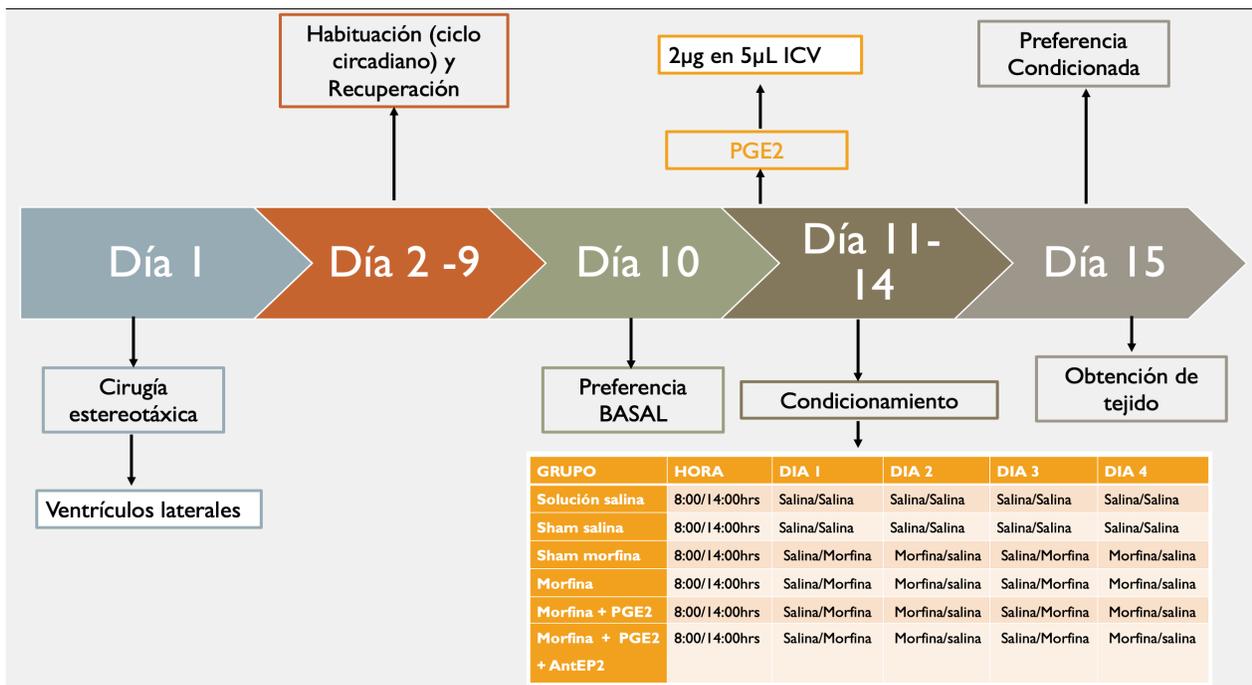


Figura 3. Tren experimental.

3.4.3 Prueba de preferencia post-condicionamiento

En el día 15 los animales fueron colocados en el compartimiento B y se les permitió libre acceso a todos los compartimientos. Se videograbó su conducta 900 segundos para definir su preferencia condicionada. Al final de la prueba de preferencia post-condicionamiento los animales pasaron directamente a fijación con paraformaldehído al 4% para el procesamiento de tejidos.

3.5 Fármacos

El sulfato de morfina (BioGenTec®) fue diluido en solución salina estéril (NaCl 0.9%) y administrada vía SC, a una dosis de 5 mg/kg. Elegimos la dosis de 5mg/kg ya que es la dosis más usada para generar reforzamiento en el modelo de CPP; además es la dosis ya usada en nuestro laboratorio.

5 μ g de Prostaglandina E2 (Sigma-Aldrich®) fueron diluidos en 5 μ l de agua destilada estéril libre de pirógenos y administrada en ambos ventrículos (i.c.v.), (95) Para elegir la dosis de la Prostaglandina E2 se revisaron dosis previamente usadas que demostraran tener actividad antiinflamatoria en SNC sin generar efectos adversos (86, 96).

El antagonista del receptor a Prostaglandina E2, AH6809 (Sigma-Aldrich®) fue disuelto en solución salina estéril y administrado vía IP a una dosis de 500 μ g/kg. La dosis se consideró de acuerdo a previos estudios donde se demuestra su efecto en SNC como antagonista (97).

3.6 Análisis del tejido para identificar el sitio de la cánula

Posterior a la prueba de preferencia post-condicionamiento, los animales fueron sometidos a eutanasia con una sobredosis de 150mg/kg en un volumen de 1ml de pentobarbital sódico (Pisobental ® 6.3g/100ml). Inmediatamente después se perfundieron con paraformaldehído al 4% y se decapitaron para la obtención del tejido cerebral. Los cerebros se mantuvieron en paraformaldehído al 4% de 3 a 6 días, para posteriormente introducirlos en una solución de sacarosa al 30% durante 3 días. Una vez pasados los 3 días se realizaron los cortes por criostato. Una vez realizados los cortes y montados en las laminillas se procedía a la tinción con violeta de cresilo y fijación. Finalmente se obtuvieron las fotos y se documentó la posición de la cánula.

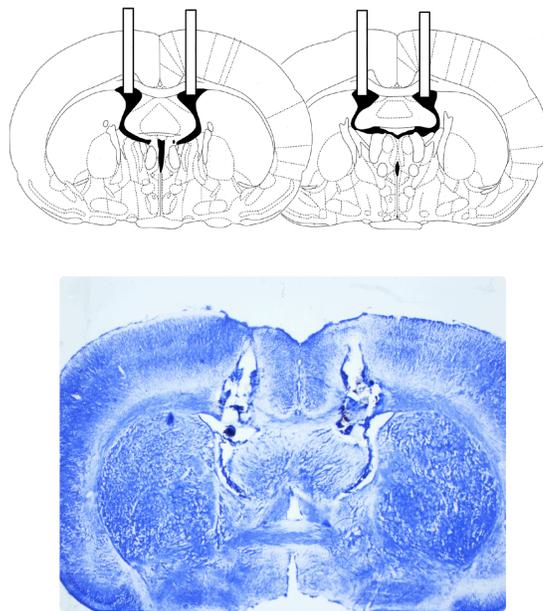


Figura 4. Identificación del sitio de la cánula con tinción de violeta de cresilo.

3.7 Análisis estadístico

El análisis de los videos del modelo de condicionamiento de preferencia de sitio se realizó con el programa OmniaIva®. Los resultados conductuales se integraron en un puntaje de CPP que es calculado al restar el tiempo total en segundos que un sujeto pasaba en el compartimiento no preferido previo al condicionamiento del tiempo total en segundos que pasaba el mismo sujeto en el compartimiento no preferido posterior al condicionamiento de acuerdo a previos trabajos (98).

$$ICPPrecompensa = (TT \text{ en el } CNP \text{ POSTC}) - (TT \text{ en el } CNP \text{ PREC})$$

TT: Tiempo Total

CNP: Compartimiento No Preferido

POSTC: Post-Condicionamiento

PREC: Pre-Condicionamiento

Todos los resultados obtenidos en este trabajo analizaron con el software Prism ® 9 (GraphPad, San Diego, California, Estados Unidos). Los datos fueron presentados en medias de grupo \pm el error estándar de las medias. La normalidad de la distribución de los datos se calculó usando

la prueba de normalidad de D' Agostino & Pearson. Las diferencias entre grupos fueron evaluados por medio del test de ANOVA, seguido de el test de comparaciones múltiples de Tukey, solo si se observaba diferencias estadísticamente significativas en ANOVA. Las diferencias se consideraron significativas a $p < 0.05$.

4.RESULTADOS

4.1 Experimento 1: Determinación de la estabilidad y reproducibilidad del modelo

En este grupo de experimentos se realizó la prueba de condicionamiento de preferencia de sitio en 4 grupos independientes ($n = 10$ ratas por grupo) diseñados para identificar si la manipulación quirúrgica, la administración de solución salina, Prostaglandina E2 o su vehículo eran capaces de inducir recompensa. Como se observa en la Figura 5, las puntuaciones de CPP obtenidas mostraron que la administración de solución salina no indujo preferencia de sitio. De manera similar, ni con la manipulación de la cirugía ni con la administración de vehículo o Prostaglandina E2 intracerebroventricular en los grupos control se alteró la preferencia de sitio. Al realizar el análisis estadístico (ANOVA de una vía, $(F_{(3,36)} = 2.773; p = 0.0554)$) no se encontró diferencia significativa entre el grupo que recibió solución salina: (S -143.5) comparado con el grupo que fue manipulado quirúrgicamente (SS -92.38), el grupo que recibió el vehículo de Prostaglandina E2 (SV -35.36), y el grupo que recibió la prostaglandina (SP-55.93), $p > 0.05$.

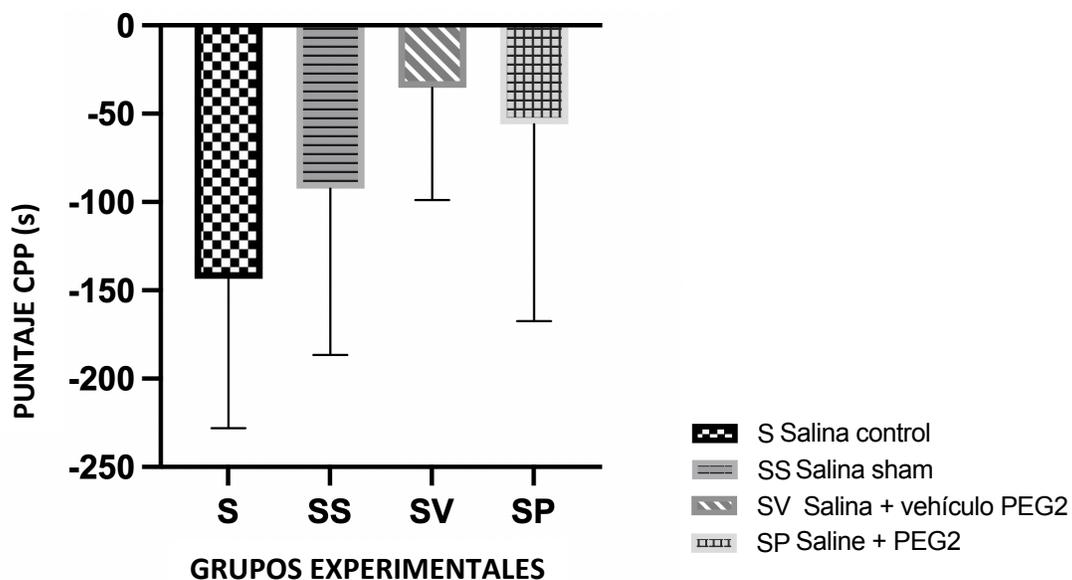


Figura 5. Efecto de diferentes condiciones experimentales en el modelo de CPP. Los resultados representan la media del puntaje de CPP \pm SEM, $n = 10$ ratas por grupo. El análisis estadístico (ANOVA de una vía) no mostró diferencia significativa entre los grupos ($F_{(3,36)} = 2.773; p = 0.0554$).

4.2 Experimento 2: Determinación del efecto de la morfina en el modelo de preferencia de sitio.

En este experimento, las ratas recibieron la administración de morfina (5mg/kg, s.c.) después de realizar la cirugía estereotáxica para la colocación de las cánulas. Las pruebas de CPP fueron realizadas en 3 grupos independientes diseñados para identificar si la manipulación quirúrgica, o la administración de solución salina o del vehículo de morfina podían inducir conducta de recompensa. Nuestros resultados muestran que todos los grupos que recibieron morfina desarrollaron preferencia por el espacio en donde recibieron el fármaco. Como se observa en la Fig. 6, la dosis de 5 mg/kg resultó óptima para inducir recompensa (puntaje de CPP = 236.4, n=10 ratas), y este efecto de la morfina no fue modificado por la manipulación quirúrgica ni por la administración del vehículo de la morfina (Puntajes de CPP = 354 y 331.5, respectivamente). El análisis estadístico (ANOVA de una vía) mostró que no existen diferencias significativas entre estos 3 grupos: $F_{(2,27)} = 2.817$; $p=0.0747$). Sin embargo, si comparamos el grupo tratado con morfina (MV: 5 mg/kg, s.c., y vehículo *i.c.v.*) y el grupo que recibió solución salina (SV: salina, s.c. y vehículo (*i.c.v.*)) observamos que morfina es capaz de inducir una respuesta de recompensa robusta y significativa. (Puntajes de CPP = 331.5 vs. -35.36, n=10 ratas, $F_{(2,27)} = 36.21$; $P < 0.0001$, figura 7).

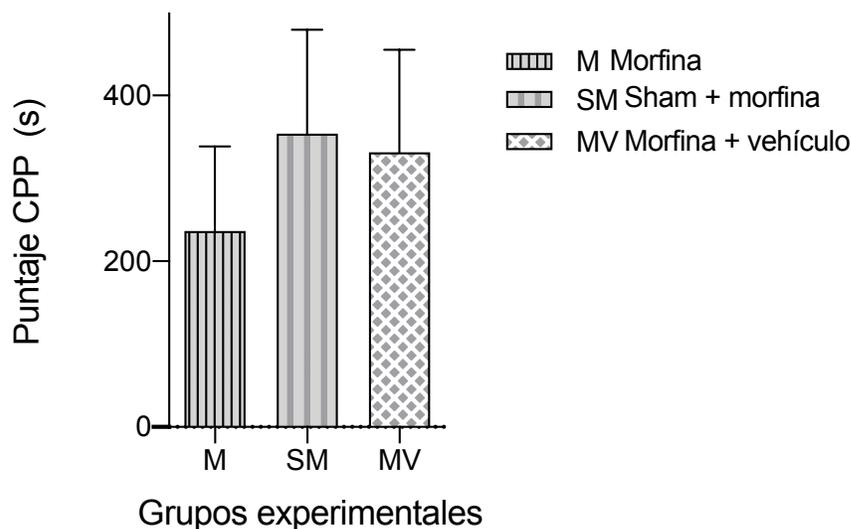


Figura 6. Efecto de la administración de morfina (5 mg/kg) en la conducta de recompensa. El análisis con ANOVA de una vía no mostró diferencia significativa entre los grupos ($F_{(2,27)} = 2.817$; $p=0.0774$).

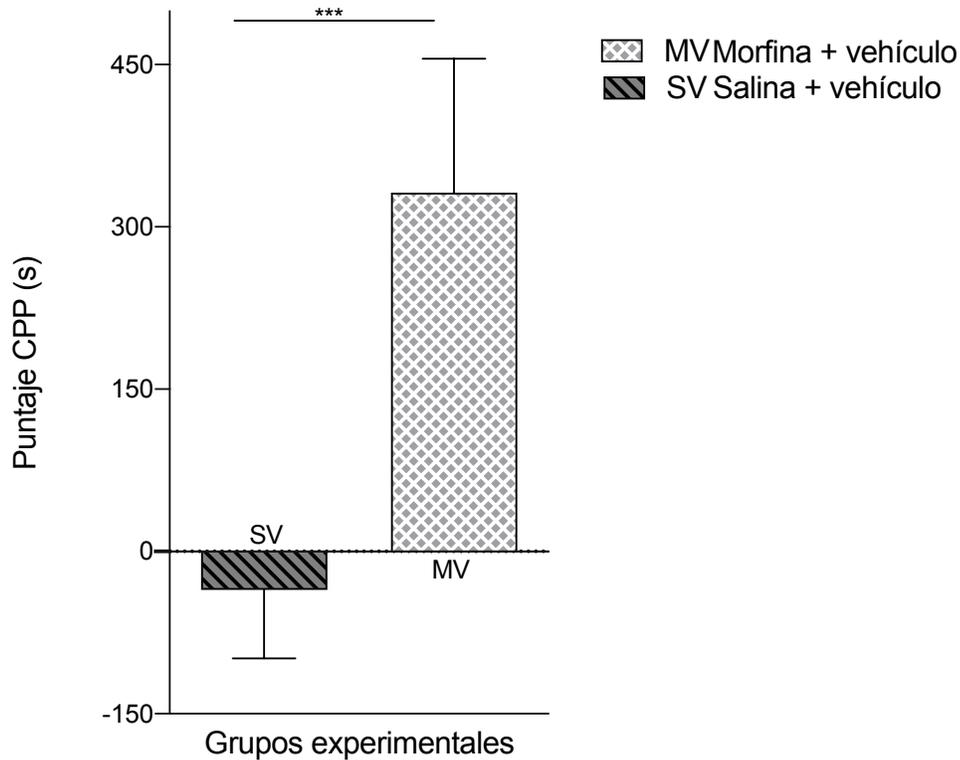


Figura 7. La gráfica muestra los puntajes de CPP obtenidos después de la administración de solución salina + vehículo (*i.c.v.*) y morfina + vehículo (*i.c.v.*). El análisis de ANOVA mostró diferencias significativas entre los grupos (los puntajes de CCP obtenidos fueron de 331.5 y -35.36, respectivamente, $n = 10$ ratas, $F_{(2,27)} = 36.21$; $*p < 0.0001$).

4.3 Experimento 3: Determinación del efecto de la administración de Prostaglandina E2 en la recompensa inducida por morfina

Posterior a la implantación de la cánula ICV, se realizó este experimento en donde los animales recibieron Prostaglandina E2 ICV y posteriormente las administración de morfina (5mg/kg, *s.c.*). Como se muestra en la figura 8, la administración de 5 μ g de Prostaglandina E2 ICV redujo significativamente el tiempo que la rata permaneció en el espacio asociado con la administración de morfina, comparado con los otros grupos experimentales. El puntaje CPP del grupo MV ($n=10$) fue de (331.5) mientras que el puntaje del grupo MP ($n=10$) fue de -63.57. El análisis estadístico mostró que las diferencias fueron significativas (ANOVA de una vía, $n = 10$ ratas por grupo, $F = 19.64$, seguido de la prueba de Tukey: $*p < 0.0001$).

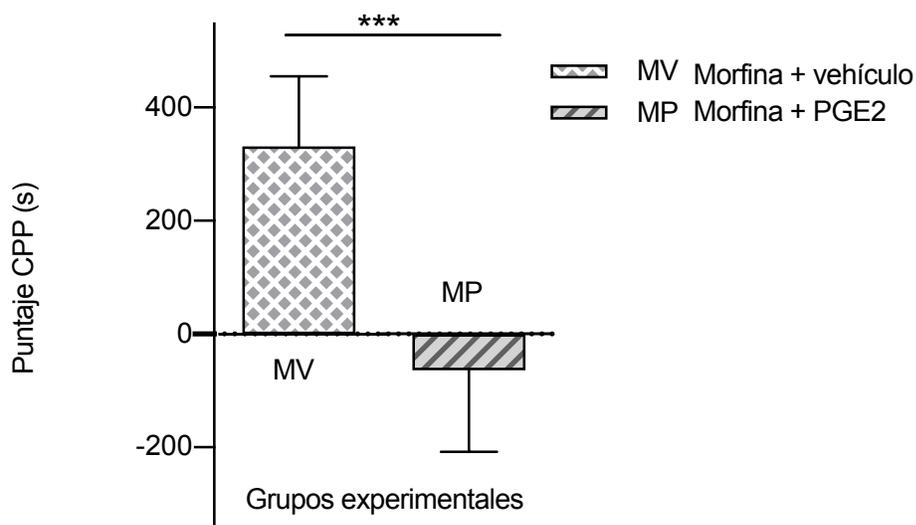


Figura 8. Efecto de la administración de PGE2 en la recompensa inducida por morfina. Las diferencias entre los grupos fueron significativas (ANOVA de una vía $F= 19.64$, seguido de la prueba de Tukey: $*p < 0.0001$).

4.4 Experimento 4: Determinación del efecto de un antagonista de los receptores a Prostaglandina E2 puede modificar el efecto de la prostaglandina en la recompensa inducida por morfina.

Por último, quisimos identificar si la administración de un fármaco antagonista del receptor a Prostaglandina E2, el AH6809, era capaz de revertir el efecto de la prostaglandina en el reforzamiento inducido por morfina. En este experimento los animales recibieron morfina después de la administración de la prostaglandina E2. La prueba de condicionamiento de sitio fue realizada en un grupo independiente de animales (MPA) que recibió morfina (5 mg/kg, *s.c.*), Prostaglandina E2 (5 μg in 5 μl , *i.c.v.*) y AH6809 (500 $\mu\text{g}/\text{kg}$, *i.p.*). Encontramos que la administración 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ del fármaco AH6809 (*i.p.*), un antagonista específico de receptor a Prostaglandina E2, disminuye significativamente el efecto causado por la prostaglandina en los animales tratados con morfina (Fig. 9: Puntajes de CCP = 180.3 y -63.57, $n = 10$, $F_{(2,27)} = 19.64$ $p < 0.001$). No se encontraron diferencias significativas entre los grupos que recibieron morfina (MV) y el grupo que recibió el antagonista del receptor a Prostaglandina E2 (MPA).

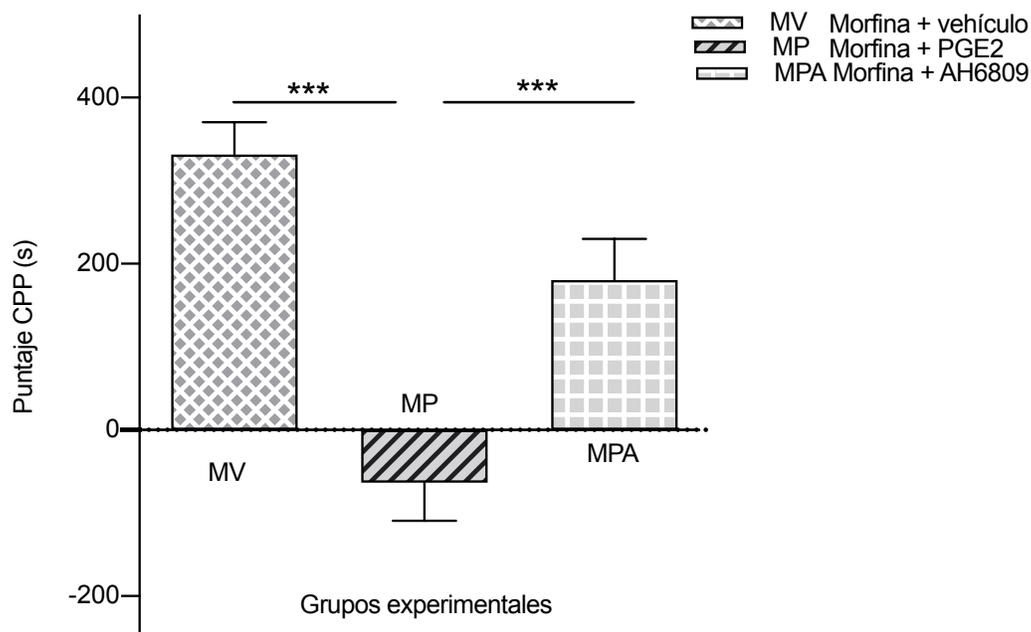


Figura 9. La administración del antagonista del receptor a PGE2 (AH6809, 500 μ g/kg) disminuyó significativamente el efecto de la PGE2 en el condicionamiento de lugar inducido por morfina. ANOVA de una vía $F_{(2,27)} = 19.64$, seguido de la prueba de Tukey * $p < 0.001$.

GRUPO	RATA	PRECONDICIONAMIENTO			POSTCONDICIONAMIENTO			INDICE CPP
		OSCURO	LUZ	TOTAL	OSCURO	LUZ	TOTAL	
SALINA	1	590.77	309.23	900	774.08	125.92	900	-183.311
	2	575.12	324.88	900	624.83	275.17	900	-49.709
	3	556.79	343.21	900	655.04	244.96	900	-98.246
	4	471.95	428.05	900	813.36	86.64	900	-341.407
	5	588.83	311.17	900	710.16	189.84	900	-121.338
	6	552.71	347.29	900	614.36	285.64	900	-61.656
	7	525.15	374.85	900	731.13	168.87	900	-205.979
	8	537.07	362.93	900	675.81	224.19	900	-138.741
	9	629.07	270.93	900	740.16	159.84	900	-111.091
	10	680.24	219.76	900	804.00	96.00	900	-123.754
SHAM SALINA	1	751.70	148.30	900	879.46	20.54	900	-127.754
	2	450.10	449.90	900	558.32	341.68	900	-108.215
	3	701.10	198.90	900	762.23	137.77	900	-61.122
	4	330.37	569.63	900	440.08	459.92	900	-109.718
	5	850.90	49.10	900	838.38	61.62	900	12.525

	6	579.36	320.64	900	782.77	117.23	900	-203.405
	7	621.95	278.05	900	848.40	51.60	900	-226.451
	8	667.54	232.46	900	811.32	88.68	900	-143.786
	9	841.88	58.12	900	761.22	138.78	900	80.661
	10	806.31	93.69	900	842.89	57.11	900	-36.573
SALINA VEHICULO	1	864.43	35.57	900	868.44	31.56	900	42.084
	2	755.21	144.79	900	811.82	88.18	900	-56.613
	3	680.56	219.44	900	784.27	115.73	900	-103.706
	4	787.78	112.22	900	771.24	128.76	900	16.533
	5	619.44	280.56	900	661.53	238.47	900	-42.084
	6	836.87	63.13	900	783.77	116.23	900	53.106
	7	877.96	22.04	900	863.93	36.07	900	14.028
	8	789.56	110.44	900	853.11	46.89	900	-63.544
	9	752.21	147.79	900	759.22	140.78	900	-7.010
	10	603.41	296.59	900	763.73	136.27	900	-160.319
SALINA PROSTAGLANDINA	1	869.44	30.56	900	879.96	20.04	900	-10.521
	2	568.34	331.66	900	656.01	243.99	900	-87.675
	3	675.05	224.95	900	581.37	318.63	900	93.687
	4	790.57	109.43	900	845.89	54.11	900	-55.317
	5	862.42	37.58	900	889.48	10.52	900	-27.055
	6	713.13	186.87	900	794.29	105.71	900	-81.162
	7	853.41	46.59	900	795.29	104.71	900	58.116
	8	529.76	370.24	900	820.34	79.66	900	-290.578
	9	713.13	186.87	900	880.96	19.04	900	-167.834
	10	775.25	124.75	900	766.23	133.77	900	9.024
MORFINA	1	744.68	155.32	900	360.24	539.76	900	384.441
	2	645.34	254.66	900	466.42	433.58	900	178.920
	3	673.21	226.79	900	495.15	404.85	900	178.056
	4	661.59	238.41	900	494.68	405.32	900	166.919
	5	646.09	253.91	900	453.90	446.10	900	192.191
	6	732.23	167.77	900	383.54	516.46	900	348.688
	7	860.39	39.61	900	531.53	368.47	900	328.860
	8	618.77	281.23	900	515.65	384.35	900	103.111
	9	692.54	207.46	900	549.95	350.05	900	142.589
	10	643.34	256.66	900	302.98	597.02	900	340.359
SHAM MORFINA	1	741.68	158.32	900	431.57	468.43	900	310.117
	2	521.25	378.75	900	332.02	567.98	900	189.223
	3	721.65	178.36	900	478.66	421.34	900	242.984
	4	656.01	243.99	900	312.83	587.17	900	343.183

	5	778.26	121.74	900	380.47	519.53	900	397.792
	6	633.47	266.53	900	269.75	630.25	900	363.724
	7	872.95	27.05	900	240.19	659.81	900	632.759
	8	372.45	527.55	900	123.75	776.25	900	248.704
	9	573.11	326.89	900	210.58	689.42	900	362.532
	10	770.33	129.67	900	321.06	578.94	900	449.263
MORFINA VEHÍCULO	1	861.92	38.08	900	438.58	461.42	900	423.343
	2	743.19	156.81	900	263.46	636.54	900	479.726
	3	675.05	224.95	900	248.93	651.07	900	426.120
	4	898.00	2.00	900	674.25	225.75	900	223.750
	5	757.72	142.28	900	547.89	352.11	900	209.828
	6	771.24	128.76	900	598.90	301.10	900	172.343
	7	665.03	234.97	900	428.56	471.44	900	236.471
	8	876.95	23.05	900	628.46	271.54	900	248.495
	9	796.29	103.71	900	303.31	596.69	900	492.981
	10	801.80	98.20	900	400.00	500.00	900	401.800
MORFINA PROSTAGLANDINA	1	774.25	125.75	900	832.37	67.63	900	-58.116
	2	700.10	199.90	900	846.89	53.11	900	-146.792
	3	794.79	105.21	900	458.12	441.88	900	336.670
	4	761.72	138.28	900	272.75	627.25	900	488.973
	5	579.86	320.14	900	820.84	79.16	900	-240.980
	6	593.89	306.11	900	814.33	85.67	900	-220.439
	7	694.09	205.91	900	854.41	45.59	900	-160.319
	8	810.82	89.18	900	791.28	108.72	900	19.539
	9	728.66	171.34	900	805.31	94.69	900	-76.653
	10	882.48	17.52	900	900.00	0.00	900	-17.518
MORFINA PROSTAGLANDINA ANTAGONISTA EP2	1	522.12	377.88	900	83.18	816.82	900	438.936
	2	746.84	153.16	900	699.80	200.20	900	47.046
	3	575.35	324.65	900	101.20	798.80	900	474.152
	4	790.78	109.22	900	649.00	251.00	900	141.782
	5	639.48	260.52	900	518.24	381.76	900	121.241
	6	795.69	104.31	900	754.71	145.29	900	40.982
	7	886.99	13.01	900	847.40	52.60	900	39.592
	8	659.52	240.48	900	539.78	360.22	900	119.738
	9	764.23	135.77	900	601.41	298.59	900	162.824
	10	750.20	149.80	900	533.77	366.23	900	216.431

Tabla 2. En esta tabla se muestran los datos en segundos de los resultados de cada uno de las ratas en los diferentes grupos.

5.DISCUSIÓN

El hallazgo más importante de este trabajo es que la administración de Prostaglandina E2 provocó una disminución significativa del reforzamiento inducido por morfina en el modelo de CPP. Este efecto fue bloqueado por la administración de un antagonista del receptor a E2. En conjunto, esta evidencia del efecto de la Prostaglandina E2 en la conducta de recompensa del modelo CPP sugiere que esta molécula podría tener efecto benéfico en alguno de los procesos neurobiológicos que están detrás de la conducta de reforzamiento al consumo de opioides en el modelo de CPP. Sabemos que algunas citocinas están involucradas en la modulación de procesos como el aprendizaje y la evocación de memorias (99), procesos fundamentales para que se presente la conducta de reforzamiento en el modelo de CPP por lo que podría ser una explicación a el efecto que observamos en nuestros experimentos.

Como fue mencionado anteriormente, en años recientes se ha generado evidencia que señala que el sistema inmune es una parte activa en el desarrollo de la adicción a los opioides. La evidencia clínica demuestra que los pacientes con dolor crónico expuestos a tratamiento con opioides tienen un riesgo mucho menor, de aproximadamente 0.19%, de desarrollar adicción al medicamento, comparado con la población general en dónde se calcula que el riesgo es del 10% (29). Esta disparidad ha dado lugar a cuestionar si, la inflamación presente en los pacientes con enfermedad crónica es la responsable de este efecto protector. En este sentido, existe evidencia reciente que relaciona a la inflamación con el proceso adictivo; por ejemplo, se ha demostrado que la administración de morfina es capaz de activar a la glía través de los receptores TLR4 de manera similar a la inducida por la administración de la endotoxina lipopolisacarido, provocando la aparición de neuroinflamación crónica (30). Además, se ha observado que cuando los opioides se administran de manera sistémica y aguda inducen una respuesta dependiente de TLR en el sistema nervioso central, pero si la administración es crónica se produce una importante elevación de los niveles de IL-1 β y TNF- α . Se ha sugerido que esta elevación en la secreción de citocinas podría estar contribuyendo en la aparición de un efecto proalgésico que a su vez incrementa las concentraciones de glutamato y dopamina, y en conjunto aumentan la dependencia a los opioides y sus efectos adictivos. Sin embargo, estos efectos son

controversiales porque también podrían inducir detrimento en la capacidad de respuesta del sistema inmune dado que existe evidencia que señala que la exposición de células NK (natural killers, por sus siglas en inglés) humanas a morfina disminuye su capacidad de inducir apoptosis (31).

Otros hallazgos recientes, incluidos los obtenidos en nuestro laboratorio, señalan que tanto la inflamación dolorosa como la no dolorosa disminuyen la conducta de recompensa inducida por opioides. Suzuki y cols. (1996) reportaron que la inflamación dolorosa inducida por la administración de carragenina disminuía la preferencia de lugar inducida por morfina (15). Posteriormente se observó que la administración de ibudilast, un fármaco antiinflamatorio inhibidor de fosfodiesterasa y regulador de la glía, reduce la concentración de dopamina extracelular en el NAC (32), y que esta disminución dopaminérgica inhibe la conducta de recompensa inducida por el opioide (33). Resultados obtenidos en nuestro laboratorio muestran que la inflamación no dolorosa inducida con carragenina disminuye el reforzamiento en el condicionamiento de lugar inducido por morfina y que este efecto puede revertirse con la administración de un inhibidor de ciclooxigenasa (13). Estos resultados señalan que el efecto de la inflamación no dolorosa podría estar relacionado con la concentración de Prostaglandina E2 dado que la administración de un fármaco inhibidor de la síntesis de prostaglandinas fue capaz de restablecer la conducta de recompensa inducida por morfina. Los resultados obtenidos en este trabajo refuerzan esta hipótesis y fortalecen la idea de que este efecto depende de Prostaglandina E2 ya que la coadministración de un antagonista del receptor E2 provocó una disminución significativa del efecto protector inducido por la administración prostaglandina E2 (Fig. 7). Sin embargo, es necesario señalar que en este trabajo sólo pudimos probar una dosis de la Prostaglandina E2, por lo que sería muy importante evaluar en el futuro si el efecto de la PGE2 se manifiesta de manera dosis dependiente.

Las prostaglandinas son moléculas de estructura eicoisanoideas derivadas de lípidos de membrana con funciones inmunes y no inmunes en el organismo. La Prostaglandina E2 suprime rápida y ampliamente la vía intracelular TLR4 afectando los niveles de AMPc (34). De hecho, se ha observado que la administración de Prostaglandina E2 disminuye en un 40% la expresión de TLR4 en macrófagos lo que a su vez disminuye la liberación de TNF- α (21). Los resultados de este trabajo sugieren que la administración de Prostaglandina E2

disminuye la expresión del receptor TLR4 en las células de la microglía de la misma manera, AMPc-dependiente, que Degraff y cols. (2014) lo describieron para macrófagos alveolares. Por lo tanto, esta reducción en la concentración de receptores TLR4 podría provocar una disminución de neuroinflamación inducida por morfina y por ende evitar la probabilidad de inducir sus efectos reforzadores y adictivos, como ha sido descrito por Wang y cols. (2012).

En este trabajo comprobamos por primera ocasión que la administración de Prostaglandina E2 ICV reduce significativamente el reforzamiento inducido por morfina en un modelo de preferencia de sitio. En este sentido es importante señalar que se llevaron a cabo diferentes aproximaciones al modelo de preferencia de sitio ya que en la literatura general no se establece por completo la mejor alternativa. Se realizaron análisis de la importancia de la iluminación, del espacio y del estado general de los animales. Esto es un punto importante ya que se ha observado que existen alteraciones en el sistema de recompensa en la respuesta a estados como el estrés inducido por factores externos como la intensidad de luz o la presencia de olores extraños (98).

Una vez definida las características físicas del modelo determinamos de manera inicial la cantidad de segundos que, un grupo de ratas sanas administradas únicamente con solución salina IP pasaba en el sitio preferido vs. el sitio no preferido encontrando un valor promedio del puntaje de CPP = -143.5 segundos. Posteriormente quisimos determinar que la inflamación secundaria a la colocación de las cánulas ICV no afectaba de manera significativa al modelo. Esto fue un paso fundamental ya que, como se comentó previamente, factores estresantes pueden afectar de manera importante los resultados del modelo. De hecho, el modelo de CPP se ha utilizado en los últimos años para analizar conductualmente la alteración de la actividad inducida por el dolor y la analgesia (100). Nuestra manipulación quirúrgica no tuvo efectos significativos. Posteriormente analizamos otras situaciones estresantes como la manipulación tanto de la rata como de la cánula con las cuales tampoco encontramos diferencia significativa como en el grupo sham salina (-92.38 s). Posteriormente quisimos determinar que la administración de Prostaglandina E2 ICV no tenía ninguna alteración de la conducta normal encontrando que presentaba una preferencia por el lado oscuro (-55.93) mostrando una igualdad estadística con los dos grupos

anteriores. Este paso fue fundamental ya que, como se ha comentado previamente, la administración de Prostaglandina E2 en el SNC tiene una gran cantidad de efectos que pudieran haber alterado nuestros resultados. Por ejemplo, se ha observado que la Prostaglandina E2 actúa directamente en el estriado por medio de los receptores EP1 (101). Esto pudiera haber alterado la actividad intrínseca de un modelo como el de preferencia de sitio ya que previamente se había demostrado que este modelo está íntimamente relacionado con la dopamina (102).

Por otro lado, para demostrar la efectividad del modelo como un mecanismo de análisis de la modulación de la conducta inducida por la administración de morfina se administraron 5 mg/kg SC a cada animal en el proceso de condicionamiento encontrando que la morfina ejerce un efecto reforzante (236.4 s) y que este efecto presenta diferencia significativa con el grupo control salina. Este efecto no se vio afectado por la colocación de la cánula ICV ni por la manipulación necesaria para hacer la cirugía ya que no se encontró una diferencia estadística entre los grupos morfina + solución salina ICV (331.5 s) ni el grupo sham morfina (354.0 s) con el grupo de morfina solamente. Este resultado podría parecer contraintuitivo ya que la inflamación derivada del proceso quirúrgico pudiera haber reducido el reforzamiento de la morfina considerando que existe, de acuerdo con nuestra hipótesis inicial, un efecto protector de la inflamación al proceso adictivo de la morfina. Sin embargo, cabe recordar que la inflamación y la respuesta glial son actividades altamente complejas que, por si solas, parecieran inducir los estados adictivos. Por ejemplo, se ha observado que mediadores inflamatorios como el TNF α activan a la microglia de una manera que tiende al desarrollo de adicción a sustancias (103). Por otro lado, consideramos que la respuesta a factores inflamatorios es muy susceptible al tiempo por lo que no sería lo mismo la inflamación secundaria a la cirugía de colocación de la cánula ICV que la presencia de factores específicos como la Prostaglandina E2 en el SNC en el momento de la administración de morfina (104).

Cuando administramos Prostaglandina E2 al mismo tiempo que administramos morfina se encontró una diferencia significativa en el tiempo pasado en el sitio no favorito comparado con los grupos morfina (-63.7 vs 236.4). Este resultado confirma la hipótesis de un efecto benéfico de la Prostaglandina E2 ante la administración de morfina. Por otro lado, pareciera ser un soporte de los resultados previos del estudio de Sotomayor-Sobrinó y cols. en el que

encontraban que la administración de carragenina intraplantar no dolorosa reducía significativamente el condicionamiento de sitio de la morfina (93). Del mismo modo, este resultado podría estar relacionado con los hallazgos clínicos mencionados anteriormente del efecto protector de la inflamación a las conductas adictivas en pacientes con dolor crónico. Posteriormente quisimos poner a prueba la hipótesis de que este efecto protector estuviera relacionado con la función de los receptores EP2 por lo que se administró un antagonista directo de estos receptores al mismo tiempo que se administraba morfina y Prostaglandina E2 ICV. Se encontró que la inhibición de Prostaglandina E2 contrarrestaba la protección previamente observada con la administración exclusiva de Prostaglandina E2 (MPA= 180.3 s vs MP -63.57 s $p < 0.05$). Esto implicaría que la actividad del receptor EP2 es determinante para ejercer un efecto protector ante la morfina.

La adicción a los opioides se ha convertido en los últimos años en una crisis de salud mundial debido no solo a la mortalidad que representa sino a los efectos deletéreos en la sociedad que lo padece. El año pasado, en los Estados Unidos de Norteamérica (EUA), se reportaron 136 muertes diarias causadas por sobredosis de opioides. Un estudio epidemiológico develó que 0.4% de la población de EUA de entre 15 y 64 años consume fármacos opioides, y hasta el 23% de ese grupo se convertirá en adicto en los siguientes años (35). Se han implementado muchas medidas para tratar de detener esta crisis, pero la falta de un tratamiento eficaz disponible para tratar a los pacientes adictos a opioides es una enorme limitante en estos esfuerzos. La búsqueda de blancos terapéuticos alternativos es fundamental; y en este sentido los expertos del Instituto Nacional en el abuso de las drogas (NIDA por sus siglas en inglés) reconocen que otras direcciones potenciales hacia las que podría dirigirse la búsqueda y desarrollo de nuevos medicamentos podría incluir blancos epigenéticos, de microRNA y neuroinmunes (1). Los resultados presentados en este trabajo muestran, por primera vez, que la administración de Prostaglandina E2 tiene un efecto de disminución del reforzamiento inducido por morfina en el modelo de CPP. Y aunque estos resultados no son relevantes como opción de tratamiento en este momento, representan un nuevo paradigma en la adicción a los opioides y su potencial tratamiento.

6.CONCLUSIONES

El trabajo en esta tesis apoya los resultados previamente publicados donde se menciona que la inflamación tiene un papel en el desarrollo de la adicción. Si bien es cierto el resultado de esta tesis solo nos da una mirada al proceso fisiológico completo, da pie a una línea de investigación que nos hable de la integración del sistema neuroinmune en el reforzamiento inducido por fármacos.

7.PERSPECTIVAS

Por último, y a pesar de la importancia de los presentes resultados, es importante resaltar que falta una gran cantidad de información por determinar. Por ejemplo, futuras líneas de investigación deberán ser llevadas a cabo para encontrar la relación que guardan otros receptores de Prostaglandina E2 como el EP1, 3 y 4 en los efectos protectores que hemos encontrado. Por otro lado, existe aún la incógnita de si otras prostaglandinas pudieran tener un efecto similar. También debe ser considerada la respuesta glial y los efectos de la administración de la Prostaglandina E2 en sus cambios fenotípicos y genotípicos con la administración de morfina.

8.REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Jiménez-González A, Gómez-Acevedo C, Ochoa-Aguilar A, Chavarría A. The Role of Glia in Addiction: Dopamine as a Modulator of Glial Responses in Addiction. *Cellular and Molecular Neurobiology*. 2022;42(7):2109-20.
2. Koob GF, Le Moal M. Drug abuse: hedonic homeostatic dysregulation. *Science*. 1997;278(5335):52-8.
3. Edition F, Association AP. Diagnostic and statistical manual of mental disorders: Washington, American Psychological Association; 1994.
4. Koob GF, Volkow ND. Neurocircuitry of addiction. *Neuropsychopharmacology*. 2010;35(1):217-38.
5. Koob GF, Volkow ND. Neurobiology of addiction: a neurocircuitry analysis. *The Lancet Psychiatry*. 2016;3(8):760-73.
6. Association AP. Diagnostic and statistical manual of mental disorders (DSM-5®): American Psychiatric Pub; 2013.
7. Jacobsen J, Watkins LR, Hutchinson MR. Discovery of a novel site of opioid action at the innate immune pattern-recognition receptor TLR4 and its role in addiction. *Int Rev Neurobiol*. 2014;118:129-63.
8. Lüscher C, Robbins TW, Everitt BJ. The transition to compulsion in addiction. *Nature Reviews Neuroscience*. 2020:1-17.

9. Crime UNOoDa. World Drug Report publication UN, editor. New York United Nations Office on Drugs and Crime; 2016. 174 p.
10. Degenhardt L, Charlson F, Mathers B, Hall WD, Flaxman AD, Johns N, et al. The global epidemiology and burden of opioid dependence: results from the global burden of disease 2010 study. *Addiction*. 2014;109(8):1320-33.
11. Hedegaard H, Miniño A, Spencer MR, Warner M. Drug overdose deaths in the United States, 1999–2020. NCHS data brief. 2022(428).
12. Madras BK. The Surge of Opioid Use, Addiction, and Overdoses: Responsibility and Response of the US Health Care System. *JAMA psychiatry*. 2017.
13. Villatoro J, Medina-Mora M, Fleiz Bautista C, Moreno López M, Oliva Robles N, Bustos Gamiño M, et al. El consumo de drogas en México: Resultados de la Encuesta Nacional de Adicciones, 2011. *Salud mental*. 2012;35(6):447-57.
14. Schultz W, Dayan P, Montague PR. A neural substrate of prediction and reward. *Science*. 1997;275(5306):1593-9.
15. Di Chiara G. Nucleus accumbens shell and core dopamine: differential role in behavior and addiction. *Behavioural brain research*. 2002;137(1):75-114.
16. Ungless MA, Whistler JL, Malenka RC, Bonci A. Single cocaine exposure in vivo induces long-term potentiation in dopamine neurons. *Nature*. 2001;411(6837):583-7.
17. Caine SB, Thomsen M, Gabriel KI, Berkowitz JS, Gold LH, Koob GF, et al. Lack of self-administration of cocaine in dopamine D1 receptor knock-out mice. *Journal of Neuroscience*. 2007;27(48):13140-50.
18. Zweifel LS, Parker JG, Lobb CJ, Rainwater A, Wall VZ, Fadok JP, et al. Disruption of NMDAR-dependent burst firing by dopamine neurons provides selective assessment of phasic dopamine-dependent behavior. *Proceedings of the national academy of sciences*. 2009;106(18):7281-8.
19. Volkow ND, Fowler JS, Wang G-J. The addicted human brain: insights from imaging studies. *The Journal of clinical investigation*. 2003;111(10):1444-51.
20. Mitchell JM, O'Neil JP, Janabi M, Marks SM, Jagust WJ, Fields HL. Alcohol consumption induces endogenous opioid release in the human orbitofrontal cortex and nucleus accumbens. *Science translational medicine*. 2012;4(116):116ra6-ra6.
21. Belin D, Jonkman S, Dickinson A, Robbins TW, Everitt BJ. Parallel and interactive learning processes within the basal ganglia: relevance for the understanding of addiction. *Behavioural brain research*. 2009;199(1):89-102.
22. Cushman P, Dole VP. Detoxification of rehabilitated methadone-maintained patients. *Jama*. 1973;226(7):747-52.
23. Zhang Y, Schlussman SD, Rabkin J, Butelman ER, Ho A, Kreek MJ. Chronic escalating cocaine exposure, abstinence/withdrawal, and chronic re-exposure: effects on striatal dopamine and opioid systems in C57BL/6J mice. *Neuropharmacology*. 2013;67:259-66.
24. Hägele C, Schlagenhauf F, Rapp M, Sterzer P, Beck A, Berman F, et al. Dimensional psychiatry: reward dysfunction and depressive mood across psychiatric disorders. *Psychopharmacology*. 2015;232(2):331-41.
25. Kaufling J, Aston-Jones G. Persistent adaptations in afferents to ventral tegmental dopamine neurons after opiate withdrawal. *Journal of Neuroscience*. 2015;35(28):10290-303.
26. Koob GF. Addiction is a reward deficit and stress surfeit disorder. *Frontiers in psychiatry*. 2013;4.
27. Jennings JH, Sparta DR, Stamatakis AM, Ung RL, Pleil KE, Kash TL, et al. Distinct extended amygdala circuits for divergent motivational states. *Nature*. 2013;496(7444):224-8.

28. Volkow ND, Koob GF, McLellan AT. Neurobiologic advances from the brain disease model of addiction. *New England Journal of Medicine*. 2016;374(4):363-71.
29. Koob GF, Buck CL, Cohen A, Edwards S, Park PE, Schlosburg JE, et al. Addiction as a stress surfeit disorder. *Neuropharmacology*. 2014;76:370-82.
30. Bossert JM, Marchant NJ, Calu DJ, Shaham Y. The reinstatement model of drug relapse: recent neurobiological findings, emerging research topics, and translational research. *Psychopharmacology*. 2013;229(3):453-76.
31. Feltenstein M, See R. The neurocircuitry of addiction: an overview. *British journal of pharmacology*. 2008;154(2):261-74.
32. Hornykiewicz O. Dopamine (3-hydroxytyramine) and brain function. *Pharmacological reviews*. 1966;18(2):925-64.
33. German DC, Manaye KF. Midbrain dopaminergic neurons (nuclei A8, A9, and A10): three-dimensional reconstruction in the rat. *Journal of Comparative Neurology*. 1993;331(3):297-309.
34. Bromberg-Martin ES, Matsumoto M, Hikosaka O. Dopamine in motivational control: rewarding, aversive, and alerting. *Neuron*. 2010;68(5):815-34.
35. Morales M, Margolis EB. Ventral tegmental area: cellular heterogeneity, connectivity and behaviour. *Nature Reviews Neuroscience*. 2017;18(2):73-85.
36. Salgado S, Kaplitt MG. The nucleus accumbens: a comprehensive review. *Stereotactic and functional neurosurgery*. 2015;93(2):75-93.
37. Groenewegen H, Vermeulen-Van der Zee Et, Te Kortschot A, Witter M. Organization of the projections from the subiculum to the ventral striatum in the rat. A study using anterograde transport of Phaseolus vulgaris leucoagglutinin. *Neuroscience*. 1987;23(1):103-20.
38. Groenewegen HJ, Berendse HW. Connections of the subthalamic nucleus with ventral striatopallidal parts of the basal ganglia in the rat. *Journal of comparative neurology*. 1990;294(4):607-22.
39. Carelli RM. Nucleus accumbens cell firing and rapid dopamine signaling during goal-directed behaviors in rats. *Neuropharmacology*. 2004;47:180-9.
40. Geyer MA aMA. Animal models of psychiatric disorders. In *Psychopharmacology: The Fourth Generation of Progress*, (F E Bloom, D J Kupfer, Eds). 1995;New York: Raven Press:787-98.
41. McKendrick G, Garrett H, Tanniru S, Ballard S, Sun D, Silberman Y, et al. A novel method to study reward-context associations and drug-seeking behaviors. *Journal of Neuroscience Methods*. 2020;343:108857.
42. Cui C, Shurtleff D, Harris RA. Neuroimmune mechanisms of alcohol and drug addiction. *International review of neurobiology*. 2014;118:1.
43. Wang X, Loram LC, Ramos K, de Jesus AJ, Thomas J, Cheng K, et al. Morphine activates neuroinflammation in a manner parallel to endotoxin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2012;109(16):6325-30.
44. Hutchinson MR, Bland ST, Johnson KW, Rice KC, Maier SF, Watkins LR. Opioid-induced glial activation: mechanisms of activation and implications for opioid analgesia, dependence, and reward. *The Scientific World Journal*. 2007;7:98-111.
45. Eidson LN, Murphy AZ. Blockade of Toll-like receptor 4 attenuates morphine tolerance and facilitates the pain relieving properties of morphine. *Journal of Neuroscience*. 2013;33(40):15952-63.

46. Bland ST, Hutchinson MR, Maier SF, Watkins LR, Johnson KW. The glial activation inhibitor AV411 reduces morphine-induced nucleus accumbens dopamine release. *Brain, behavior, and immunity*. 2009;23(4):492-7.
47. Hutchinson MR, Zhang Y, Brown K, Coats BD, Shridhar M, Sholar PW, et al. Non-stereoselective reversal of neuropathic pain by naloxone and naltrexone: involvement of toll-like receptor 4 (TLR4). *European Journal of Neuroscience*. 2008;28(1):20-9.
48. Felger JC, Miller AH. Cytokine effects on the basal ganglia and dopamine function: the subcortical source of inflammatory malaise. *Frontiers in neuroendocrinology*. 2012;33(3):315-27.
49. Narita M, Kishimoto Y, Ise Y, Yajima Y, Misawa K, Suzuki T. Direct evidence for the involvement of the mesolimbic κ -opioid system in the morphine-induced rewarding effect under an inflammatory pain-like state. *Neuropsychopharmacology*. 2005;30(1):111-8.
50. Guay J, Bateman K, Gordon R, Mancini J, Riendeau D. Carrageenan-induced paw edema in rat elicits a predominant prostaglandin E2 (PGE2) response in the central nervous system associated with the induction of microsomal PGE2 synthase-1. *Journal of biological chemistry*. 2004;279(23):24866-72.
51. Kim S-H, Serezani CH, Okunishi K, Zaslona Z, Aronoff DM, Peters-Golden M. Distinct protein kinase A anchoring proteins direct prostaglandin E2 modulation of Toll-like receptor signaling in alveolar macrophages. *Journal of Biological Chemistry*. 2011;286(11):8875-83.
52. Degraaf AJ, Zaslona Z, Bourdonnay E, Peters-Golden M. Prostaglandin E2 reduces Toll-like receptor 4 expression in alveolar macrophages by inhibition of translation. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 2014;51(2):242-50.
53. DuPont RL, Compton WM, McLellan AT. Five-year recovery: a new standard for assessing effectiveness of substance use disorder treatment. *Journal of substance abuse treatment*. 2015;58:1-5.
54. Brorson HH, Arnevik EA, Rand-Hendriksen K, Duckert F. Drop-out from addiction treatment: A systematic review of risk factors. *Clinical psychology review*. 2013;33(8):1010-24.
55. Panel TBFC. What is recovery? A working definition from the Betty Ford Institute. *Journal of Substance Abuse Treatment*. 2007;33(3):221-8.
56. Abuse S. SAMHSA's working definition of recovery: 10 guiding principles of recovery. Publication PEP 12-RECDEF Rockville, MD2012.
57. Van Wormer K, Davis DR. *Addiction treatment*: Cengage Learning; 2016.
58. Bell J. Pharmacological maintenance treatments of opiate addiction. *British journal of clinical pharmacology*. 2014;77(2):253-63.
59. Sullivan MA, Bisaga A, Mariani JJ, Glass A, Levin FR, Comer SD, et al. Naltrexone treatment for opioid dependence: Does its effectiveness depend on testing the blockade? *Drug and alcohol dependence*. 2013;133(1):80-5.
60. Brownstein MJ. A brief history of opiates, opioid peptides, and opioid receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1993;90(12):5391-3.
61. Salle S, Bodeau S, Dhersin A, Ferdonnet M, Goncalves R, Lenski M, et al. Novel synthetic opioids: A review of the literature. *Toxicologie Analytique et Clinique*. 2019;31(4):298-316.
62. Glare P, Walsh T. Clinical pharmacokinetics of morphine. *Therapeutic drug monitoring*. 1991;13(1):1-23.
63. Lugo RA, Kern SE. Clinical pharmacokinetics of morphine. *Journal of pain & palliative care pharmacotherapy*. 2002;16(4):5-18.
64. Matthews R, German D. Electrophysiological evidence for excitation of rat ventral tegmental area dopamine neurons by morphine. *Neuroscience*. 1984;11(3):617-25.

65. Matsui A, Williams JT. Opioid-sensitive GABA inputs from rostromedial tegmental nucleus synapse onto midbrain dopamine neurons. *Journal of Neuroscience*. 2011;31(48):17729-35.
66. Dang VC, Christie MJ. Mechanisms of rapid opioid receptor desensitization, resensitization and tolerance in brain neurons. *British journal of pharmacology*. 2012;165(6):1704-16.
67. Hnasko TS, Sotak BN, Palmiter RD. Morphine reward in dopamine-deficient mice. *Nature*. 2005;438(7069):854-7.
68. Bozarth MA, Wise RA. Intracranial self-administration of morphine into the ventral tegmental area in rats. *Life sciences*. 1981;28(5):551-5.
69. Sofroniew MV, Vinters HV. Astrocytes: biology and pathology. *Acta neuropathologica*. 2010;119(1):7-35.
70. Kim SK, Nabekura J, Koizumi S. Astrocyte-mediated synapse remodeling in the pathological brain. *Glia*. 2017;65(11):1719-27.
71. Mahajan SD, Schwartz SA, Aalinkeel R, Chawda RP, Sykes DE, Nair MP. Morphine modulates chemokine gene regulation in normal human astrocytes. *Clinical immunology*. 2005;115(3):323-32.
72. Liao K, Niu F, Hu G, Yang L, Dallon B, Villarreal D, et al. Morphine-mediated release of miR-138 in astrocyte-derived extracellular vesicles promotes microglial activation. *Journal of extracellular vesicles*. 2020;10(1):e12027.
73. Liang Y, Chu H, Jiang Y, Yuan L. Morphine enhances IL-1 β release through toll-like receptor 4-mediated endocytic pathway in microglia. *Purinergic signalling*. 2016;12(4):637-45.
74. Schwarz JM, Bilbo SD. Adolescent morphine exposure affects long-term microglial function and later-life relapse liability in a model of addiction. *Journal of Neuroscience*. 2013;33(3):961-71.
75. Sawaya BE, Deshmane SL, Mukerjee R, Fan S, Khalili K. TNF alpha production in morphine-treated human neural cells is NF- κ B-dependent. *Journal of Neuroimmune Pharmacology*. 2009;4(1):140-9.
76. Liu H, Wei J, Liu M, Wu S, Ma C, Liu C, et al. Epigenetic upregulation of CXCL12 expression contributes to the acquisition and maintenance of morphine-induced conditioned place preference. *Experimental Neurology*. 2018;306:55-63.
77. Cui C, Shurtleff D, Harris RA. Neuroimmune mechanisms of alcohol and drug addiction. *International review of neurobiology*. 118: Elsevier; 2014. p. 1-12.
78. Santello M, Volterra A. TNF α in synaptic function: switching gears. *Trends in neurosciences*. 2012;35(10):638-47.
79. Pribiag H, Stellwagen D. TNF- α downregulates inhibitory neurotransmission through protein phosphatase 1-dependent trafficking of GABAA receptors. *Journal of Neuroscience*. 2013;33(40):15879-93.
80. Lai AY, Swayze RD, El-Husseini A, Song C. Interleukin-1 beta modulates AMPA receptor expression and phosphorylation in hippocampal neurons. *Journal of neuroimmunology*. 2006;175(1-2):97-106.
81. Skrzydelski D, Guyon A, Dauge V, Rovere C, Apartis E, Kitabgi P, et al. The chemokine stromal cell-derived factor-1/CXCL12 activates the nigrostriatal dopamine system. *Journal of neurochemistry*. 2007;102(4):1175-83.
82. Wu Y, Dissing-Olesen L, MacVicar BA, Stevens B. Microglia: dynamic mediators of synapse development and plasticity. *Trends in immunology*. 2015;36(10):605-13.
83. Christopherson KS, Ullian EM, Stokes CC, Mullowney CE, Hell JW, Agah A, et al. Thrombospondins are astrocyte-secreted proteins that promote CNS synaptogenesis. *Cell*. 2005;120(3):421-33.
84. Bao G, Kang L, Li H, Li Y, Pu L, Xia P, et al. Morphine and heroin differentially modulate in vivo hippocampal LTP in opiate-dependent rat. *Neuropsychopharmacology*. 2007;32(8):1738-49.

85. Villarreal DM, Derrick B, Vathy I. Prenatal morphine exposure attenuates the maintenance of late LTP in lateral perforant path projections to the dentate gyrus and the CA3 region in vivo. *Journal of neurophysiology*. 2008;99(3):1235-42.
86. Zhang J, Rivest S. Anti-inflammatory effects of prostaglandin E2 in the central nervous system in response to brain injury and circulating lipopolysaccharide. *Journal of neurochemistry*. 2001;76(3):855-64.
87. Mohan S, Narumiya S, Dore S. Neuroprotective role of prostaglandin PGE2 EP2 receptor in hemin-mediated toxicity. *Neurotoxicology*. 2015;46:53-9.
88. Liu D, Wu L, Breyer R, Mattson MP, Andreasson K. Neuroprotection by the PGE2 EP2 receptor in permanent focal cerebral ischemia. *Annals of Neurology: Official Journal of the American Neurological Association and the Child Neurology Society*. 2005;57(5):758-61.
89. Tanaka Y, Furuyashiki T, Momiyama T, Namba H, Mizoguchi A, Mitsumori T, et al. Prostaglandin E receptor EP1 enhances GABA-mediated inhibition of dopaminergic neurons in the substantia nigra pars compacta and regulates dopamine level in the dorsal striatum. *European Journal of Neuroscience*. 2009;30(12):2338-46.
90. Tanaka K, Furuyashiki T, Kitaoka S, Senzai Y, Imoto Y, Segi-Nishida E, et al. Prostaglandin E2-mediated attenuation of mesocortical dopaminergic pathway is critical for susceptibility to repeated social defeat stress in mice. *Journal of Neuroscience*. 2012;32(12):4319-29.
91. Suzuki T, Kishimoto Y, Misawa M. Formalin-and carrageenan-induced inflammation attenuates place preferences produced by morphine, methamphetamine and cocaine. *Life sciences*. 1996;59(19):1667-74.
92. Fishbain DA, Cole B, Lewis J, Rosomoff HL, Rosomoff RS. What percentage of chronic nonmalignant pain patients exposed to chronic opioid analgesic therapy develop abuse/addiction and/or aberrant drug-related behaviors? A structured evidence-based review. *Pain medicine*. 2008;9(4):444-59.
93. Sotomayor-Sobrino MA, Ochoa-Aguilar A, Tenorio EP, León-Olea M, Velasco-González R, Luna-Mendoza I, et al. Non-Painful Peripheral Inflammation Blocks Conditioned Place-Preference to Morphine and Nicotine through an Ibuprofen-Sensitive and an Ibuprofen Insensitive Pathway. *Journal of Behavioral and Brain Science*. 2018;8(02):57.
94. Rezaeifard A, Nazari-Serenjeh F, Zarrindast M-R, Sepehri H, Delphi L. Morphine-induced place preference: involvement of cholinergic receptors of the ventral tegmental area. *European journal of pharmacology*. 2007;562(1-2):92-102.
95. Domenichiello AF, Wilhite BC, Keyes GS, Ramsden CE. A dose response study of the effect of prostaglandin E2 on thermal nociceptive sensitivity. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*. 2017;126:20-4.
96. Oka T. Prostaglandin E2 as a mediator of fever: the role of prostaglandin E (EP) receptors. *Frontiers in Bioscience-Landmark*. 2004;9(5):3046-57.
97. Li P, Jiang H, Wu H, Wu D, Li H, Yu J, et al. AH6809 decreases production of inflammatory mediators by PGE2-EP2-cAMP signaling pathway in an experimentally induced pure cerebral concussion in rats. *Brain Research*. 2018;1698:11-28.
98. Tzschentke TM. Review on CPP: Measuring reward with the conditioned place preference (CPP) paradigm: update of the last decade. *Addiction biology*. 2007;12(3-4):227-462.
99. Bourgognon J-M, Cavanagh J. The role of cytokines in modulating learning and memory and brain plasticity. *Brain and neuroscience advances*. 2020;4:2398212820979802.

100. Davoody L, Quiton RL, Lucas JM, Ji Y, Keller A, Masri R. Conditioned place preference reveals tonic pain in an animal model of central pain. *The journal of pain*. 2011;12(8):868-74.
101. Kitaoka S, Furuyashiki T, Nishi A, Shuto T, Koyasu S, Matsuoka T, et al. Prostaglandin E2 acts on EP1 receptor and amplifies both dopamine D1 and D2 receptor signaling in the striatum. *Journal of Neuroscience*. 2007;27(47):12900-7.
102. Shippenberg T, Herz A. Place preference conditioning reveals the involvement of D1-dopamine receptors in the motivational properties of μ - and κ -opioid agonists. *Brain research*. 1987;436(1):169-72.
103. Canedo T, Portugal CC, Socodato R, Almeida TO, Terceiro AF, Bravo J, et al. Astrocyte-derived TNF and glutamate critically modulate microglia activation by methamphetamine. *Neuropsychopharmacology*. 2021;46(13):2358-70.
104. Lucas SM, Rothwell NJ, Gibson RM. The role of inflammation in CNS injury and disease. *British journal of pharmacology*. 2006;147(S1):S232-S40.