

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA



TESIS DOCTORAL

Efecto de la inhibición de kinurenina monooxigenasa en la conducta adictiva inducida por fentanilo y su relevancia en un modelo de dolor neuropático

Effect of kynurenine monooxygenase inhibition on fentanyl-induced addictive behaviour and its relevance in a model of neuropathic pain

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Carlos Núñez de la Calle

DIRIGIDA POR

María Esther O'Shea Gaya

María Dolores Gutiérrez López

María Isabel Colado Megía

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

DOCTORADO EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA



TESIS DOCTORAL

Efecto de la inhibición de kinurenina monooxigenasa en la conducta adictiva inducida por fentanilo y su relevancia en un modelo de dolor neuropático

Effect of kynurenine monooxygenase inhibition on fentanyl-induced addictive behaviour and its relevance in a model of neuropathic pain

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Carlos Núñez de la Calle

DIRECTORAS

María Esther O'Shea Gaya

María Dolores Gutiérrez López

María Isabel Colado Megía

ÍNDICE

ABREVIATURAS	1
RESUMEN	5
ABSTRACT.....	9
INTRODUCCIÓN	13
1. El sistema opioide	14
1.1 Receptores opioides.....	14
1.1.1 Localización y función de receptores opioides.....	14
1.1.2 Péptidos opioides endógenos.....	15
1.1.3 Señalización.....	16
2. Fentanilo.....	18
2.1 Generalidades y breve historia	18
2.2 Química	19
2.3 Farmacocinética.....	20
2.3.1 Liberación.....	21
2.3.2 Absorción	21
2.3.3 Distribución	22
2.3.4 Metabolismo	23
2.3.5 Excreción.....	23
2.4 Farmacodinamia	24
3. Uso terapéutico e impacto de los opioides: del tratamiento al abuso	24
3.1 Uso terapéutico	24
3.1.1 Dolor neuropático y opioides	25
3.2 Uso ilícito	26
3.2.1 Mercado ilícito de fentanilo.....	26
3.3 Trastorno por consumo de opioides (TCO).....	27
3.3.1 Prevalencia.....	28
3.3.2 Desarrollo y curso.....	29
3.3.3 Características asociadas y comorbilidades.....	29
3.3.4 Abstinencia de opioides.....	30
3.3.5 La crisis por sobredosis de opioides en EE. UU. Situación en Europa ..	30
.....	30
3.3.5.1 Factores que afectan a las olas de la crisis por sobredosis de opioides: el papel de la oferta.....	32
3.3.6 Tratamiento farmacológico del TCO, sobredosis y desintoxicación..	34

3.3.6.1	Metadona	35
3.3.6.2	Buprenorfina.....	35
3.3.6.3	Naltrexona	35
3.3.6.4	Naloxona y nalmefeno: tratamiento de la sobredosis inducida por opioides.....	36
3.3.6.5	Eficacia, seguridad y elección de medicamentos para el tratamiento del TCO	37
3.3.6.6	Desintoxicación, lofexidina y otros tratamientos	40
3.3.6.7	Tratamiento no farmacológico del TCO	40
4.	Neurobiología del TCO	41
4.1	Bases neurobiológicas de la fase de consumo intensivo e intoxicación.....	42
4.2	Bases neurobiológicas de la fase de abstinencia/afecto negativo: hiperkatifeia	44
4.2.1	Neuroadaptaciones entre sistemas	45
4.2.2	Neuroadaptaciones dentro del sistema de recompensa.....	47
4.2.3	Abstinencia condicionada.....	48
4.3	Bases neurobiológicas de la etapa de preocupación/anticipación: <i>craving</i>	48
5.	La vía de la kinurenina (KynP)	50
5.1	Distribución y regulación de las enzimas de la KynP	51
5.1.1	Triptófano 2,3-dioxigenasa (TDO).....	51
5.1.2	Indolamina 2,3-dioxigenasa (IDO).....	51
5.1.3	Kinurenina 3-monooxigenasa (KMO).....	52
5.1.4	Kinurenina aminotransferasa (KAT)	52
5.2	Funciones del triptófano y sus metabolitos	53
5.2.1	Triptófano (TRP)	53
5.2.2	Serotonina (5-HT)	53
5.2.3	Kinurenina (KYN).....	54
5.2.4	Ácido kinurénico (KYNA)	55
5.2.4.1	Receptores nicotínicos $\alpha 7$ ($\alpha 7$ nAChR).....	56
5.2.4.2	Receptores glutamatérgicos: NMDA, AMPA y kainato	56
5.2.5	Ácido quinolínico (QUIN)	58
5.2.6	Otros metabolitos de la KynP	60
5.3	Patologías relacionadas con la KynP.....	61
6.	Relación entre el TCO y la KynP	62
7.	Relación entre el dolor crónico y la KynP	65
	HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	67

MATERIALES Y MÉTODOS.....	69
1. Animales de experimentación.....	70
2. Compuestos administrados.....	70
3. Diseño experimental.....	71
3.1 Autoadministración intravenosa operante.....	71
3.1.1 Equipo.....	73
3.1.2 Cateterización de la vena yugular externa derecha.....	73
3.1.3 Entrenamiento de la conducta operante con comida.....	75
3.1.4 Fases en la conducta adictiva inducida por fentanilo y otros reforzantes.....	76
3.2 Estudios realizados.....	77
3.2.1 Aversión de lugar condicionado.....	77
3.2.2 Modelo de autoadministración de fentanilo: elección de la dosis por infusión de fentanilo y Ro 61-8048.....	78
3.2.3 Efecto de Ro 61-8048 en la adquisición, mantenimiento, extinción y reinstauración inducida por fentanilo y estímulo condicionado.....	79
3.2.4 Efecto de la modulación de $\alpha 7nAChR$ y NMDAR sobre la disminución del consumo de fentanilo inducida por Ro 61-8048.....	81
3.2.5 Efecto de la autoadministración de fentanilo, Ro 61-8048 y la fase de la conducta adictiva en los metabolitos de la KynP.....	82
3.2.6 Efecto de Ro 61-8048 sobre la autoadministración de fentanilo en un paradigma de razón progresiva.....	83
3.2.7 Efecto de Ro 61-8048 sobre reforzantes naturales.....	84
3.2.7.1 Efecto de Ro 61-8048 sobre la autoadministración oral de sacarosa.....	84
3.2.7.2 Efecto de Ro 61-8048 sobre la autoadministración de comida.....	85
3.2.8 Efecto de Ro 61-8048 sobre la actividad locomotora.....	85
3.2.8.1 Prueba de campo abierto.....	85
3.2.8.2 Prueba de <i>Rotarod</i>	86
3.2.9 Interacción entre el modelo de dolor neuropático <i>spared nerve injury</i> (SNI), la autoadministración de fentanilo y Ro 61-8048.....	87
4. Obtención, procesamiento de muestras y técnicas empleadas.....	89
4.1 Obtención de muestras biológicas.....	89
4.2 Procesamiento de muestras para western blot.....	90
4.2.1 Western blot.....	90
4.3 Procesamiento de muestras para UPLC-MS/MS.....	91
4.3.1 UPLC-MS/MS.....	92
4.4 Análisis estadístico.....	93

RESULTADOS.....	95
1. Puesta a punto del modelo experimental.....	96
1.1 Determinación de la dosis por infusión de fentanilo y del tratamiento con Ro 61-8048.....	96
1.2 Efecto del entrenamiento con comida sobre la conducta operante.....	97
2. Efecto de la modulación de la KynP sobre el consumo y la búsqueda de fentanilo en animales sometidos a autoadministración intravenosa operante de fentanilo	99
2.1 Efecto de Ro 61-8048 en las diferentes fases de la conducta adictiva inducida por fentanilo.....	99
2.1.1 Adquisición.....	99
2.1.2 Mantenimiento.....	101
2.1.3 Extinción.....	102
2.1.4 Reinstauración de la conducta de búsqueda	103
2.1.4.1 Inducida por fentanilo.....	103
2.1.4.2 Inducida por estímulo condicionado.....	105
2.2 Efecto de Ro 61-8048 sobre individuos expuestos a un paradigma de refuerzo de razón progresiva.....	108
2.3 Implicación de $\alpha 7nAChR$ sobre la modificación del consumo de fentanilo producida por Ro 61-8048.....	109
2.4 Implicación de NMDAR sobre la modificación del consumo de fentanilo producida por Ro 61-8048.....	111
2.5 Efecto de Ro 61-8048 sobre la función locomotora	112
2.5.1 Efecto de Ro 61-8048 en la prueba de exploración en campo abierto	112
2.5.2 Efecto de Ro 61-8048 en la prueba de <i>Rotarod</i>	113
2.6 Efecto de Ro 61-8048 en la conducta adictiva inducida por fentanilo en animales sometidos al modelo de dolor neuropático SNI	114
2.6.1 Adquisición.....	115
2.6.2 Mantenimiento.....	116
2.6.3 Extinción.....	118
2.6.4 Reinstauración inducida por estímulo condicionado.....	119
2.6.5 Reinstauración inducida por fentanilo	120
2.7 Efecto de Ro 61-8048 y la autoadministración de fentanilo sobre la alodinia inducida por el modelo de dolor neuropático SNI.....	121
2.8 Efecto de Ro 61-8048 en la autoadministración de reforzantes naturales....	124
2.8.1 Sacarosa	124
2.8.2 Comida	126

2.9	Efecto de Ro 61-8048 en la aversión de lugar condicionada por naloxona en animales dependientes de fentanilo	127
-----	--	-----

3. Caracterización de las alteraciones moleculares inducidas por la autoadministración de fentanilo y el tratamiento con Ro 61-8048 128

3.1	Efecto de Ro 61-8048 sobre la expresión de proteínas implicadas en neurotransmisión glutamatérgica y quinasas en el <i>nucleus accumbens</i> (NAcc) de animales sometidos a reinstauración inducida por fentanilo	128
3.1.1	GluN2A y GluN2B	128
3.1.2	EAAT2	129
3.1.3	Akt	130
3.1.4	Erk 1/2	130
3.2	Efecto de Ro 61-8048 y fentanilo sobre los metabolitos de la vía de la KynP en plasma y NAcc.....	131
3.2.1	Efecto de Ro 61-8048 sobre los metabolitos de la KynP en plasma y NAcc animales sometidos a reinstauración de la conducta adictiva	131
3.2.2	Efecto de fentanilo y Ro 61-8048 sobre los metabolitos de la KynP en plasma de animales en fase de reinstauración inducida por estímulo condicionado.....	133
3.2.3	Comparación del efecto de fentanilo y Ro 61-8048 sobre los metabolitos de la KynP en plasma de animales en fase inicial de extinción y reinstauración inducida por estímulo condicionado	135
3.2.4	Comparación del efecto de fentanilo y Ro 61-8048 sobre los metabolitos de la KynP en plasma y NAcc de animales sometidos al modelo de dolor neuropático SNI.....	136

DISCUSIÓN.....	141
-----------------------	------------

CONCLUSIONES.....	177
--------------------------	------------

CONCLUSIONS.....	181
-------------------------	------------

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	185
---	------------

ABREVIATURAS

3-HAA: ácido 3-hidroxiantranílico	D-Ser: D-serina
3-HK: 3-hidroxikinurenina	DSM-V-TR: Quinta edición del Manual Diagnóstico y Estadístico de los Trastornos Mentales (texto revisado)
5-HT: serotonina	EDTA: ácido etilendiaminotetraacético
AhR: receptor de hidrocarburos de arilos	EEM: error estándar de la media
AMPA: ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico	EMA: <i>European Medicines Agency</i> , Agencia Europea del Medicamento
ARNm: ARN mensajero	ERK: quinasa regulada por señal extracelular
BHE: barrera hematoencefálica	EUDA: <i>European Union Drugs Agency</i> , Agencia de la Unión Europea sobre Drogas
CDC: <i>Centers for Disease Control and Prevention</i> , centros para el control y la prevención de enfermedades de los EE. UU.	FDA: <i>Food and Drug Administration</i> , Administración de Drogas y Alimentos de los EE. UU.
CCI: modelo de dolor neuropático de constricción crónica del nervio ciático	FR1: <i>fixed ratio 1</i> , refuerzo en razón fija 1
CIE: modelo de exposición crónica intermitente a etanol	GABA: ácido γ -aminobutírico
CIR: reinstauración inducida por estímulo condicionado (<i>cue-induced reinstatement</i>)	GPR35: receptor acoplado a proteína G 35
CPA: aversión de lugar condicionado (<i>conditioned place aversion</i>)	HO-1: hemoxygenasa 1
CREB: proteína de unión a los elementos respondedores a AMP cíclico	HP: hipocampo
CRF: factor liberador de corticotropina	HPLC: cromatografía líquida de alta resolución
CYP450: citocromo P450	HRP: peroxidasa de rábano
DA: dopamina	i.p.: administración intraperitoneal
DEA: <i>Drug Enforcement Administration</i> , Administración de Control de Drogas de EE. UU.	i.t.: administración intratecal
DID: <i>drinking in the dark</i>	i.v.: administración intravenosa
DIR: reinstauración inducida por la droga (<i>drug-induced reinstatement</i>)	IDO: indolamina 2,3-dioxygenasa
DOR: receptor δ -opioide	IFN: interferón
	IL: interleucina
	IS: estándar interno

JIFE: Junta Internacional de Fiscalización de Estupefacientes

KAT: kinurenina aminotransferasa

KMO: kinurenina monooxigenasa

KOR: receptor κ -opioide

KYN: kinurenina

KYNA: ácido kinurénico

KynP: vía de la kinurenina

LAT: transportador de aminoácidos neutros

LOD: límite de detección

LPS: lipopolisacárido

MAPK: protein-quinasas activadas por mitógeno

mGlu: receptor metabotrópico de glutamato

MOR: receptor μ -opioide

MRM: monitorización de reacciones múltiples

NAA: nicotinamida

NAcc: *nucleus accumbens*

NAD⁺: nicotin-adenin-dinucleótido

NIDA: *National Institute on Drug Abuse*, Instituto Nacional sobre el Abuso de Drogas de EE. UU

NMDAR: receptor de N-metil-D-aspartato

NOP: receptor opioide de nociceptina

NQO1: NADPH/quinona oxidoreductasa

Nrf2: factor nuclear eritroide similar al factor 2

OATP: transportador de aniones orgánicos

OEDA: Observatorio Español de las Drogas y las Adicciones

PA: ácido picolínico

PB: tampón fosfato

PFC: corteza prefrontal

PR: paradigma de refuerzo en razón progresiva (*progressive ratio*)

QUIN: ácido quinolínico

RAM: reacción adversa a medicamento

s.c.: administración subcutánea

SNC: sistema nervioso central

SNI: *spared nerve injury* (ligadura neural por omisión)

TCO: trastorno por consumo de opioides

TCS: trastorno por consumo de sustancias

TDO: triptófano 2,3-dioxigenasa

TGF- β : factor de crecimiento transformante β

TNF- α : factor de necrosis tumoral α

TPH: triptófano hidroxilasa

TRP: triptófano

UNODC: *United Nations Office on Drugs and Crime*, Oficina de las Naciones Unidas contra la Droga y el Delito

UPLC-MS/MS: cromatografía líquida de ultra alto rendimiento acoplada a espectrometría de masas en tándem

VTA: área tegmental ventral

XA: ácido xanturénico

$\alpha 7nAChR$: receptor nicotínico de acetilcolina

RESUMEN

El fentanilo es un potente opioide sintético ampliamente utilizado para tratar el dolor de moderado a severo (Y. Han et al., 2019; Patocka et al., 2024). A pesar de su eficacia analgésica, comparte con el resto de opioides un perfil de reacciones adversas, entre las que destacan por su significancia clínica, la dependencia y el trastorno por consumo de opioides (TCO) (Tabanelli et al., 2023). El TCO se define como la compulsión para buscar y consumir opioides, la pérdida del control en la limitación del consumo y la aparición de un estado emocional negativo cuando no hay acceso a estos fármacos (Koob, 2020). Este trastorno, junto con el riesgo de sobredosis, ha sido un factor clave en la actual crisis de salud pública por sobredosis de opioides, particularmente en Estados Unidos, donde el fentanilo estuvo implicado en 3 de cada 4 muertes por sobredosis por drogas en 2022 (Centers for Disease Control and Prevention, 2022; Ciccarone, 2019, 2021). Aunque existen tratamientos eficaces para el tratamiento de la sobredosis y el TCO, tienen importantes limitaciones, como demuestran las elevadas tasas de recaída (Bell & Strang, 2020; Smyth et al., 2010). Además, la irrupción del fentanilo en el mercado ilícito ha complicado aún más el manejo clínico del TCO (Volkow & Blanco, 2023).

El dolor neuropático, el cual se estima que afecta a entre el 7 y el 10% de la población mundial (Van Hecke et al., 2014), es otro contexto en el que los opioides, aunque son un tratamiento de tercera línea, se utilizan a pesar de su eficacia incierta (Dowell et al., 2023; Finnerup et al., 2015; Mcnicol et al., 2013).

Los opioides interfieren con el sistema de recompensa, generando neuroadaptaciones en el mismo que conducen al desarrollo de tolerancia y dependencia. Además, generan neuroadaptaciones en sistemas responsables del estrés, lo que conduce a la aparición de un estado emocional negativo asociado a la abstinencia conocido como hiperkatifeia, contribuyendo a procesos de refuerzo negativo que perpetúan la búsqueda de la droga (Koob, 2020).

La modulación de vía de la kinurenina (KynP), la principal ruta catabólica del triptófano (TRP) (A. A.-B. Badawy, 2017), se ha propuesto como diana terapéutica para el consumo y búsqueda de drogas de abuso como el etanol, la cocaína, la nicotina o los cannabinoides (Morales-Puerto et al., 2021). Aunque varios de los metabolitos de la KynP han mostrado ser neuroactivos, los metabolitos más estudiados son el ácido kinurénico (KYNA) y el ácido quinolínico (QUIN), con roles opuestos en términos de neuroprotección y neurotoxicidad respectivamente; KYNA actuando como antagonista del receptor NMDA, mientras que QUIN es un agonista NMDA, con efecto excitotóxico (Guillemin, 2012; T. W. Stone et al., 2024). El KYNA, además de actuar como antagonista del receptor NMDA, ejerce, entre otros, un efecto modulador alostérico negativo del receptor nicotínico de acetilcolina $\alpha 7$ ($\alpha 7$ nAChR), cuya acción se ha atribuido previamente a la modulación de la conducta adictiva inducida por el inhibidor de KMO, Ro 61-8048, en diferentes modelos preclínicos de adicción (Giménez-Gómez et al., 2018; Justinova et al., 2013; Secci et al., 2017).

En esta Tesis Doctoral, se plantearon tres objetivos principales: (1) establecer un modelo de autoadministración intravenosa de fentanilo y definir la dosis efectiva de Ro 61-8048 para modular la conducta adictiva, (2) estudiar el efecto de Ro 61-8048 en las diferentes fases de la conducta adictiva inducida por fentanilo, evaluando tanto el refuerzo como los comportamientos asociados y considerando el impacto del dolor neuropático y, (3),

caracterizar las alteraciones moleculares inducidas por Ro 61-8048 y fentanilo en cerebro y plasma de animales con y sin dolor neuropático.

Los resultados mostraron que el modelo de autoadministración operante intravenosa de fentanilo estableció de manera robusta la conducta de búsqueda de droga en todas las fases (adquisición, mantenimiento, extinción y reinstauración). La administración de Ro 61-8048 a una dosis de 100 mg/kg vía intraperitoneal (i.p.) redujo significativamente el consumo de fentanilo durante la fase de mantenimiento, mientras que la dosis de 50 mg/kg no tuvo efecto.

Ro 61-8048 dificultó la adquisición de la conducta de autoadministración, redujo el consumo en la fase de mantenimiento, facilitó la extinción y previno la reinstauración de la conducta de búsqueda de fentanilo inducida por una dosis no contingente de la droga o por el estímulo condicionado asociado a fentanilo. Estos efectos no parecieron estar mediados por $\alpha 7$ nAChR o NMDAR, dado que la administración de PNU-120596 (8 mg/kg, i.p) o D-Ser (800 mg/kg, i.p) no afectó a la reducción del consumo de fentanilo inducida por Ro 61-8048. Además, Ro 61-8048 no afectó la motivación para obtener fentanilo en el mantenimiento de la autoadministración bajo el paradigma de refuerzo de razón progresiva, ni mitigó el estado aversivo relacionado con la abstinencia condicionada en el protocolo de aversión de lugar condicionado inducido por naloxona en animales dependientes de fentanilo. En la prueba de campo abierto, Ro 61-8048 redujo la actividad locomotora y los animales mostraron una conducta exploratoria asociada a ansiedad; sin embargo, no afectó el desempeño en la prueba de *Rotarod*, lo que indica que su efecto sobre la conducta adictiva no se debe a alteraciones en la función locomotora, efectos sedantes o letárgicos. Ro 61-8048 también redujo el consumo y la conducta de búsqueda de pellets de comida y sacarosa.

En animales sometidos al modelo de dolor neuropático de ligadura neural por omisión del nervio ciático (*spared nerve injury*, SNI), la conducta adictiva inducida por la autoadministración fentanilo fue similar a la de los controles sin dolor, aunque su consumo fue ligeramente inferior durante la fase de mantenimiento. El pretratamiento con Ro 61-8048 redujo de manera similar el consumo (en la fase de mantenimiento) y la conducta de búsqueda (en la prueba de reinstauración inducida por estímulo condicionado) tanto en animales con dolor neuropático como en aquellos sin dolor. Además, Ro 61-8048 pareció potenciar el moderado efecto antinociceptivo de la autoadministración de fentanilo en los animales con dolor neuropático, aunque no afectó por sí mismo a la alodinia mecánica generada por el modelo SNI.

A nivel molecular, los efectos de Ro 61-8048 se asociaron con un desvío de la KynP hacia la producción de KYNA, la acumulación de KYN y una reducción de QUIN en plasma y *nucleus accumbens* (NAcc). Paradójicamente, se observó también en ambos tejidos un aumento en los niveles de 3-HK, además de la disminución de la concentración plasmática de TRP y ácido 3-hidroxiantranílico (3-HAA). En plasma de animales con dolor neuropático, el aumento de los niveles de KYNA y 3-HK producido por Ro 61-8048 fue aún mayor, mientras que lo mismo ocurrió en NAcc con KYN y KYNA. Por otro lado, la concentración de 3-HAA se mostró disminuida en el NAcc por el modelo SNI. Además, la historia de autoadministración de fentanilo se asoció a concentraciones plasmáticas disminuidas de 3-HK y QUIN con relación a animales control que se

RESUMEN

autoadministraron salino. La fase de la conducta adictiva también se asoció a diferencias en las concentraciones de metabolitos de la KynP, con mayores niveles de TRP, QUIN y ácido picolínico (PA) y menor de 3-HK en muestras de plasma de animales obtenidas tras la prueba de reinstauración inducida por estímulo condicionado, con relación a muestras de animales obtenidas tras la primera sesión de extinción. Estos resultados nos sugieren el potencial de los metabolitos de la KynP como biomarcadores en el trastorno por consumo de fentanilo o el dolor neuropático.

El efecto preventivo de Ro 61-8048 sobre la conducta de búsqueda inducida por una dosis no contingente de fentanilo no se asoció a la alteración de la expresión proteica en NAcc de GluN2A, GluN2B, EAAT2, Akt o Erk1/2 en sus formas nativas o fosforiladas.

En conjunto, los resultados de esta Tesis Doctoral nos permiten concluir que la inhibición de KMO mediante Ro 61-8048 es efectiva para reducir el consumo y la conducta de búsqueda de fentanilo en individuos sanos y con dolor neuropático, subrayando su posible valor como estrategia terapéutica para el tratamiento del TCO.

ABSTRACT

Fentanyl is a potent synthetic opioid widely used to treat moderate to severe pain (Y. Han et al., 2019; Patocka et al., 2024). Despite its analgesic efficacy, fentanyl shares with other opioids a range of adverse reactions, among which dependence and opioid use disorder (OUD) stand out due to their clinical significance (Tabanelli et al., 2023). OUD is defined as the compulsive need to seek and consume opioids, a loss of control over limiting their use, and the emergence of a negative emotional state when these drugs are unavailable (Koob, 2020). This disorder, along with the risk of overdose, has been a key factor in the current public health crisis related to opioid overdoses, especially in the United States, where fentanyl was involved in 3 out of 4 drug overdose deaths in 2022 (Centers for Disease Control and Prevention, 2022; Ciccarone, 2019, 2021). Although effective treatments for overdose and OUD are authorised and available, these have significant limitations, as evidenced, for example, by high relapse rates (Bell & Strang, 2020; Smyth et al., 2010). Furthermore, the surge of fentanyl in the illicit drug market has complicated the clinical management of OUD (Volkow & Blanco, 2023).

Neuropathic pain, estimated to affect 7 to 10% of the global population (Van Hecke et al., 2014), represents another context in which opioids are used despite being third-line treatments and having uncertain efficacy (Dowell et al., 2023; Finnerup et al., 2015; Mcnicol et al., 2013).

Opioids interfere with the reward system, generating neuroadaptations that lead to the development of tolerance and dependence. They also create neuroadaptations in stress-related systems, leading to the emergence of a negative emotional state associated with withdrawal, known as hyperkatifeia, which contributes to negative reinforcement processes that perpetuate drug-seeking behaviour (Koob, 2020).

Modulation of the kynurenine pathway (KynP), the main catabolic route of tryptophan (TRP) (A. A.-B. Badawy, 2017), has been proposed as a therapeutic target for the consumption and seeking of drugs of abuse such as ethanol, cocaine, nicotine and cannabinoids (Morales-Puerto et al., 2021). Although several KynP metabolites have been proven neuroactive, the most studied metabolites are kynurenic acid (KYNA) and quinolinic acid (QUIN), with opposing roles in terms of neuroprotection and neurotoxicity, respectively; KYNA acts as an NMDA receptor antagonist, while QUIN is an NMDA agonist with excitotoxic effects (Guillemin, 2012; T. W. Stone et al., 2024). In addition to acting as an NMDA receptor antagonist, KYNA exerts, among other actions, a negative allosteric modulation of the $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor ($\alpha 7$ nAChR), an action previously attributed to the modulation of addictive behaviour induced by the KMO inhibitor Ro 61-8048 in various preclinical substance use disorder models (Giménez-Gómez et al., 2018; Justinova et al., 2013; Secci et al., 2017).

This Doctoral Thesis set out three main objectives: (1) to establish an intravenous fentanyl self-administration model and define the effective dose of Ro 61-8048 to modulate addictive behaviour; (2) to study the effect of Ro 61-8048 on the different phases of fentanyl-induced addictive behaviour, evaluating both reinforcement and associated behaviours and considering the impact of neuropathic pain; and (3) to characterize the molecular alterations induced by Ro 61-8048 and fentanyl in the brain and plasma of animals with and without neuropathic pain.

The results showed that the intravenous fentanyl operant self-administration model established robust drug-seeking behaviour in all phases (acquisition, maintenance, extinction and reinstatement). Administration of Ro 61-8048 at a dose of 100 mg/kg intraperitoneally (i.p.), but not at 50 mg/kg, significantly reduced fentanyl consumption during the maintenance phase.

Ro 61-8048 impaired the acquisition of self-administration behaviour, reduced consumption in the maintenance phase, facilitated extinction, and prevented reinstatement of fentanyl-seeking behaviour induced by a non-contingent dose of the drug or the conditioned stimulus associated with fentanyl. These effects did not appear to be mediated by $\alpha 7$ nAChR or NMDAR, as administration of PNU-120596 (8 mg/kg, i.p.) or D-Ser (800 mg/kg, i.p.) did not affect the reduction in fentanyl consumption induced by Ro 61-8048. Furthermore, Ro 61-8048 did not affect motivation to obtain fentanyl during maintenance under a progressive ratio schedule of reinforcement, nor did it mitigate the aversive state related to conditioned withdrawal in the conditioned place aversion protocol induced by naloxone in fentanyl-dependent animals. In the open field test, Ro 61-8048 reduced locomotor activity and animals showed exploratory behaviour associated with anxiety; however, it did not affect performance on the Rotarod test, indicating that its effect on addictive behaviour is not due to alterations in locomotor function, sedation, or lethargy. Ro 61-8048 also reduced the consumption and seeking behaviour of food and sucrose pellets.

In animals subjected to the spared nerve injury (SNI) neuropathic pain model, fentanyl-induced addictive behaviour was similar to that of control animals without pain, although their consumption was slightly lower during the maintenance phase. Pretreatment with Ro 61-8048 similarly reduced consumption (in the maintenance phase) and fentanyl-seeking behaviour (in the cue-induced reinstatement test) in animals both with and without neuropathic pain to a similar extent. Furthermore, Ro 61-8048 appeared to potentiate the moderate antinociceptive effect of fentanyl self-administration in animals with neuropathic pain, although it did not, by itself, affect the mechanical allodynia generated by the SNI model.

At the molecular level, the effects of Ro 61-8048 were associated with a shift in the KynP towards KYNA production, accumulation of KYN, and a reduction of QUIN in plasma and *nucleus accumbens* (NAcc). Unexpectedly, an increase in 3-HK levels was also observed in both tissues, as well as a decrease in plasma concentrations of TRP and 3-hydroxyanthranilic acid (3-HAA). In plasma and NAcc of animals with neuropathic pain, the plasmatic increase in KYNA and 3-HK levels induced by Ro 61-8048 was even greater, with similar effects on NAcc for KYN and KYNA. Meanwhile, the concentration of 3-HAA decreased in the NAcc due to the SNI model. Additionally, a history of fentanyl self-administration was associated with lower plasma concentrations of 3-HK and QUIN relative to control animals that had self-administered saline. Furthermore, the phase of addictive behaviour was also associated with differences in KynP metabolite concentrations, with higher levels of TRP, QUIN, and picolinic acid (PA) and lower levels of 3-HK in plasma samples from animals obtained after cue-induced reinstatement test, compared with samples obtained after the first extinction session. These results suggest the potential of KynP metabolites as biomarkers in fentanyl use disorder and neuropathic pain.

ABSTRACT

The preventive effect of Ro 61-8048 on fentanyl-seeking behaviour induced by a non-contingent dose was not associated with alterations in NAcc protein expression of NAcc of GluN2A, GluN2B, EAAT2, Akt, or Erk1/2 neither in their native nor phosphorylated forms.

In conclusion, the results of this Doctoral Thesis suggest that KMO inhibition by Ro 61-8048 is effective in reducing fentanyl consumption and seeking behaviour in both healthy and neuropathic pain-affected individuals, highlighting its potential value as a therapeutic strategy for the treatment of OUD.

INTRODUCCIÓN

1. El sistema opioide

En condiciones fisiológicas, los receptores opioides son estimulados por péptidos opioides endógenos cuya acción reduce las respuestas a estímulos dolorosos y estrés, además de influir en el procesamiento del refuerzo y el estado de ánimo. Estos péptidos desempeñan un papel crucial en diversas funciones biológicas. Además de su papel en la analgesia, también pueden modular el refuerzo y las conductas adictivas, la respuesta a estrés, emociones y conducta alimentaria (Abrimian et al., 2021). El sistema opioide contribuye a la supervivencia del individuo y la especie promoviendo el refuerzo de estímulos naturales (comida, sexo, interacción social), regulando el estado de ánimo y facilitando el manejo del dolor y el estrés (Darcq & Kieffer, 2018). En resumen, el sistema opioide parece estar diseñado para optimizar el aprendizaje basado en el refuerzo y minimizar las experiencias aversivas (Volkow & Blanco, 2023).

1.1 Receptores opioides

Los receptores opioides μ (MOR), κ (KOR) y δ (DOR) pertenecen a la familia de receptores acoplados a proteínas G (GPCR) y son responsables de mediar los efectos tanto de los péptidos opioides endógenos como de los fármacos opioides. Estos receptores están formados por siete dominios transmembrana conectados por lazos intra- y extracelulares (Darcq & Kieffer, 2018).

Existe evidencia que sugiere la presencia de subtipos de receptores opioides, respaldada por diferencias en la modulación farmacológica, respuestas funcionales diferenciadas, tolerancia cruzada incompleta entre distintos agonistas y características complejas de la unión fármaco-receptor (Dietis et al., 2011). Aunque el *knock-out* (KO) de un único gen suele resultar en la pérdida total de la función del receptor, lo que podría argumentar en contra de la existencia de subtipos, se ha acumulado evidencia que apoya la presencia de variantes generadas por *splicing* alternativo, particularmente en el caso del MOR (Abrimian et al., 2021; Dietis et al., 2011; Lambert, 2023). El *splicing* alternativo puede generar receptores truncados con seis dominios transmembrana, los cuales pueden influir en aspectos como la tolerancia, dependencia física, refuerzo y agonismo sesgado de ciertos agonistas opioides (Majumdar et al., 2011, 2012; Valentino & Volkow, 2018).

Por último, cabe mencionar el receptor NOP (receptor opioide de nociceptina). Este receptor presenta un alto grado de homología con los receptores opioides, especialmente con KOR, pero no presenta afinidad significativa por fármacos opioides ni es sensible al antagonista opioide naloxona, y por lo tanto no se clasifica como un receptor opioide clásico. El ligando endógeno de este receptor es el péptido N/OFQ (Darcq & Kieffer, 2018). La actividad del NOP se ha relacionado con el control del dolor, el procesamiento del refuerzo y el abuso de sustancias, así como con la regulación del estrés, la ansiedad y los trastornos del ánimo (Darcq & Kieffer, 2018; Lambert, 2023).

1.1.1 Localización y función de receptores opioides

Los MOR se expresan ampliamente a lo largo de todo el prosencéfalo, mesencéfalo y rombencéfalo humanos, presentando una expresión particularmente alta en el cerebelo, *nucleus accumbens* (NAcc) y caudado. Esta expresión es consistente con el rol de este receptor en la nocicepción, la integración sensorimotora y sistema de recompensa (Darcq & Kieffer, 2018; Peng et al., 2012). Los DOR se encuentran altamente expresados en el

córtex cerebral, putamen, NAcc, caudado, lóbulo temporal e hipocampo, lo que es consistente con el papel de DOR en el funcionamiento motor y cognitivo. Por último, KOR se expresa de forma moderada en muchas áreas cerebrales, siendo la expresión especialmente marcada en putamen, NAcc y caudado. Este receptor se ha visto implicado en conducta alimentaria, nocicepción y función neuroendocrina. Se ha detectado una expresión moderada de MOR, DOR y KOR en los ganglios de la raíz dorsal (DRG). Las acciones de los opioides a nivel de medula espinal generan analgesia al actuar tanto sobre las vías nociceptivas ascendentes como descendentes (Peng et al., 2012).

Los receptores opioides también se expresan en el sistema nervioso periférico, donde contribuyen a un efecto antinociceptivo como han demostrado numerosos estudios preclínicos y clínicos. Se ha descrito la modulación del dolor visceral en el aparato digestivo mediado por MOR y KOR. De hecho, MOR, KOR y DOR se expresan en páncreas e intestino delgado (Peng et al., 2012). El uso de modelos murinos transgénicos con delección o KO de los genes que codifican MOR (*Oprm1*) o DOR (*Oprd1*) ha revelado que MOR es el principal responsable de los efectos analgésicos y reforzantes de la morfina, mientras que DOR desempeña una función ansiolítica y antidepresiva. Además, estudios que emplean herramientas farmacológicas han demostrado que DOR está involucrado en los trastornos del ánimo y el dolor crónico, mientras que el agonismo de KOR se asocia con la generación de aversión y efectos psicotomiméticos (Darcq & Kieffer, 2018).

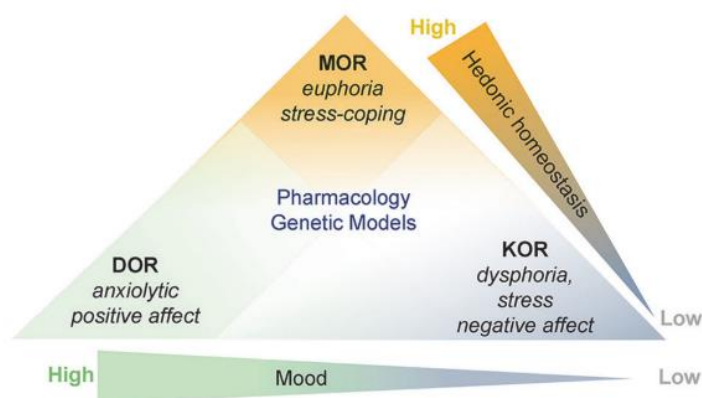


Figura 1 | Efecto de la actividad de los receptores opioides sobre el estado de ánimo y homeostasis hedónica. Los efectos de los receptores opioides han sido estudiados mediante herramientas farmacológicas y génicas. Aunque muchos analgésicos opioides ejercen un efecto analgésico a través de la activación de MOR, KOR o DOR, estos receptores ejercen diferentes influencias sobre el estado hedónico y emocional. Los agonistas de MOR producen euforia y promueven la resiliencia al estrés, mientras que los agonistas de KOR generan disforia, estrés y un estado afectivo negativo. Por su parte, los agonistas de DOR generan un efecto ansiolítico y estado afectivo positivo. Imagen tomada de Valentino & Volkow, 2018.

1.1.2 Péptidos opioides endógenos

Como la mayoría de los neuropéptidos, los péptidos opioides endógenos se producen mediante modificaciones postraduccionales de sus péptidos precursores a través de peptidasas. Estos péptidos precursores son la proencefalina, prodinorfina y proopiomelanocortina (POMC). Tanto la proencefalina como la prodinorfina generan varios péptidos opioides, diversas encefalinas y dinorfinas, respectivamente. La POMC,

INTRODUCCIÓN

sin embargo, genera β -endorfina además de otros péptidos no opioides como la adrenocorticotropina (ACTH) y la hormona estimulante de α -melanocitos (α -MSH) (Abrimian et al., 2021).

La β -endorfina, las dinorfinas y las encefalinas, son los ligandos endógenos preferentes de MOR, KOR, DOR respectivamente. Aunque las dinorfinas se consideran los ligandos endógenos del KOR, también se unen con alta afinidad a MOR y DOR. De manera similar, aunque la β -endorfina se considera un agonista endógeno de MOR, presenta una alta afinidad por DOR. Otro grupo de péptidos opioides endógenos cuya molécula precursora aún no se ha identificado es el de las endomorfina, que actúan específicamente sobre MOR (Abrimian et al., 2021). Las encefalinas y las dinorfinas están ampliamente distribuidas en el SNC, estando presentes en estriado, tálamo, hipocampo, puente, y medula espinal. La POMC se sintetiza principalmente en la hipófisis, y su mRNA se expresa abundantemente en hipotálamo, núcleo caudal del tracto solitario y núcleo comisural, así como en varios tejidos periféricos (Abrimian et al., 2021).

1.1.3 Señalización

Dado que el fentanilo y la mayoría de los fármacos opioides ejercen sus efectos principalmente a través de MOR, nos centraremos en la señalización de este receptor, aunque su mecanismo es muy similar al de los otros receptores opioides. MOR está acoplado principalmente a proteínas G inhibitorias del tipo $G_{\alpha i/o}$, aunque también se acopla a $G_{\alpha z}$ (Pathan & Williams, 2012; Patocka et al., 2024). La unión de un agonista al sitio ortostérico de MOR genera un cambio conformacional y activa el receptor, lo que resulta en el intercambio de guanosina difosfato (GDP) en la subunidad G_{α} por una molécula de guanosina trifosfato (GTP). Posteriormente, el heterotrímero $G_{\alpha\beta\gamma}$ se divide en el monómero G_{α} acoplado a ATP y el dímero $G_{\beta\gamma}$. Los efectos de la señalización derivados de las acciones específicas de la subunidad G_{α} y el dímero $G_{\beta\gamma}$ varían según los estudios consultados. Sin embargo, es un hecho bien documentado que se produce la inhibición de la enzima adenilato ciclasa, la apertura de canales de potasio rectificadores de entrada acoplados a proteínas G (GIRK, *G-protein coupled inwardly-rectifying potassium channel*, Kir3) y el cierre de canales de calcio dependientes de voltaje. La activación de GIRK genera la hiperpolarización de la membrana neuronal y la inhibición de la actividad neuronal tónica, mientras que el cierre de los canales de calcio reduce la liberación de neurotransmisores. En resumen, el efecto global es inhibitorio, dando como resultado una reducción de la liberación de neurotransmisores desde la neurona presináptica y en la excitabilidad de la neurona postsináptica (Al-Hasani & Bruchas, 2011; Darq & Kieffer, 2018). La cascada de señalización descrita hasta ahora representa la vía de señalización de opioides dependiente de proteínas G, pero el agonismo de MOR también puede activar la señalización a través de β -arrestinas. En esta cascada se activan quinasas de GPCRs (GRKs) que fosforilaran residuos de treonina y serina en el extremo terminal carboxílico o en los lazos intracelulares del receptor. La fosforilación del receptor conduce al reclutamiento de β -arrestinas, lo que promueve la internalización del receptor permitiendo su reciclaje o degradación, y resulta en la desensibilización. Además, se ha descrito que el complejo formado por el receptor fosforilado y las β -arrestinas no es inactivo; de hecho, activa cascadas de señalización alternativas, como la vía de las MAP quinasas (MAPK). La vía de MAPK inducida por opioides que más se ha estudiado es la que involucra las quinasas Erk 1 y 2, aunque también se ha documentado

la señalización en las proteínas p38 y JNK. La activación de Erk 1 y 2 por los agonistas de MOR está mediada por la GRK-3 y β -arrestinas en cultivos de neuronas primarias y células gliales (Al-Hasani & Bruchas, 2011).

Las diferencias en las cascadas de señalización producidas por cada ligando de MOR han llevado a clasificar los fármacos opioides en tres categorías: agonistas no sesgados, sesgados hacia la activación de proteínas G y sesgados hacia la activación de β -arrestinas (Pathan & Williams, 2012; Patocka et al., 2024). Se acepta que MOR ejerce sus efectos a través de la señalización mediada por proteínas G, las cuales son responsables de la producción de la mayoría de los efectos de los fármacos opioides, como el alivio del dolor o la euforia. Sin embargo, se ha propuesto que la señalización a través de complejos de β -arrestina podría estar relacionada con los efectos adversos, como la depresión respiratoria y el estreñimiento producidos por los opioides (Comer & Cahill, 2019), aunque esta hipótesis ha sido cuestionada recientemente (Kelly et al., 2023). El uso del criterio de agonismo sesgado para clasificar los fármacos opioides presenta dos problemas principales. Primero, es necesario un agonista opioide de referencia para evaluar la señalización. Segundo, existe una variabilidad considerable en la metodología empleada en los estudios. Por ejemplo, el fentanilo se clasificaría como un agonista sesgado hacia β -arrestinas si se utiliza el péptido opioide DAMGO como referencia, mientras que se consideraría un agonista sesgado hacia proteínas G si se utiliza la morfina como estándar (De Neve et al., 2021). La evidencia más reciente sugiere que el fentanilo podría ser un agonista no sesgado (Kelly et al., 2023).

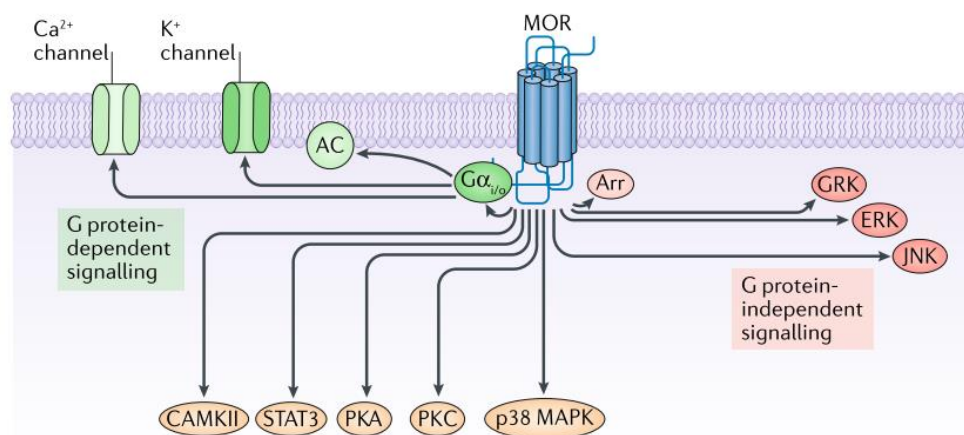


Figura 2 | Señalización de MOR. La activación de los receptores opioides está sujeta al fenómeno del agonismo sesgado, lo que significa que las respuestas celulares *in vivo* frecuentemente dependen del agonista empleado. A nivel celular, los opioides pueden activar vías de señalización dependientes de proteínas G y de β -arrestinas. Se indican en verde las vías de señalización dependientes de proteínas G, en rojo las vías que dependen de β -arrestinas, y en naranja aquellas cuya señalización es incierta. Imagen tomada de Darcq & Kieffer, 2018.

La señalización mediada por receptores opioides es aún más compleja de lo que se ha descrito hasta ahora. La visión convencional de que la iniciación de la señalización y los efectos de opioides se producen únicamente en la membrana citoplasmática ha sido refutada. La señalización a través de MOR también ocurre en compartimentos citoplasmáticos no convencionales como endosomas o aparato de Golgi, y presenta un perfil espacial y temporal que depende del ligando (Stoeber et al., 2018; Valentino & Volkow, 2018). La actividad del receptor MOR está regulada, además de por los segundos

mensajeros y la fosforilación mediada por GRKs, por la interacción con diferentes GPCRs y otras proteínas. Se ha descrito la formación de homo-, hetero- y oligómeros que incluyen receptores opioides, como los receptores DOR y NOP, el receptor de dopamina D2, receptores cannabinoides CB1, galanina, neurokinina-1, calmodulina, o RGS9-2 (regulador de señalización de proteínas G). La dimerización más estudiada es la de MOR-DOR, que parece conllevar una funcionalidad similar a la modulación alostérica, generando un aumento de la afinidad por los ligandos. Esta interacción también facilita la señalización no convencional mediante el acoplamiento a proteínas G_z y potencia la señalización por calcio. Otro dímero a destacar es el MOR-NOP, el cual se ha asociado con un potencial terapéutico a través de la reducción de la señalización mediada por MOR. Sin embargo, la funcionalidad *in vivo* de estos fenómenos está todavía poco descrita y es controvertida porque es difícil de estudiar y la mayoría de las evidencias proviene de estudios realizados en células heterólogas y a través del uso de anticuerpos (Al-Hasani & Bruchas, 2011; Valentino & Volkow, 2018).

2. Fentanilo

2.1 Generalidades y breve historia

El fentanilo es un fármaco opioide altamente efectivo como analgésico y anestésico. Este fármaco fue sintetizado por Paul Janssen en 1960 con el propósito de desarrollar un fármaco con mayor potencia y un mejor perfil de seguridad en comparación con la morfina. En la actualidad, el fentanilo es el opioide sintético más frecuentemente empleado en la práctica clínica (Y. Han et al., 2019), especialmente en anestesia intraoperatoria y analgesia a nivel global (Stanley, 2014). Su importancia en el ámbito terapéutico es tan crítica que ha sido recientemente incluido en la lista de medicamentos de importancia esencial de la Unión Europea (EMA, 2023).

En Europa, el fentanilo se empezó a utilizar de manera popular y exitosa como anestésico en combinación con droperidol en la década de 1960, como alternativa a los anestésicos inhalados. Mas tarde, durante la misma década, se empezó a administrar en dosis altas con el objetivo de lograr una anestesia que minimizara el estrés quirúrgico. Sin embargo, la trayectoria de este fármaco en EE. UU. fue diferente. El fentanilo no fue aprobado por la FDA hasta 1968 por sospechas de problemas derivados por su alta potencia, la posibilidad de generar rigidez muscular y el riesgo de abuso. Estas inquietudes se abordaron, en parte, con la autorización del fentanilo en combinación con droperidol, ya que este último reduce el potencial de abuso por los efectos que genera. A pesar de estas precauciones, el fentanilo fue finalmente autorizado como fármaco independiente cuatro años después (Stanley, 2014).

Entre principios y mediados de la década de 1980, el fentanilo comenzó a reemplazar el uso de morfina a dosis altas en cirugías cardíacas. Este fármaco tiene un perfil ventajoso en comparación con morfina, ya que permite inducir la anestesia de manera más rápida y durante un tiempo más corto, con mínimas repercusiones a nivel cardiovascular y sin provocar la liberación de histamina en plasma. El éxito clínico del fentanilo fue tan notable que, en 1981, sus ventas se multiplicaron por diez (Stanley, 2014). El creciente uso y popularidad del fentanilo en las décadas siguientes llevó al descubrimiento de análogos de fentanilo y al desarrollo de nuevas formas de administración no parenteral con indicación analgésica, como el parche transdérmico o el comprimido para chupar. En

1990, la FDA aprobó el primer parche transdérmico (Duragesic®) para el tratamiento de pacientes con dolor crónico oncológico (Comer & Cahill, 2019; Stanley, 2014).

Cabe mencionar que más allá del uso terapéutico e ilícito, el fentanilo y sus análogos, en particular el carfentanilo, han sido objeto de investigación por parte de ciertos gobiernos debido a su potencial como agente incapacitante y arma química. Estos gobiernos han llegado a emplear el carfentanilo y otros análogos como herramientas antiterroristas. Un caso notable fue el uso del carfentanilo por las fuerzas de seguridad rusas durante la crisis de rehenes del teatro *Dubrovka* en Moscú en 2002. En esta ocasión se utilizó una mezcla de carfentanilo y remifentanilo, resultando en la muerte de 170 personas, de las cuales 127 eran rehenes (Valdez et al., 2014). El potencial del fentanilo y sus análogos como armas químicas es tan significativo que se discutió su posible uso como arma de destrucción masiva en la Convención de Armas Químicas (CWC) (Gabielli et al., 2023; Patocka et al., 2024; Stanley, 2014).

2.2 Química

El fentanilo es un opioide sintético de tipo fenilpiperidina (Comer & Cahill, 2019). Fue sintetizado por Paul Janssen en 1953 con el objetivo de obtener un analgésico más potente, eficaz, y de acción más rápida que los analgésicos comunes de la época, como la meperidina o la morfina. A diferencia de otros investigadores, Janssen decidió utilizar la meperidina como molécula inicial a modificar en lugar de la morfina, debido a su estructura más simple y manipulable. El equipo de Janssen buscaba modificar la estructura de meperidina para aumentar su lipofilia, y, por lo tanto, obtener moléculas con mayor potencia e inicio de acción más rápido, debido presumiblemente a un mejor cruce de la barrera hematoencefálica (BHE). Las modificaciones realizadas sobre el anillo piperidínico de la meperidina llevaron a la creación del fentanilo, que en 1960 era el opioide más lipofílico conocido, caracterizándose por su rápido inicio de acción y un amplio margen terapéutico (Stanley, 2014).

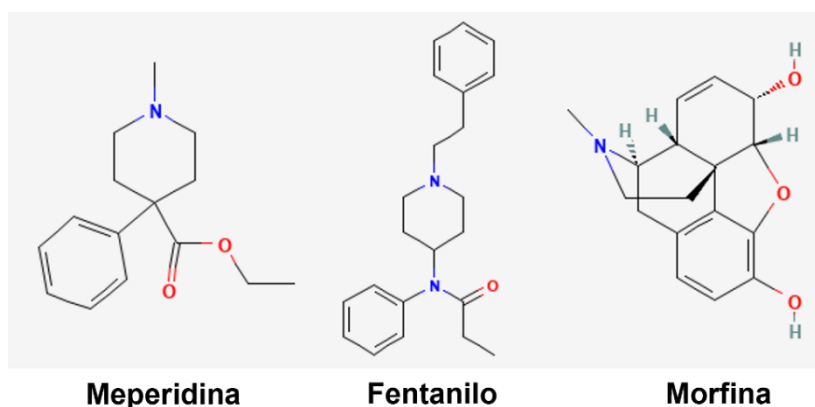


Figura 3 | Estructuras químicas de la meperidina, el fentanilo y la morfina.

Hasta la década de 1990, la síntesis de fentanilo ilícito se realizaba mediante los métodos descritos originalmente por Janssen utilizando N-bencil-4-piperidona como precursor (Janssen & Eddy, 1960). Este método era laborioso, implicaba el uso de disolventes peligrosos y requería temperaturas altas y controladas, lo que lo hacía relativamente sofisticado y con un rendimiento limitado. A principios de la década de 1990, se publicó en Internet bajo un pseudónimo una ruta sintética alternativa más sencilla y eficiente, conocida como el método *Siegfried* (Pardo et al., 2019; Siegfried, n.d.). Este método,

INTRODUCCIÓN

basado en técnicas publicadas en la década de 1980, utiliza N-fenetil-4-piperidona (NPP) o 4-anilino-N-fenetilpiperidina (ANPP) como precursores. Su implementación no requiere un amplio conocimiento en síntesis química, ofrece un buen rendimiento y permite la producción de grandes cantidades de fentanilo (Suzuki & El-Haddad, 2017). Debido a la creciente preocupación por la producción ilícita, los precursores NPP y ANPP fueron fiscalizados a nivel internacional en 2017 (UNODC, 2020). Esto llevó a un ajuste en el mercado que comenzó a emplear otros precursores, como bencilfentanilo o 4-anilinopiperidina, así como nuevas rutas de síntesis. Entre estas, destaca el método descrito por Gupta y colaboradores (Gupta et al., 2005; Gupta et al., 2009) que se describe como un método “cómodo”, ya que se lleva a cabo en un solo recipiente y a temperatura ambiente, utilizando clorhidrato de 4-piperidona. En respuesta a esta dinámica, en 2022 se incluyeron bajo fiscalización internacional moléculas relacionadas con esta ruta, como la, 4-anilinopiperidina (4-AP) y la 1-boc-4-anilinopiperidina (1-boc-4-AP) (JIFE, 2023; UNODC, 2020). Otras rutas sintéticas, como la propuesta por Valdez y colaboradores (Valdez et al., 2014), también utilizan 4-piperidona, logrando un mayor rendimiento en menos pasos. La evidencia sobre los métodos más utilizados en laboratorios clandestinos para la síntesis de fentanilo es controvertida. Algunos autores sostienen que los métodos de *Siegfried* y Gupta son los más comunes (de Bruin-Hoegée et al., 2021) mientras que la Oficina de las Naciones Unidas contra la Droga y el Delito (UNODC) presenta datos de la Administración para el Control de Drogas de EE. UU. (DEA) que indican que en 2018 y 2019, el 94 y 64% de muestras analizadas respectivamente, se elaboraron con el método Janssen. Este cambio en la metodología puede estar vinculado a la fiscalización internacional de los precursores NPP y ANPP en 2017 (DEA, 2019; UNODC, 2020). Hasta marzo de 2023, cinco precursores de fentanilo están sujetos a fiscalización internacional: NPP, ANPP, 4-AP, 1-boc-4-AP y norfentanilo. Otros precursores están propuestos para ser fiscalizados como la 4-piperidona. A pesar de estas regulaciones, en 2022 se incautaron 680 kg de precursores de fentanilo en territorios de la OTAN, lo que supone un aumento del 10% con respecto a 2021. La mayor parte de las incautaciones se atribuyó a ANPP, siendo EE. UU. y México los principales países involucrados en esta problemática (JIFE, 2023).

2.3 Farmacocinética

Antes de describir la farmacocinética del fentanilo, es importante señalar que los resultados obtenidos en ensayos clínicos no reflejan adecuadamente la cinética observada en el circuito ilegal. Esto se debe a que en estos estudios se han utilizado voluntarios sanos *naive* a opioides, pacientes anestesiados (a menudo intubados) o pacientes con dolor crónico, lo que genera dudas sobre la aplicabilidad de estos datos a los usuarios de fentanilo producido ilícitamente, quienes presentan tolerancia y características particulares. Además, es evidente que el fentanilo consumido en el circuito ilegal no es el mismo fármaco disponible en el entorno terapéutico. En muchos casos, el fentanilo ilegal está adulterado o sustituido por otros fármacos o drogas de abuso, e incluso puede contener precursores de síntesis. El patrón de abuso entre los usuarios de fentanilo en el circuito ilegal dista mucho de una administración única intravenosa (i.v.), y generalmente se emplean dosis mucho más altas que las utilizadas en contextos terapéuticos. Por ejemplo, en la clínica se reportan dosis altas de 60 µg/kg i.v. en bolo, mientras que se han incautado en 2022 comprimidos conteniendo como mínimo 2 mg de fentanilo, una dosis potencialmente letal. En definitiva, un usuario de fentanilo ilícito se expone a mayores

cantidades, de forma más frecuente y está expuesto a variaciones en la composición cuantitativa y cualitativa en la elaboración del producto. Esto se traduce en que los niveles plasmáticos de fentanilo varían según el contexto de administración. En pacientes en postoperatorio con sistemas de autoadministración, se observan niveles plasmáticos de fentanilo entre 0.3-0.7 ng/ml, que proporcionan una analgesia adecuada. Sin embargo, la analgesia en plano quirúrgico y la depresión respiratoria generalmente se observan con niveles en suero de entre 2 y 5 ng/ml. La hipoventilación se puede manifestar a niveles superiores a 1.5 ng/ml, que podrían no ser suficientes para lograr la analgesia deseada en algunos pacientes. En individuos *naïve* a opioides, niveles en suero superiores a 3 ng/ml pueden afectar negativamente los reflejos protectores de la vía aérea, dejándolos insensibles a la estimulación. En el caso de víctimas de sobredosis, los niveles en suero suelen estar entre 25 ng/ml y 36 ng/ml. Todo esto complica considerablemente la farmacología de los fentanilos producidos ilícitamente (Bird et al., 2023).

2.3.1 Liberación

El fentanilo fue desarrollado inicialmente para ser administrado por vía parenteral; sin embargo, se han desarrollado numerosas formas farmacéuticas debido a sus características fisicoquímicas y farmacodinámicas, que incluyen su marcada lipofilia, bajo peso molecular y alta potencia (Bird et al., 2023; Grape et al., 2010). Una búsqueda en el Centro de Información de Medicamentos (CIMA) de la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS) revela la existencia de 121 medicamentos que contienen fentanilo, disponibles en diversas formas farmacéuticas. Estas incluyen parches transdérmicos, comprimidos para chupar, sublinguales, películas bucales, pulverizadores nasales y formulaciones inyectables. Esta disponibilidad de diversas formas de administración responde a la necesidad de proporcionar liberaciones específicas del fármaco. Por ejemplo, los parches transdérmicos están diseñados para ofrecer una liberación lenta y prolongada en el tiempo, lo que es especialmente útil en el tratamiento del dolor crónico. Por otro lado, las formulaciones como comprimidos sublinguales, pulverizadores nasales y soluciones inyectables son preferidas para lograr una acción rápida y de corta duración, especialmente en situaciones de dolor irruptivo oncológico (AEMPS, n.d.; Grape et al., 2010). Esta flexibilidad en las formas de administración permite personalizar el tratamiento según las necesidades del paciente y la naturaleza del dolor a tratar.

2.3.2 Absorción

El fentanilo presenta una biodisponibilidad oral muy limitada (30-40%) debida al extenso metabolismo de primer paso hepático, lo que explica la ausencia de formulaciones para administración oral (Grape et al., 2010). Sin embargo, se han desarrollado varias formas no parenterales que son ampliamente utilizadas.

Una de las más comunes es el parche transdérmico, que es ideal para el tratamiento prolongado del dolor oncológico y crónico. Esta formulación permite mantener concentraciones estables de fentanilo en plasma durante largos periodos de tiempo con una biodisponibilidad cercana al 100%, aunque pueden pasar hasta 24 horas (h) antes de alcanzar niveles plasmáticos suficientes para un efecto terapéutico (Grape et al., 2010). Esta liberación controlada es ventajosa para el manejo continuo del dolor sin necesidad de administraciones frecuentes. A diferencia de los parches transdérmicos, las

INTRODUCCIÓN

formulaciones de liberación rápida a través de mucosa bucal y nasal están diseñadas para tratar el dolor irruptivo en pacientes oncológicos tolerantes a opioides. En el caso de las formulaciones bucales, el 25% del fentanilo se absorbe directamente a través de la mucosa bucal, evitando el metabolismo hepático de primer paso y logrando un rápido inicio de acción en unos 5-10 minutos (min). El 75% restante es deglutido y absorbido lentamente, lo que permite mantener niveles plasmáticos en el rango analgésico durante aproximadamente 2 h, con una biodisponibilidad total cercana al 50% (Grape et al., 2010). En el ámbito del uso ilícito, el fentanilo se consume principalmente inyectado o inhalado (intranasal), y en ocasiones se fuma. El inicio del efecto subjetivo percibido por el usuario es casi instantáneo tras la administración i.v. La administración intranasal presenta perfiles farmacocinéticos y farmacodinámicos muy similares a la misma dosis administrada de forma intravenosa (Bird et al., 2023) .



Figura 4 | Formas farmacéuticas en las que se administra fentanilo. Parches transdérmicos (Durogesic®), comprimidos para chupar con aplicador bucal (Actiq®) y solución para pulverización nasal (Pecfent®).

2.3.3 Distribución

El fentanilo tiene un elevado volumen de distribución (3.5- 8 L/kg) y un aclaramiento alto (30-72 L/h), lo cual refleja claramente su gran afinidad por los tejidos (Grape et al., 2010). Este fármaco se une a proteínas plasmáticas entre un 86 y 89%, distribuyéndose aproximadamente en un 78% a la albumina y un 12% a la glicoproteína ácida α_1 . Su distribución se realiza tanto por difusión pasiva como mediante transportadores. El transportador de aniones orgánicos OATP (Elkiweri et al., 2009) está implicado en la entrada de fentanilo a SNC, mientras que la glicoproteína P en células endoteliales de la BHE es responsable de su eliminación del SNC, aunque existen evidencias contradictorias sobre este proceso (Coluzzi et al., 2022).

La elevada lipofilia del fentanilo permite que se distribuya rápidamente hacia los tejidos con mayor perfusión sanguínea (cerebro, pulmones, corazón), para luego redistribuirse más lentamente hacia tejidos con menor perfusión (músculo esquelético, tejido adiposo). Las concentraciones de fentanilo en tejidos son consistentemente más altas que en plasma, lo que refleja su alta afinidad por estos. En estudios realizados en ratas y en voluntarios sanos, las concentraciones de fentanilo alcanzan su máximo casi inmediatamente después

de la administración intravenosa, seguido de una redistribución hacia el tejido adiposo, donde las concentraciones máximas se observan entre 60 y 90 min tras la dosis (Bird et al., 2023; Comer & Cahill, 2019; Grape et al., 2010). La redistribución de fentanilo hacia el músculo esquelético podría desempeñar un papel clave en la rigidez muscular asociada con su uso ilícito. Esta rigidez muscular contribuye significativamente al perfil de sobredosis letal del fentanilo, ya que afecta a la musculatura de la pared torácica, provocando el denominado “síndrome del pecho de madera” (*wooden chest syndrome*). Este síndrome se caracteriza por la rigidez extrema del tórax, lo que dificulta la respiración y agrava el riesgo de muerte. Además, tras múltiples dosis, la acumulación de fentanilo en tejidos periféricos puede generar efectos clínicamente significativos. La corta duración de acción del fentanilo fomenta el uso frecuente por parte de los usuarios, lo que a su vez puede potenciar estos efectos acumulativos, aumentando el riesgo de toxicidad y sobredosis. La acumulación de fentanilo puede dar lugar a un aclaramiento prolongado y la aparición de picos secundarios en sus concentraciones plasmáticas. Estos picos se han descrito en un intervalo de 45 min a 6 h tras la administración i.v. y son clínicamente significativos. Durante este tiempo, se han reportado casos de estrés respiratorio, alteraciones en los niveles de CO₂ compatibles con depresión respiratoria y rigidez torácica. Estos efectos pueden requerir la intervención con antagonistas opioides, incluso cuando los efectos subjetivos del fentanilo hayan remitido. Se hipotetiza que estos picos secundarios se deben a dos fenómenos: la reabsorción enterogástrica y la redistribución del fentanilo desde los tejidos periféricos, que contribuyen a su persistente efecto farmacológico (Bird et al., 2023).

La finalización del efecto de fentanilo se ve mediada principalmente por la redistribución además del metabolismo del fármaco (Bird et al., 2023; Comer & Cahill, 2019; Grape et al., 2010).

2.3.4 Metabolismo

El 99% del fentanilo es metabolizado a norfentanilo mediante la N-dealquilación del anillo piperidínico por la acción de la isoforma CYP3A4 del citocromo P-450, y en menor medida por las isoformas CYP3A5 y CYP3A7. El metabolismo por CYP3A4 favorece interacciones con sustratos, inhibidores o potenciadores de esta enzima, como ritonavir o diltiazem, así como variaciones farmacocinéticas debidas a diferencias genéticas. El resto del fentanilo se metaboliza de forma minoritaria por hidroxilación e hidrólisis, generando metabolitos inactivos como el 4'-hidroxifentanilo, beta-hidroxifentanilo, 4'-hidroxi-3'-metoxifentanilo (por acción de la enzima catecol O-metiltransferasa; COMT) o 4-anilino-N-fenetilpiperidina (4-ANPP) (Bird et al., 2023; Comer & Cahill, 2019). El metabolismo del fentanilo es rápido, detectándose metabolitos tan solo 90 segundos (seg) después de una dosis i.v. y alcanzando un máximo a los 90 min. Tras 72 h, solo un 6.4% de la dosis se detecta intacta en orina. El 80% del fentanilo aparece en forma de metabolitos en orina (76%) o en heces (8%), lo que indica que el fentanilo se excreta principalmente vía renal (Bird et al., 2023).

2.3.5 Excreción

Tras la administración i.v, el fentanilo tiene una semivida de eliminación ($t_{1/2}$) de 3 a 8 h, lo cual se debe al proceso de redistribución. Sin embargo, este parámetro puede variar entre 2 y 27 h según la vía de administración (Malone, 2020). Aunque el fentanilo tiene

INTRODUCCIÓN

una corta duración de acción tras una única dosis, esta se puede prolongar mediante dosis múltiples o infusiones continuas (Bird et al., 2023; Comer & Cahill, 2019; Grape et al., 2010).

Todas estas propiedades farmacocinéticas contribuyen al elevado potencial de abuso del fentanilo y a la probabilidad de sobredosis tras su consumo, debido a la corta duración del efecto y a la consecuente necesidad de dosis frecuentes (Malone, 2020).

2.4 Farmacodinamia

Como la mayoría de opioides, el fentanilo produce sus efectos farmacológicos a través de la activación del receptor MOR y tiene poca afinidad por los receptores KOR y DOR. El fentanilo es un agonista muy eficaz del MOR, con una constante de afinidad K_i de 1.35 nM en MORs humanos recombinantes. Esta afinidad es muy similar a la de morfina ($K_i=1.17$ nM), pero el fentanilo presenta un inicio de acción mucho más rápido, una duración del efecto considerablemente menor y una potencia analgésica 100 veces mayor que la morfina. La diferencia de potencia entre fentanilo y morfina no se explica por la afinidad o la semivida de eliminación, sino porque el fentanilo cruza rápidamente la BHE debido a su marcada lipofilia. La corta duración de acción de fentanilo con respecto a morfina se debe a la rápida disminución de los niveles circulantes por la distribución a otros tejidos y secuestro en grasa corporal, consecuencia de la marcada lipofilia que presenta este fármaco (Comer & Cahill, 2019).

Como podemos observar, el fentanilo presenta unas características farmacológicas algo anómalas en comparación con el opioide prototípico, la morfina. La unión de fentanilo en el sitio ortostérico parece ser más compleja que para otros opioides, lo cual puede derivarse de la estructura larga y flexible de la molécula, lo que ha llevado a la descripción de tres posiciones de unión en modelos *in silico*. La alta lipofilia de la molécula de fentanilo permite que, incluso en su forma protonada, penetre significativamente en la membrana lipídica, a diferencia de lo que ocurre con la morfina. Este movimiento del fentanilo dentro y fuera de la membrana en las cercanías del MOR podría incrementar la probabilidad de unión simplemente por la disponibilidad de fentanilo en las inmediaciones del receptor. Además, se ha observado que el fentanilo puede acceder al sitio ortostérico a través de la zona lateral del receptor, utilizando un poro entre las regiones transmembrana 6 y 7 (Kelly et al., 2023).

3. Uso terapéutico e impacto de los opioides: del tratamiento al abuso

3.1 Uso terapéutico

En general, los medicamentos que contienen opioides como principio activo se emplean para el tratamiento de dolor crónico, tanto oncológico como no oncológico, en grados moderados a severos. Además, algunos fármacos opioides se emplean como antidiarreicos, antitusígenos o anestésicos (Tabanelli et al., 2023). El fentanilo, en concreto, se emplea en la práctica clínica a través de diversas formulaciones para tratar el dolor crónico, el dolor perioperatorio, el dolor irruptivo oncológico, así como en calidad de agente anestésico o coadyuvante para lograr una anestesia equilibrada (Comer & Cahill, 2019; Kelly et al., 2023; Lambert, 2023). Los efectos analgésicos y anestésicos de fentanilo pueden ir acompañados de reacciones adversas a medicamentos (RAMs), que

presentan un perfil similar al de otros opioides. Algunas de estas RAMs pueden ser consideradas potencialmente deseadas, como la euforia, ansiolisis, relajación o inhibición de la tos, mientras que otras son no deseadas, como mareos, náuseas y vómitos, estreñimiento, depresión respiratoria, hiperalgesia, tolerancia, trastorno por consumo de opioides (TCO), sobredosis, alteraciones hormonales, inmunosupresión, prurito, mioclonías, hipotensión ortostática, síncope postural, urgencia o retención urinaria, rigidez de la pared torácica y síndrome de abstinencia neonatal (CIMA., n.d.; Armenian et al., 2018; Lambert, 2023; Suzuki & El-Haddad, 2017; Tabanelli et al., 2023).

Entre todas estas RAMs, las más frecuentemente provocadas por los opioides son el estreñimiento y las náuseas, y su manejo clínico es muy complejo. Los efectos no deseados producidos por los opioides pueden ser tan marcados que requieren la interrupción del tratamiento, lo que a su vez aumenta el riesgo de emplear dosis más bajas de las necesarias, produciendo una analgesia insuficiente (Tabanelli et al., 2023). Sin embargo, como se verá en los apartados siguientes, las RAMs con mayor relevancia clínica y gravedad son el desarrollo de dependencia física y TCO, así como la depresión respiratoria y la sobredosis. Por otro lado, la RAM responsable de la mayoría de las muertes por sobredosis de opioides es la depresión respiratoria (Pattinson, 2008; White & Irvine, 1999).

3.1.1 Dolor neuropático y opioides

Se estima que uno de cada cinco ciudadanos estadounidenses sufre de dolor crónico (Yong et al., 2022), es decir, un dolor que persiste más de tres meses y puede ser causado por alguna patología, lesión, tratamiento médico, inflamación o tener un origen idiopático (Dowell et al., 2023). De forma similar, la prevalencia en adultos europeos en 2006 se estimó en un 19% (Breivik et al., 2006). El dolor crónico tiene un impacto muy marcado en la vida de las personas, afectando su calidad de vida, funcionalidad física y salud mental. En términos económicos, los costes derivados de la pérdida de productividad, discapacidad y gastos directos derivados del dolor crónico en EE. UU. se estimaron entre 560 y 635 billones de dólares en 2011 (Dowell et al., 2023). Uno de los tipos de dolor crónico es el dolor neuropático, que afecta al 7-10% de la población mundial (Van Hecke et al., 2014) y tiene un alto impacto global. Este dolor es causado por una lesión o enfermedad en el sistema nervioso somatosensorial, responsable del control y la coordinación de la sensibilidad y movilidad corporal. Entre las enfermedades asociadas a este tipo de dolor se encuentran la neuralgia del trigémino, la polineuropatía dolorosa, la neuralgia postherpética y el dolor central tras un ictus. La mayoría de los pacientes que sufren de dolor neuropático experimentan sensaciones de dolor permanentes o intermitentes que describen frecuentemente como quemazón, pinchazos o compresión. Estos síntomas pueden ser espontáneos o provocados por estímulos como el tacto ligero o el frío y a menudo, se manifiestan como hipersensibilidad. Esta puede presentarse como alodinia, donde un estímulo que normalmente no causa dolor lo provoca, o como hiperalgesia, una respuesta dolorosa exagerada ante un estímulo que normalmente generaría dolor (Finnerup et al., 2021).

El tratamiento farmacológico de primera línea para el dolor neuropático incluye antidepressivos como los inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina y noradrenalina (IRSN), tales como la duloxetina, y antidepressivos tricíclicos, como la amitriptilina o la clomipramina. También se utilizan anticonvulsivantes, como la

INTRODUCCIÓN

gabapentina o la pregabalina, además de parches tópicos que contienen lidocaína o capsaicina (Dowell et al., 2016, 2023; Finnerup et al., 2015).

A pesar de que los opioides no son un tratamiento de primera línea para el dolor crónico no oncológico, su prescripción es frecuente. Se estima que entre el 3% y 4% de los adultos en EE.UU. reciben tratamiento a largo plazo con opioides para manejar este tipo de dolor. Su uso en el dolor neuropático también es común, a pesar de que su manejo es más complejo que el del dolor agudo, lo que incrementa el riesgo de desarrollar TCO y otros problemas asociados al uso prolongado de estos medicamentos (Dowell et al., 2016, 2023). Una revisión de Cochrane señala que la eficacia de los analgésicos opioides en el tratamiento del dolor neuropático es incierta. Además, los autores destacan que la aparición de RAMs es común en este tipo de tratamiento, aunque generalmente no representan una amenaza para la vida de los pacientes (Mcnicol et al., 2013). Otras dos revisiones realizadas por Cochrane concluyen que no hay evidencia suficiente para afirmar o descartar la eficacia de morfina (Cooper et al., 2017) o fentanilo (Derry et al., 2016) en el tratamiento del dolor neuropático. La última guía de prescripción de opioides del CDC indica, basándose en ensayos clínicos, que en comparación con placebo, el tratamiento con opioides durante uno a seis meses tiene un efecto beneficioso leve, que los efectos de los opioides tienden a disminuir con tratamientos prolongados, y que su uso se asocia con un mayor riesgo de discontinuación debido a RAMs como náuseas, vómitos, estreñimiento o somnolencia, aunque no hay diferencias en la incidencia de RAMs graves (Chou et al., 2020; Dowell et al., 2023; Krebs et al., 2018). En resumen, la evidencia sobre la eficacia a largo plazo del uso de opioides en el tratamiento de dolor crónico no oncológico es limitada (Dowell et al., 2016). No obstante, el uso de opioides en combinación con fármacos no opioides o tratamientos no farmacológicos, es decir, en una terapia multimodal, puede ofrecer efectos sinérgicos y permitir la reducción de la dosis en pacientes con dolor neuropático (Dowell et al., 2023).

3.2 Uso ilícito

En el uso ilícito de fentanilo se busca obtener los efectos positivos descritos previamente: euforia, relajación y ansiólisis. En comparación con la morfina, el fentanilo produce un efecto eufórico rápido e intenso (*rush sensation*), una duración corta (1-2 h) y una mayor potencia, lo que puede superar la tolerancia del usuario e incluso los efectos de los antagonistas opioides. Algunos usuarios de heroína describen los efectos del fentanilo como más potentes que los de heroína, aunque no les agrada su inicio de acción tan rápido y la severidad de sus efectos físicos y neurológicos (Kuczyńska et al., 2018). Las motivaciones que han reportado los usuarios de fentanilo incluyen superar los niveles de tolerancia debido a su alta potencia, retrasar el inicio de los síntomas de abstinencia, y experimentar intensas sensaciones de “subidón” y euforia, además de aliviar el estrés, la ansiedad o el dolor (Tsang et al., 2024).

3.2.1 Mercado ilícito de fentanilo

Existen principalmente dos fuentes de obtención de fentanilo ilícito: los laboratorios clandestinos y el desvío de medicamentos de prescripción médica. La mayoría del abuso de fentanilo en Norteamérica y el este de Europa involucra fentanilo de producción ilícita en laboratorios clandestinos en China que abastecen a América del Norte, así como producción en Rusia, Bielorrusia o Ucrania que suministran a la zona oeste de Europa.

Sin embargo, una proporción importante del fentanilo en el oeste de Europa y Australia proviene del desvío de medicamentos de prescripción (Kuczyńska et al., 2018). El fentanilo producido en laboratorios clandestinos se vende comúnmente en forma de polvo o polvo compactado, que puede disolverse e inyectarse, fumarse o inhalarse, así como en forma de spray nasal, líquido o comprimidos. El fentanilo se encuentra frecuentemente mezclado con o sustituyendo a la heroína, combinado con cocaína, o en forma de comprimidos falsos que se venden como oxicodona (Norco®, OxyContin®), hidrocodona o alprazolam (Xanax®) (Armenian et al., 2018; DEA, 2016; Kuczyńska et al., 2018; Suzuki & El-Haddad, 2017). Un estudio reciente realizado en San Francisco, aunque con un tamaño muestral limitado, describe la transición de usuarios que solían inyectar fentanilo a fumarlo, motivados por el temor a sufrir sobredosis o por dificultades en el acceso venoso. Este uso presenta un componente más social, con la compartición entre usuarios de drogas de información, así como de los residuos de fentanilo y metanfetamina generados en la parafernalia utilizada para fumar. Además, se reporta que el precio medio de venta es de 10 dólares por gramo, con un uso diario estimado de grandes dosis de fentanilo: hasta 50 mg de fentanilo puro por día (Ciccarone et al., 2024).

El uso inadvertido de heroína adulterada o sustituida por fentanilo por parte de usuarios de heroína es especialmente peligroso ya que la elevada potencia del fentanilo incrementa significativamente el riesgo de sobredosis (Kuczyńska et al., 2018). En el caso de usuarios de drogas que nunca han consumido opioides, el riesgo de sobredosis es incluso más pronunciado. Este riesgo se ve facilitado por la circulación de comprimidos falsos que contienen fentanilo y que se hacen pasar por medicamentos que supuestamente contienen opioides o benzodiazepinas de prescripción médica. En 2022, la DEA reportó la incautación de comprimidos falsos que contenían hasta 5.1 mg de fentanilo, y el 42% de los comprimidos contenían 2 mg, una dosis potencialmente letal (Bird et al., 2023; Comer & Cahill, 2019; DEA, 2016; Kuczyńska et al., 2018; Suzuki & El-Haddad, 2017).

La otra forma de obtener fentanilo para el consumo ilícito es a través de medicamentos de prescripción, especialmente parches transdérmicos, y en menor medida, formulaciones bucales, nasales o preparaciones parenterales. Los parches transdérmicos suelen ser fáciles de conseguir, ya que pueden ser comprados a pacientes, robados a familiares o personas en residencias de ancianos que los tienen prescritos. Además, los parches usados pueden incluso encontrarse en la basura de hospitales y geriátricos. Después de 72 h de uso, estos parches pueden contener entre el 28% y el 84% de la dosis completa, lo cual es suficiente para producir el efecto deseado, pero también puede ocasionar efectos adversos o incluso una sobredosis letal. Los parches de fentanilo pueden ser usados de diversas maneras: aplicando varios a la vez, extrayendo el fentanilo para su administración intravenosa, insuflándolo o inhalándolo, aplicando el parche en mucosas oral o rectal, ingiriendo el parche entero, masticándolo o incluso fumándolo, usando papel de aluminio (Kuczyńska et al., 2018).

3.3 Trastorno por consumo de opioides (TCO)

El trastorno por uso de opioides (TCO) se define en el DSM-V-TR como un patrón problemático de consumo de opioides que provoca un deterioro o malestar clínicamente significativo y que se manifiesta, al menos, por dos de los siguientes criterios en un plazo de doce meses: (1) consumo de opioides en mayor frecuencia, cantidad o duración de lo previsto, (2) deseo persistente o esfuerzos fallidos por abandonar o controlar el consumo

INTRODUCCIÓN

de opioides, (3) inversión de un tiempo relevante en actividades destinadas a conseguir opioides, consumirlos o recuperarse de sus efectos, (4) ansia o poderoso deseo de consumir opioides (*craving*), (5) consumo recurrente de opioides que lleva al incumplimiento de tareas fundamentales en el trabajo, la escuela o el hogar, (6) consumo continuado de opioides a pesar de experimentar problemas sociales o interpersonales persistentes o recurrentes, provocados o exacerbados por sus efectos, (7) abandono o reducción de actividades importantes de naturaleza social, profesional o recreativa debido al consumo de opioides, (8) consumo recurrente en situaciones que implican un riesgo físico, (9) continuación del consumo a pesar de sufrir un problema físico o psicológico persistente o recurrente, probablemente causado o exacerbado por el uso de opioides, (10) presencia de tolerancia, definida como la necesidad de consumir cantidades mayores para lograr el efecto deseado o una disminución notable del efecto tras el uso continuado de la misma cantidad de opioide y, (11) presencia de abstinencia, manifestada por la aparición de síntomas característicos del síndrome de abstinencia de opioides o por el consumo para aliviar o evitar dichos síntomas. Los criterios 10 y 11 no se aplican a individuos que solo consumen opioides bajo supervisión médica adecuada, y la gravedad del TCO variará según los criterios que cumpla el paciente (American Psychiatric Association, 2024).

3.3.1 Prevalencia

El estudio de carga global de enfermedades de 2016 estimó que la prevalencia y la incidencia global del TCO eran aproximadamente de 27 y 3 por cada mil habitantes respectivamente, generando un valor de 11132 años de vida perdidos por enfermedad por cada mil personas. Además, se estimó que el número de diagnósticos aumentó en un 18% entre 2006 y 2016 (Vos et al., 2017). El TCO afecta especialmente a Norteamérica y EE.UU. En este país, cerca de 3 millones de ciudadanos sufren o han sufrido TCO, mientras que, a nivel global, 16 millones de personas padecen este trastorno (Tabanelli et al., 2023). Datos muy recientes indican que, en 2022, el 4% de la población de EE. UU. cumplía los criterios para el diagnóstico o habían recibido tratamiento para TCO el año anterior, lo que afecta a más de 9 millones de ciudadanos estadounidenses (Dowell et al., 2024). En España, el 1.8% de los adolescentes entre 14 y 18 años ha utilizado opioides de prescripción médica de forma recreativa en algún momento de sus vidas (OEDA, 2023). Así mismo, el 15.8% de los adultos españoles ha consumido analgésicos opioides en algún momento, un porcentaje que ha aumentado en relación con encuestas previas, atribuible a un aumento en la prescripción médica (OEDA, 2022). Se reporta una prevalencia muy baja del consumo recreativo de opioides en población española, del 0.26% (Pulido et al., 2022), un valor similar al 0.3% reportado en la Unión Europea (EUDA, 2024a). Un estudio realizado en España con 404 pacientes que recibieron tratamiento con opioides para dolor crónico no oncológico durante más de noventa días muestra que el 31.2% de los pacientes cumple los criterios del DSM-V para TCO moderado o severo (Rodríguez-Espinosa et al., 2021).

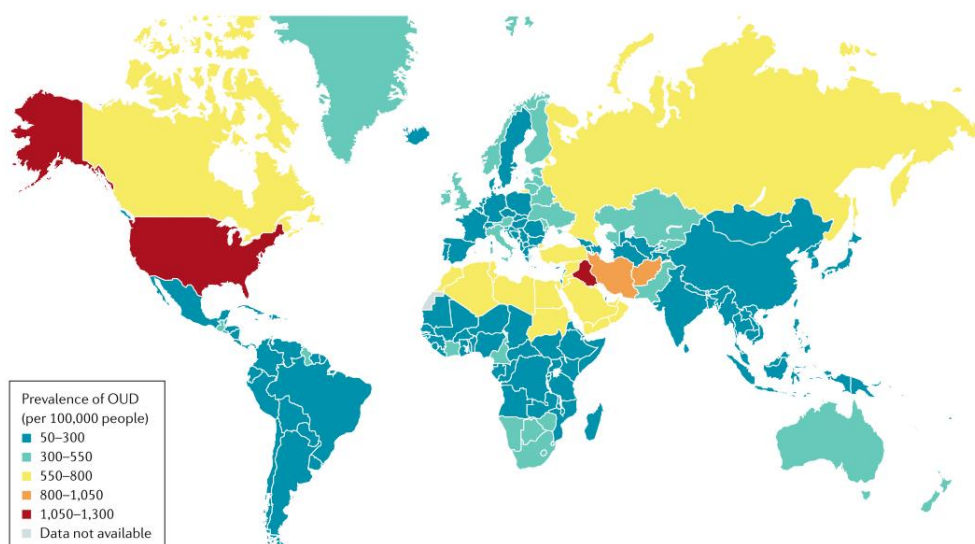


Figura 5 | Prevalencia del TCO estandarizada por edad por cada 100000 personas. Imagen obtenida de Strang et al., 2020.

3.3.2 Desarrollo y curso

El TCO puede comenzar a cualquier edad, aunque es frecuente que su inicio ocurra a finales de la adolescencia o al comienzo de la veintena. Este consumo inicial puede reflejar el deseo de aliviar el estrés o el dolor psicológico. Se ha mostrado que cuando surge un TCO que precisa tratamiento, el trastorno puede persistir durante muchos años con periodos breves de abstinencia; sin embargo, sólo una minoría logra alcanzar la abstinencia a largo plazo. Los individuos con TCO suelen desarrollar respuestas condicionadas a los estímulos relacionados con la droga, por ejemplo, ansia reactiva al ver imágenes de la droga o su parafernalia. Estas respuestas contribuyen a las recaídas, son difíciles de extinguir y pueden persistir durante mucho tiempo después de haber concluido la abstinencia (American Psychiatric Association, 2024).

3.3.3 Características asociadas y comorbilidades

Todo intento de intoxicarse con opioides puede generar una sobredosis letal o no letal, caracterizada por la presentación de inconsciencia, depresión respiratoria y pupilas puntiformes. El TCO también puede estar asociado con un historial de delitos relacionados con las drogas, como posesión o distribución, robo y hurto. Sin embargo, entre los profesionales sanitarios y el personal con fácil acceso a medicamentos opioides se presentan perfiles diferentes, lo que implica problemas para ejercer su profesión y para interactuar con otros profesionales de la salud y agencias administrativas. Además, los problemas matrimoniales, el desempleo y empleo irregular pueden asociarse al TCO en todos los niveles socioeconómicos (American Psychiatric Association, 2024).

Además de la sobredosis, la comorbilidad más frecuente asociada al TCO son las infecciones víricas (VIH, VHC) y bacterianas, especialmente entre consumidores de opioides inyectables. El TCO se suele asociar con trastornos por consumo de otras sustancias, como tabaco, cannabis, estimulantes o benzodiazepinas. Además, los individuos con TCO pueden presentar otras comorbilidades psiquiátricas, como trastorno bipolar de tipo I, trastorno de estrés postraumático, trastornos de personalidad antisocial,

limite o esquizotípico, trastorno depresivo persistente o trastorno depresivo mayor. Estas comorbilidades pueden ser previas al consumo de opioides o exacerbadas por el mismo. Los episodios depresivos son especialmente frecuentes durante la intoxicación crónica o relacionados con factores de estrés físico o psicosocial asociados al TCO. El TCO se relaciona con un mayor riesgo de intentos de suicidio o suicidio consumado; de hecho, existen estudios que indican que, en los consumidores habituales de opioides, el suicidio es una causa frecuente de mortalidad. Para ilustrar el impacto de esta enfermedad, es relevante mencionar que el índice de mortalidad en individuos con TCO es entre 6 y 20 veces mayor que en la población general (American Psychiatric Association, 2024).

3.3.4 Abstinencia de opioides

La abstinencia provocada por opioides se define en el DSM-V-TR estableciendo en primer lugar que debe haber un cese o reducción de un consumo de opioides que ha sido muy intenso y prolongado (de varias semanas o más) o la administración de un antagonista opioide tras consumo prolongado de opioides. En el plazo de unos minutos o varios días después de que se produzcan los hechos citados, deben aparecer tres o más de los siguientes criterios: humor disfórico, náuseas o vómitos, dolor muscular, lagrimeo o rinorrea, dilatación pupilar, diarrea, bostezos, fiebre, insomnio, piloerección o sudoración. Todos estos signos o síntomas producen un malestar clínicamente significativo o deterioro en lo social, laboral u otras áreas importantes del funcionamiento, y, además, no se pueden atribuir a ninguna otra afección médica ni se explican mejor por otro trastorno mental, incluidas una intoxicación o abstinencia de otra sustancia (American Psychiatric Association, 2024).

La velocidad y gravedad de la abstinencia dependen de la semivida de eliminación del opioide consumido y de la duración del consumo. En el caso de la heroína, la abstinencia comienza entre seis y doce h tras el último consumo, aunque los síntomas pueden tardar en aparecer entre dos y cuatro días con la metadona o buprenorfina. En el caso de la heroína, los síntomas ceden gradualmente a lo largo de entre cinco y siete días, aunque los síntomas más crónicos como ansiedad, disforia, anhedonia, *craving* o insomnio, pueden durar semanas o meses (American Psychiatric Association, 2024)

3.3.5 La crisis por sobredosis de opioides en EE. UU. Situación en Europa

La crisis o epidemia de opioides en EE. UU. se caracteriza por la existencia de cuatro olas de mortalidad por sobredosis de opioides entre 1999 y la actualidad (Ciccarone, 2019, 2021).

La primera ola se inició en 1999 y alcanzó su punto máximo en 2017; está relacionada con los opioides de prescripción médica. La segunda ola, sin embargo, está vinculada al uso de heroína. Esta ola se inició con un aumento de sobredosis letales en 2010, superando en número de muertes a las causadas por opioides de prescripción en 2015, y alcanzó un pico en mortalidad en 2017. La droga responsable de la tercera ola fue el fentanilo y análogos, así como otros opioides sintéticos ilícitos. Esta ola se inició lentamente, pero experimentó un marcado aumento en la mortalidad en 2013-2014 y este incremento se ha mantenido hasta la actualidad. Hoy por hoy, el fentanilo domina el mercado ilícito de opioides en EE.UU. En la cuarta ola de mortalidad asociada a sobredosis, el fentanilo y sus análogos son los principales causantes, aunque también se está observando un aumento en la mortalidad relacionada con metanfetamina y cocaína. A pesar de esto, el

aumento en las muertes por sobredosis de psicoestimulantes parece estar entrelazado con la crisis de opioides. El factor común que podría explicarlo es el policonsumo. Hay datos que apoyan esta hipótesis: los opioides sintéticos están involucrados en el 40% de las muertes atribuidas a cocaína y el 14% de las atribuidas a psicoestimulantes (Ciccarone, 2019, 2021). Tanto es así, que el fentanilo se ha convertido en un gran contribuyente a las sobredosis mortales relacionadas con la cocaína. En un estudio empleando análisis de orina de más de 1 millón de pacientes, la tasa de positividad para fentanilo aumentó un 1850% en aquellos con resultados positivos para cocaína, y un 798% en los positivos para metanfetamina entre 2013 y 2018, lo cual puede haber contribuido al aumento de sobredosis relacionadas con estas drogas (Y. Han et al., 2019). Además, los datos más recientes describen la adulteración del fentanilo ilícitamente producido con xilazina, un agonista α_2 adrenérgico con efecto sedante usado en veterinaria. Entre junio de 2019 y 2022, la detección de xilazina en sobredosis inducidas por fentanilo aumento un 276%, estando presente este sedante en un 10.9% de las sobredosis por fentanilo ilícito entre junio de 2021 y 2022 (Kariisa et al., 2023).

Los últimos datos consolidados del CDC muestran que los opioides sintéticos (excluyendo la metadona), principalmente el fentanilo, estuvieron implicados en el 74.4% de las muertes por sobredosis de drogas en EE. UU. en 2022, siendo responsables de la muerte de 78838 ciudadanos estadounidenses. Por otro lado, el número de muertes por sobredosis de opioides incrementó notablemente entre 2019 y 2022, pasando de 49860 a 81806, coincidiendo con un marcado pico de sobredosis mortales relacionadas con fentanilo, sobre la ya de por sí creciente tendencia de mortalidad por opioides sintéticos desde 2013. A su vez, las sobredosis mortales ocasionadas por opioides de prescripción médica han ido disminuyendo desde su pico en 2011, con un total de 16416 muertes en 2022. Esto indica que los opioides de prescripción médica ya no son los principales responsables de la actual crisis de opioides. Un patrón similar se observa con la heroína, que alcanzó un pico de 15649 muertes por sobredosis en 2016 y ha mostrado una tendencia descendente con 5871 sobredosis mortales en 2022 (NIDA, 2023).

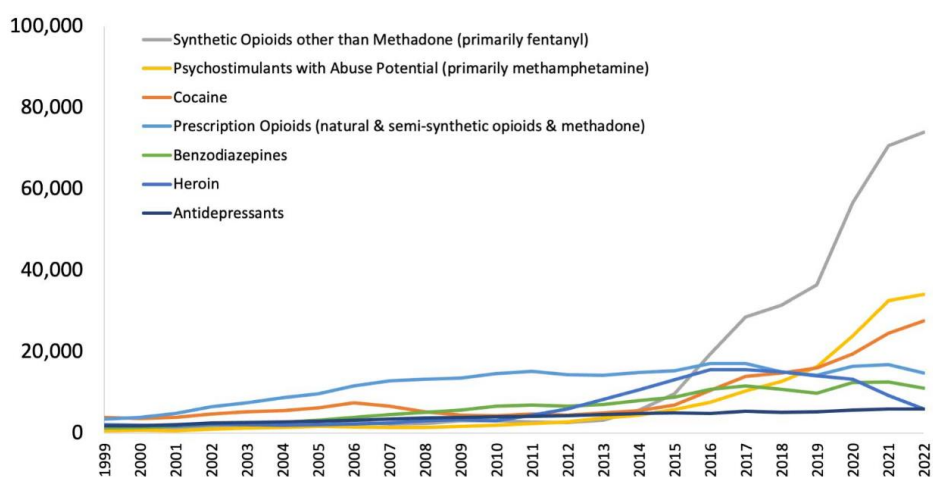


Figura 6 | Mortalidad por sobredosis de diferentes drogas en EE. UU. entre los años 1999 y 2022.
Imagen obtenida de NIDA, 2023.

En definitiva, el principal factor responsable de la crisis por sobredosis de opioides en EE. UU., a día de hoy, es el fentanilo (Ciccarone, 2019), y la epidemia de sobredosis por

opioides ha sido exacerbada de manera significativa por este fármaco (Volkow & Blanco, 2023).

Es importante destacar que la situación en Europa contrasta con la que se vive en EE. UU. Se estima que en la Unión Europea (EU) se registraron 6392 muertes por sobredosis de drogas en 2022, lo que representa un ligero incremento respecto a 2021 (6166), aunque este dato probablemente está infraestimado. Los opioides, a menudo en combinación con otras sustancias, estuvieron presentes en el 74% de las sobredosis mortales reportadas en la EU en 2022. Un factor que podría explicar el contraste con la situación estadounidense es que el opioide responsable de la mayoría de la sobredosis en Europa no es el fentanilo, sino la heroína, la cual se estima estuvo implicada en más de 1800 muertes en la EU en 2022. Los datos disponibles muestran que el fentanilo y sus análogos se asociaron a 163 sobredosis mortales en 2022 en la EU, una cifra muy diferente cuantitativa- y cualitativamente a la de EE. UU., ya que en algunas de estas sobredosis el fentanilo provenía de medicamentos de prescripción y no fentanilo ilícito. En España, la heroína estuvo implicada en el 24% de las sobredosis mortales en 2021, lo que representó un total de 222 muertes. También se ha reportado sobredosis fatales por metadona y otros opioides sintéticos, como los de la familia de los nitazenos, algunos de ellos más potentes que fentanilo. Sin embargo, estos opioides no son frecuentes, aunque han aparecido con mayor regularidad en algunos países bálticos (EUDA, 2024b).

3.3.5.1 Factores que afectan a las olas de la crisis por sobredosis de opioides: el papel de la oferta

Es conveniente analizar los factores involucrados tanto desde la perspectiva de la oferta como de la demanda para comprender el desarrollo y el contexto de la actual crisis de sobredosis por opioides en EE. UU.

Se ha aceptado que la primera ola de la crisis de sobredosis por opioides tiene un origen iatrogénico, es decir, ocasionada por el uso de opioides de prescripción médica en un contexto terapéutico. Las prescripciones de medicamentos opioides se triplicaron, empezando a aumentar en la década de 1990 y alzando su máximo en 2011. Este aumento en prescripciones se ha correlacionado con un aumento en las sobredosis y otros efectos adversos. Además, algunos autores señalan un factor relevante por el lado de la demanda: la existencia de una población envejecida con altas tasas de dolor, discapacidad, malas condiciones socioeconómicas, baja cohesión social y malestar psicológico, factores que podrían haber impulsado a esta población a buscar opioides como solución inicial (Ciccarone, 2019).

La segunda ola de la crisis de opioides, caracterizada por el uso de heroína, está estrechamente entrelazada con la primera. Muchos usuarios que abusaban de opioides de prescripción médica comenzaron a consumir heroína a medida que su dependencia crecía y necesitaban dosis mayores o más frecuentes. Aunque técnicamente los usuarios podían obtener opioides tanto en el circuito terapéutico como en la calle, surgió un factor clave desde el lado de la oferta: la amplia disponibilidad de heroína de alta pureza a bajo coste. Este hecho fue un catalizador principal en la transición del consumo de opioides de prescripción médica a la heroína durante la segunda ola. Además, en menor medida, también influyó la reformulación de un medicamento que contenía oxicodona (OxyContin®), que se actualizó para ser de liberación prolongada con el fin de reducir su

potencial de abuso. Sin embargo, esta estrategia fue rápidamente superada por los usuarios, que lograban manipular las nuevas formulaciones para continuar abusando de ellas (Ciccarone, 2019).

El fentanilo y sus análogos son los principales responsables de la tercera ola de muertes por sobredosis de opioides. En este punto, el fentanilo entra al mercado ilícito sustituyendo o adulterando la heroína, o bien en forma de comprimidos falsificados que imitan medicamentos de prescripción médica, generalmente opioides o benzodiazepinas. La responsabilidad de fentanilo y sus análogos en esta tercera ola se evidencia por la correlación regional entre las incautaciones de fentanilo y las muertes por sobredosis de opioides sintéticos. Esta correlación se observó, además, en dos regiones que ya habían sido gravemente afectadas por la segunda ola: el noreste y centro-oeste de EE. UU. Las disparidades regionales en el impacto de esta crisis refuerzan la idea de que la tercera ola se originó por factores relacionados con el lado de la oferta. Si la crisis hubiera sido impulsada principalmente por la demanda, probablemente no se habrían observado disparidades regionales tan marcadas (Ciccarone, 2019). La oferta de fentanilo se ve impulsada por el hecho de que su síntesis es sencilla y barata en comparación con los procesos necesarios para obtener heroína. Además, el fentanilo es extremadamente potente, fácil de ocultar y transportar, lo que reduce los riesgos de represalias legales y, al mismo tiempo, incrementa los beneficios económicos para quienes lo trafican. El precio de venta del fentanilo a los narcotraficantes es muy bajo y se puede añadir a la heroína sin que el usuario final lo note. Un informe de la DEA estima que al elaborar comprimidos que contengan entre 1 y 1.5 mg de fentanilo, y considerando un precio de venta al consumidor de entre 10 y 20 dólares, las organizaciones del narcotráfico podrían generar ganancias de entre 13.3 y 20 millones de dólares (Comer & Cahill, 2019; DEA, 2016).

Teniendo esto en cuenta, ciertos autores defienden que la entrada del fentanilo en el mercado obedece también al intento de remplazar la heroína durante periodos de desabastecimiento. Sin embargo, evidentemente hay muchos otros factores que pueden contribuir a esta situación: métodos sintéticos más eficientes, el comercio y la comunicación *online*, así como la lenta fiscalización en países productores (Pardo et al., 2019). Además, ha habido un cambio en las características demográficas de los usuarios en esta ola. Anteriormente, las tasas de sobredosis eran mayores entre población blanca no hispánica de entre 45 y 54 años, lo cual se atribuía a disparidades en el acceso a servicios de salud, ya que la población negra o latina tenía un menor acceso a atención sanitaria privada. Durante la segunda ola, las sobredosis empezaron a observarse en personas más jóvenes, y actualmente las tasas de sobredosis están aumentando de manera preocupante entre la población afroamericana (Ciccarone, 2019).

En resumen, los factores relacionados con la oferta de opioides han tenido un papel más relevante que los de la demanda en la crisis de opioides en EE. UU. Las tres olas de esta crisis se caracterizan por importantes factores de oferta: la excesiva prescripción de opioides, la disponibilidad de heroína de alta pureza y bajo coste, y la aparición de una nueva fuente ilícita de opioides sintéticos en forma de heroína adulterada y medicamentos falsificados. Aunque la demanda de medicamentos opioides de prescripción contribuyó parcialmente a la demanda de heroína, esta última, a su vez, llevó de manera inesperada a la demanda de opioides sintéticos como sustitutos o adulterantes. Actualmente, el principal factor responsable de las muertes por sobredosis de opioides es el fentanilo

(Ciccarone, 2019), y la epidemia de sobredosis ha sido significativamente exacerbada por el fentanilo (Volkow & Blanco, 2023).

Para concluir, es importante abordar una cuestión derivada de la crisis de sobredosis por opioides: ¿los usuarios de fentanilo lo consumen de forma voluntaria y consciente o lo hacen de forma inadvertida? Para responder a esta pregunta, es fundamental considerar que el mercado de opioides ilícitos ha evolucionado a lo largo de los años. Artículos e informes de años atrás indicaban que la demanda de fentanilo por parte de los usuarios estaba polarizada: algunos lo buscaban intensamente, mientras que otros trataban de evitarlo por todos los medios. En el este de EE. UU., la venta de heroína adulterada con fentanilo sigue siendo común, mientras que en el oeste es cada vez más frecuente encontrar fentanilo vendido como tal (Ciccarone, 2021). Hace algunos años, el consumo de fentanilo por parte de los usuarios era mayoritariamente inadvertido, ya que se presentaba como adulterante de la heroína o formaba parte de comprimidos (DEA, 2016). Tanto es así que existen datos de usuarios en programas de manejo de abstinencia que indican que dos tercios de aquellos que declararon no haber consumido nunca fentanilo dieron positivo para esta sustancia (Kenney et al., 2018). Sin embargo, la tendencia actual apunta hacia el uso voluntario de fentanilo, lo cual es realmente preocupante. Los consumidores afirman que el fentanilo irrumpió en el mercado de consumo de opioides ilícitos como adulterante de la heroína, pero ahora se vende explícitamente como fentanilo, incluso dificultando la disponibilidad de la heroína (Ciccarone et al., 2024).

Se han identificado grupos de individuos que consumen fentanilo de forma voluntaria, y que presentan características específicas. Estos consumidores suelen tener patrones de abuso más graves, viven en situaciones socioeconómicas más precarias y cuentan con un historial de sobredosis más elevado. Demográficamente, los usuarios voluntarios de fentanilo suelen ser hombres jóvenes, de raza blanca, que presentan un patrón de policonsumo. Prefieren autoadministrarse el fentanilo de forma intravenosa y lo consumen diariamente en la vía pública. Además, estos individuos enfrentan riesgos socioeconómicos asociados como falta de vivienda, tasas más altas de desempleo y problemas relacionados con la privación de libertad (Tsang et al., 2024).

En definitiva, la dominación del mercado ilegal de opioides más potentes y de mezclas de drogas ha resultado en un aumento sin precedentes de muertes. Los individuos que padecen TCO tienen el mayor riesgo de morir por sobredosis de opioides y, además, suelen sufrir comorbilidades psiquiátricas. El tratamiento farmacológico del TCO, junto con intervenciones dirigidas a abordar los trastornos comórbidos, no solo prevendrá las sobredosis, sino que también facilitará la recuperación (Volkow & Blanco, 2023).

3.3.6 Tratamiento farmacológico del TCO, sobredosis y desintoxicación

Los medicamentos para el tratamiento del TCO (MTCO) son el *gold standard* para el tratamiento de TCO ya que reducen significativamente el riesgo de muerte por sobredosis, las infecciones asociadas al uso de drogas y el comportamiento criminal mientras los pacientes se recuperan (Volkow & Blanco, 2023). A pesar de esto, es sorprendente la infrautilización de los MTCO. En 2022, el 3.7% de los adultos estadounidenses mayores de 18 años necesitaban tratamiento para el TCO. De este grupo, solo el 25.1% recibió MTCOs. Del resto, el 42.7% no percibían que necesitaran atención y el 30% recibió algún tratamiento que no empleaba MTCOs. Los porcentajes de tratamiento fueron mayores en

población blanca no hispánica, hombres y adultos de entre 35 y 49 años en comparación con otros grupos étnicos, como la población negra, afroamericana, hispánica o latina (a pesar de que estos colectivos fueron más afectados por las sobredosis), así como en mujeres y en poblaciones más jóvenes o mayores (Dowell et al., 2024). Los objetivos a largo plazo del tratamiento para el TCO incluyen la reducción del riesgo de muerte y enfermedad, la mejora en la salud mental, la restauración de la esfera social (como el empleo y las relaciones familiares) y la ausencia de problemas criminales (Bell & Strang, 2020; McLellan et al., 2005). La duración del tratamiento con MTCOs es variable, pero se ha demostrado que tratamientos más prolongados están asociados con mejores resultados (ASAM, 2020; Dhanda & Salsitz, 2021).

Los fármacos aprobados para el tratamiento del TCO, la sobredosis por opioides y la abstinencia inducida por opioides son la metadona, la buprenorfina, la naltrexona de liberación prolongada, la naloxona, el nalmefeno y la lofexidina.

3.3.6.1 Metadona

La metadona es el MTCO más prescrito a nivel global y el que mayor evidencia tiene de efectividad. Es un agonista total de MOR con una larga semivida de eliminación (22 h) que se dispensa habitualmente de forma diaria como solución oral, lo cual hace que su uso requiera la observación directa de personal cualificado, al menos de forma inicial. Al ser un agonista total sobre MOR, carece de techo terapéutico, lo que puede resultar en sobredosis cuando se administran dosis por encima de la tolerancia del paciente o en combinación con otros opioides o fármacos depresores como las benzodiazepinas o el alcohol. Una de las mayores limitaciones o problemas del tratamiento con metadona es, que como hemos mencionado, debe de ser en mayor o menor medida administrada en programas ambulatorios, lo que dificulta el acceso y adherencia al tratamiento, especialmente a pacientes de áreas suburbanas o rurales (Bell & Strang, 2020; Volkow & Blanco, 2023).

3.3.6.2 Buprenorfina

La buprenorfina es un agonista parcial de MOR y antagonista de KOR (Darcq & Kieffer, 2018). Se administra frecuentemente en forma de comprimidos sublinguales en coformulación con naloxona para minimizar la posibilidad de abuso por vía parenteral, aunque también hay formulaciones parenterales de liberación prolongada de administración semanal o mensual. El agonismo parcial sobre MOR de la buprenorfina hace que la aparición de depresión respiratoria severa sea menos probable, a menos que se administre en combinación con depresores del SNC. Además, el antagonismo sobre KOR puede ayudar a mejorar los síntomas afectivos (Falcon et al., 2016). Existen recomendaciones recientes que sugieren buscar una concentración plasmática sostenida mayor a la recomendada previamente, teniendo en cuenta la posible exposición a fentanilo para prevenir la abstinencia y *craving* (Volkow & Blanco, 2023).

3.3.6.3 Naltrexona

La naltrexona es un antagonista de MOR empleado en el tratamiento del TCO. Las formulaciones de liberación prolongada de naltrexona que se administran mensualmente se recomiendan en pacientes que prefieren no recibir tratamiento con agonistas opioides y para aquellos en programas de tratamiento en condiciones de privación de la libertad.

El objetivo de este tratamiento es bloquear los efectos de los opioides, facilitando así el mantenimiento de la abstinencia y reduciendo el riesgo de recaída tras un consumo compulsivo. La principal limitación de estas formulaciones es que el paciente debe dejar de consumir agonistas opioides durante, al menos, una semana antes de iniciar el tratamiento para evitar la precipitación del síndrome de abstinencia. Además, a diferencia de lo que ocurre con los agonistas totales y parciales de MOR como la metadona y la buprenorfina, la naltrexona no causa ningún efecto placentero opioide (*drug liking*). Esto puede llevar a que los pacientes que toman naltrexona tengan un cumplimiento del tratamiento más errático, lo interrumpen antes de tiempo y, en consecuencia, tengan un mayor riesgo de sobredosis letal. A pesar de esto, la adherencia al tratamiento puede ser adecuada en pacientes altamente comprometidos o forzados a cesar el consumo (Bell & Strang, 2020; Strang et al., 2020; Volkow & Blanco, 2023).

3.3.6.4 Naloxona y nalmefeno: tratamiento de la sobredosis inducida por opioides

La naloxona es un antagonista con gran afinidad por MOR que se utiliza por vía intranasal, intramuscular o intravenosa para revertir la sobredosis inducida por opioides (Volkow & Blanco, 2023).

La administración rápida de naloxona tras la sospecha de una sobredosis por opioides es de vital importancia, ya que la depresión respiratoria que puede desencadenar la muerte puede aparecer en tan solo 2 min (Green & Gilbert, 2016). Además, el uso de naloxona en pacientes *naive* a opioides es seguro y carece de efectos adversos, aunque puede precipitar el síndrome de abstinencia en aquellos que han usado recientemente opioides. Una sola dosis de naloxona (4 mg intranasal o 0.4-2 mg intramuscular) es suficiente para revertir la sobredosis entre el 75 y 100% de los casos, aunque se pueden necesitar múltiples administraciones en casos de sobredosis inducida por fentanilo debido a la corta duración del efecto de naloxona (60-90 min) en relación con la del fentanilo. La ausencia de reversión tras la administración de naloxona puede reflejar la contribución a la sobredosis de otras sustancias como alcohol, benzodiazepinas o xilazina (SAMHSA, 2018). Tras la reversión de la sobredosis, el paciente debe ser tratado en urgencias para evaluar la necesidad de una segunda dosis de naloxona, así como la posible administración de lofexidina o clonidina para controlar los síntomas de la abstinencia o el tratamiento con oxígeno o intubación. Además, en este contexto se puede iniciar el tratamiento con un agonista opioide y referir al paciente a programas ambulatorios para el tratamiento de TCO (D'Onofrio et al., 2015; Gowing et al., 2009; Volkow & Blanco, 2023).

Ciertos autores argumentan que la eficacia de naloxona es inconsistente y que la dosificación ha de ser valorada con cautela para evitar precipitar el síndrome de abstinencia. Además, se ha especulado sobre la necesidad de dosis grandes o repetidas de naloxona para revertir la sobredosis inducida por fentanilo (Y. Han et al., 2019). Respondiendo parcialmente a estas tendencias, en 2023 se autorizó una formulación nasal de otro antagonista opioide, el nalmefeno, con indicación para la reversión de sobredosis. Este antagonista MOR tiene una semivida mucho más larga que naloxona (11 h vs. 30-90 min), lo cual podría parecer beneficioso para evitar la recurrencia de la sobredosis tras administrar naloxona. La literatura más reciente, sin embargo, concluye que el empleo de altas dosis de naloxona para revertir la sobredosis por fentanilo y sus análogos no es tan

beneficioso, ya que puede precipitar el síndrome de abstinencia y la reversión puede lograrse con dos dosis estándar de naloxona, o tres en el caso del carfentanilo (Lemen et al., 2024). En cualquier caso, está comprobado que los programas destinados a facilitar el acceso y distribuir medicamentos que contienen naloxona han prevenido eficazmente la muerte por sobredosis de opioides (Y. Han et al., 2019).

3.3.6.5 Eficacia, seguridad y elección de MTCOs

Una dosis de 30 mg de metadona (D'Onofrio et al., 2015) o dosis mayores a 8 mg de buprenorfina (Kuhlman et al., 1998) son efectivas para bloquear el inicio del síndrome de abstinencia durante 24 h en la mayoría de los pacientes con TCO. Sin embargo, para evitar el uso de opioides ilícitos durante el mismo periodo de tiempo son necesarias dosis más altas. Una dosis de 50 mg de naltrexona bloquea el receptor MOR durante un periodo de entre 24 y 36 h (Bell & Strang, 2020).

Gran parte de los problemas de los MTCOs derivan de la adherencia al tratamiento, es decir, el cumplimiento del mismo de acuerdo con lo prescrito. La adherencia al tratamiento con buprenorfina es menor en comparación con metadona (Kimber et al., 2015; Mattick et al., 2014). Por ejemplo, el 74% de los pacientes tratados con metadona seguían cumpliendo el tratamiento tras 24 semanas, mientras que solo el 46% de los tratados con buprenorfina lo hicieron (Hser et al., 2014). Se ha reportado la presencia de más síntomas de abstinencia y de menos efectos positivos opioides en pacientes tratados con buprenorfina en comparación con aquellos que reciben metadona (Mattick et al., 2014). En un estudio que comparó el uso de opioides ilícitos cuatro años y seis meses después de la interrupción del seguimiento de los tratamientos con metadona o buprenorfina-naloxona, se observó que el uso de opioides fue mayor en los pacientes tratados con buprenorfina. Esto se atribuye principalmente a una menor participación en el tratamiento, aunque la mortalidad no mostró diferencias significativas entre ambos grupos de tratamiento (Hser et al., 2014).

Las formulaciones de liberación prolongada de buprenorfina han demostrado en ensayos clínicos ser igual de efectivas, pero no superiores, a las de buprenorfina sublingual (Haight et al., 2019). Por otro lado, las formulaciones de liberación prolongada de naltrexona presentan una mejor adherencia en comparación con la naltrexona oral de liberación inmediata, pero no mejor que la buprenorfina sublingual (Bell & Strang, 2020). La dificultad en la inducción, es decir, en el inicio del tratamiento con naltrexona, afecta negativamente a la tasa de recaída. Aun así, si los pacientes consiguen iniciar el tratamiento, la eficacia es similar a la de buprenorfina (J. D. Lee et al., 2018). Además, cabe mencionar que las formulaciones inyectables de liberación prolongada de naltrexona no siempre previenen el riesgo de sobredosis una vez los niveles plasmáticos descienden por debajo de cierto umbral, y se han registrado casos de sobredosis mortal inducida por opioides en pacientes expuestos a este tratamiento (Saucier et al., 2018). En definitiva, la mayor parte de la evidencia respalda que buprenorfina y metadona tienen una eficacia superior a naltrexona en la práctica clínica (Strang et al., 2020)

En cuanto al perfil de seguridad, el uso de metadona implica la inducción de un nivel de tolerancia en el paciente mayor al que tenía con el uso de opioides previo. Esto exige que la dosis inicial y su aumento a lo largo del tiempo sean cuidadosamente evaluados para evitar depresión respiratoria o sobredosis. La buprenorfina, sin embargo, al ser agonista

INTRODUCCIÓN

parcial presenta un efecto de techo terapéutico, lo que genera un riesgo de sobredosis significativamente menor que el que se presenta en la inducción del tratamiento con metadona (ASAM, 2020; Bell & Strang, 2020; Kimber et al., 2015). Hay que mencionar además que el cese de cualquier MTCO es un factor de riesgo importante para la sobredosis letal (Bell et al., 2009; Degenhardt et al., 2015; Kimber et al., 2015), así como el consumo habitual de benzodiazepinas en pacientes de TCO (E. C. Sun et al., 2017). A nivel cardiovascular, la metadona presenta una RAM relevante ya que puede prolongar el intervalo QT y, en raras ocasiones causar taquiarritmias a dosis altas (Krantz et al., 2002), mientras que la buprenorfina tiene un menor impacto sobre el intervalo QT (Wedam et al., 2007). Por otro lado, existe cierto riesgo inevitable de que los pacientes en tratamiento desvíen o distribuyan sus MTCOs. El desvío de medicamentos opioides está en proporción con la prescripción de opioides que se administran sin supervisión, lo que es coherente con el hecho de que más medicamentos opioides se desvían en el contexto del tratamiento del dolor que en el del tratamiento del TCO. El riesgo de desvío de medicamentos es más significativo en el caso de metadona y buprenorfina debido a sus propiedades farmacológicas. Por ello, según el país, se administran bajo observación directa o en programas clínicos especializados (Bell, 2010; Bell & Strang, 2020).

En cuanto a la elección del tratamiento, no se han encontrado características específicas en los pacientes que permitan predecir un mayor beneficio de un MTCO sobre otro (SAMHSA, 2018). Por lo tanto, la elección se basa frecuentemente en consideraciones prácticas, como la posibilidad de acceso a un programa de tratamiento ambulatorio, la cobertura del tratamiento por parte del seguro médico, las preferencias del paciente, los tratamientos previos, el estado actual del TCO y el entorno en el que se lleva a cabo el tratamiento (ASAM, 2020; Volkow & Blanco, 2023).

La metadona es el tratamiento que presenta mayor evidencia para mantener a los pacientes en tratamiento en contextos que implican un cierto seguimiento clínico. Sin embargo, tanto la buprenorfina como la naltrexona tienen la ventaja de que no requieren la observación diaria de la dosis por parte de los facultativos. Se recomienda un enfoque flexible, ajustando la medicación y el tratamiento según sea la respuesta (Bell & Strang, 2020). Teniendo en cuenta esto y el mejor perfil de seguridad de buprenorfina, se ha mostrado que comenzar el tratamiento con buprenorfina y realizar una transición a metadona en caso de ineficacia de la primera es igual de efectivo que iniciar el tratamiento directamente con metadona (Kakko et al., 2007).

En pacientes que no responden bien a los tratamientos habituales, el uso de agonistas opioides inyectables (iOAT) como heroína o hidromorfona, ha mostrado buenos resultados (Oviedo-Joekes et al., 2016; Strang et al., 2015). El tratamiento no solo incluye la inyección de los opioides hasta tres veces al día, sino también la administración de metadona para minimizar la abstinencia entre dosis. Este enfoque ha permitido que algunos individuos con conductas adictivas graves dejen de consumir opioides ilícitos, rompiendo así la asociación de estos con riesgos su salud y actos delictivos. El principal inconveniente de ese tratamiento es el alto nivel de atención sanitaria que requiere varias veces al día durante meses o años, así como su elevado coste y las implicaciones políticas. No obstante, hay ensayos clínicos que han mostrado que es un enfoque beneficioso y factible en países como Suiza, Holanda, Canadá o Dinamarca en pacientes con TCO refractario al tratamiento (Bell & Strang, 2020; Strang et al., 2020; Tsang et al., 2024).

¿Tiene el tratamiento del TCO inducido por fentanilo connotaciones diferentes que el TCO inducido por otros opioides? Lo cierto es que los sistemas de salud enfrentan dificultades para adaptar los tratamientos a individuos dependientes de fentanilo con TCO grave. Los tratamientos para TCO pueden ser insuficientemente efectivos para manejar los síntomas de abstinencia en pacientes dependientes de fentanilo (Englander et al., 2024; Shearer et al., 2022; Tsang et al., 2024; Volkow & Blanco, 2023). En muchos casos, los usuarios de fentanilo continúan consumiendo opioides durante el tratamiento o lo abandonan, lo que está fuertemente correlacionado con una mayor mortalidad y otros efectos adversos graves (Barnett et al., 2021; Simon et al., 2020; Southern et al., 2012; Tsang et al., 2024). Los datos sobre la eficacia de la metadona o buprenorfina en el tratamiento del TCO inducido por fentanilo ilícito son limitados. Un estudio retrospectivo mostró que el tratamiento con buprenorfina durante seis meses produjo tasas de abstinencia similares entre pacientes dependientes de fentanilo y heroína. El mantenimiento con metadona redujo el riesgo de muerte y promovió la abstinencia en usuarios de fentanilo, aunque las tasas de recaída fueron elevadas (A. C. Stone et al., 2018). En un estudio de 2020, el 53% de los pacientes con TCO que dieron positivo en análisis de orina para fentanilo se mantuvieron en tratamiento durante un año, y el 99% de los que completaron el tratamiento consiguieron cesar el consumo de fentanilo (A. C. Stone et al., 2020). Otro estudio previo de los mismos autores mostró que el 89% de los pacientes que iniciaron tratamiento con metadona se mantuvieron abstinentes durante seis meses, pero la exposición a fentanilo fue frecuente (71%) antes, durante y después del tratamiento con metadona, siendo la tasa de recaída del 57%. Los autores sugieren que a pesar de la noción de que la potencia de fentanilo puede reducir la eficacia del tratamiento con metadona, este enfoque es seguro, puede lograr la abstinencia y protege a los pacientes expuestos al fentanilo del riesgo de muerte (A. C. Stone et al., 2018). El tratamiento con metadona podría ser preferible para pacientes con alto riesgo de interrumpir el tratamiento con MTCOs y de sufrir sobredosis. Están surgiendo estudios comparativos que muestran una mayor probabilidad de cesar el tratamiento con buprenorfina-naloxona en comparación con aquellos que reciben metadona (Nosyk et al., 2024). A pesar de estas evidencias, se necesita más investigación para definir una dosis óptima en pacientes con alta tolerancia a los opioides, como aquellos que consumen fentanilo, así como establecer protocolos de inducción específicos para estos pacientes. Además, es posible que estos pacientes también se beneficien de una escalada más rápida entre la dosis inicial y la dosis terapéutica (Volkow, 2024).

En cuanto al uso de buprenorfina para el tratamiento del TCO en una situación marcada por el uso de fentanilo, se ofrecen recomendaciones específicas. Una de ellas es la búsqueda de una concentración plasmática sostenida mayor a la recomendada previamente, teniendo en cuenta la posible exposición a fentanilo para prevenir la abstinencia y *craving* (Laffont et al., 2022). Además, se sugiere el empleo de dosis altas de buprenorfina y/o la inducción con dosis bajas, dado que la acumulación de fentanilo en tejidos periféricos aumenta el riesgo de inducir síntomas de abstinencia y dificulta la inducción del tratamiento con buprenorfina (Antoine et al., 2021; Baca-Atlas & Williams, 2021; Klaire et al., 2019).

Ciertos autores opinan que la experiencia con agonistas opioides es limitada (Tsang et al., 2024) y es necesaria la investigación sobre otras alternativas como morfina oral de liberación lenta (Socias et al., 2020) o incluso el uso de agonistas opioides inyectables

(iOAT) con fentanilo (Azar et al., 2022; Krausz et al., 2022). Existe una necesidad urgente de elaborar una guía para elegir un MTCO que se ajuste a cada perfil de paciente con TCO, y esta necesidad es aún más marcada en el caso del TCO inducido por fentanilo. No abundan los ensayos clínicos que evalúen la eficacia de los MTCO en el TCO inducido por fentanilo en comparación con otros opioides, y el tratamiento de este tipo de TCO puede ser más complejo y desafiante. Se necesitan más estudios que comparen la efectividad de los MTCO, así como los protocolos de inducción y las dosis en el contexto del TCO inducido por fentanilo. También es fundamental mejorar la adherencia al tratamiento con MTCOs, determinar la duración óptima de tratamiento y optimizar las estrategias para aumentar el número de pacientes que deciden acceder a este tipo de tratamiento (Volkow & Blanco, 2023).

En definitiva, aunque los tratamientos con MTCO disponibles son muy efectivos, no todos los pacientes se benefician de ellos y las tasas de abandono del tratamiento y recaída son elevadas. Es necesario desarrollar estrategias que mejoren la adherencia al tratamiento y que se enfoquen en obtener resultados clínicos más allá de la abstinencia, como la reducción del *craving*, insomnio, la gravedad del TCO y el consumo de sustancias. Además, se deben identificar biomarcadores aceptables para monitorizar el desarrollo de nuevos medicamentos por parte de la FDA, incluyendo parámetros reportados por los pacientes (Volkow & Blanco, 2023).

3.3.6.6 Desintoxicación, lofexidina y otros tratamientos

La desintoxicación, es decir, la abstinencia supervisada en un contexto médico puede ser adecuada antes iniciar el tratamiento con naltrexona de liberación prolongada ya que requiere un mínimo de una semana de abstinencia. Sin embargo, no está recomendada como tratamiento del TCO dado que la mayoría de los pacientes recaen y el riesgo de sobredosis es marcadamente alto debido a la pérdida de la tolerancia (Dhanda & Salsitz, 2021; Kakko et al., 2003). En el contexto de la desintoxicación, se puede emplear dosis decrecientes de buprenorfina o metadona, además de fármacos agonistas α_2 adrenérgicos como lofexidina o clonidina (uso fuera de indicación), que presentan menores barreras de prescripción y una eficacia y seguridad similares a los agonistas opioides en la reducción de los síntomas de abstinencia derivados de la hiperactividad noradrenérgica. Sin embargo, estos fármacos no afectan otros síntomas, como el *craving* o la anhedonia y son más costosos (Gowing et al., 2009, 2016; Y. Han et al., 2019; Walsh et al., 2003). También existe un protocolo más rápido consistente en una única dosis de buprenorfina seguida de dosis ascendentes de naltrexona oral junto con clonidina y otros medicamentos adyuvantes, como clonazepam o proclorperazina (Sullivan et al., 2017).

3.3.6.7 Tratamiento no farmacológico del TCO

La gestión de contingencias, la terapia cognitiva conductual y otros tratamientos conductuales para el TCO no presentan evidencia robusta de ser efectivos en el tratamiento. Una de las evidencias más claras de esta ausencia de efectividad es que estos enfoques no consiguen incrementar la adherencia al tratamiento o la abstinencia en el manejo clínico (Strang et al., 2020; Volkow & Blanco, 2023). Por ejemplo, un estudio reporta que la adherencia al tratamiento con cualquiera de los MTCO es, al menos, el doble en comparación con los pacientes que solo reciben terapia conductual (67 días, 324 para metadona) (Hadland et al., 2018). Aun así, hay que mencionar que la psicoterapia

puede beneficiar a ciertos pacientes, especialmente a aquellos con comorbilidades psiquiátricas, y muchas agencias aceptan su uso por un posible efecto sinérgico con el tratamiento con MTCOs (SAMHSA, 2018; Strang et al., 2020).

4. Neurobiología del TCO

Un marco conceptual para explicar la neurobiología del TCO y otros trastornos por uso de sustancias consiste en tres etapas de un ciclo: intoxicación y consumo intensivo, abstinencia y afecto negativo, y anticipación y preocupación (o *craving*). Estas etapas reflejan la desregulación de tres dominios funcionales: la saliencia de incentivos y/o los hábitos, los estados emocionales negativos y las funciones ejecutivas. Cada una de estas etapas y dominios funcionales está mediada principalmente por tres circuitos neuronales: ganglios basales, amígdala extendida y corteza prefrontal (PFC), respectivamente. Estas tres etapas se retroalimentan entre sí, haciéndose cada vez más intensas y llevando al estado patológico conocido como adicción. En este marco, la adicción a opioides se define como un trastorno crónico recidivante que cursa con la compulsión en la búsqueda y el consumo de la sustancia, la pérdida del control para limitar su consumo, y la aparición de un estado emocional negativo en ausencia de la sustancia, lo que finalmente conduce a la recaída (Koob, 2020; Koob & Volkow, 2016).

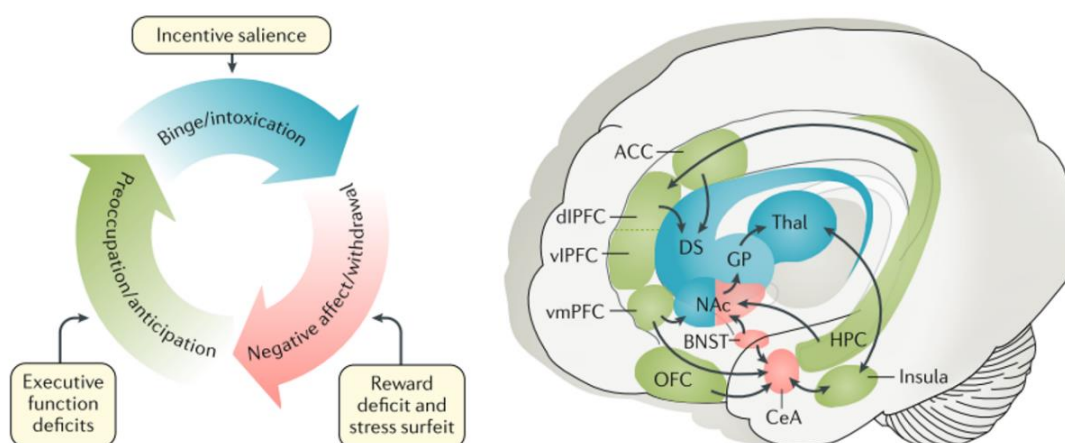


Figura 7 | Etapas del ciclo de la dependencia a las drogas. La actividad de ganglios basales, amígdala extendida y PFC está implicada en las fases de intoxicación/consumo intensivo, afecto negativo/abstinencia y preocupación/anticipación de la conducta adictiva, representados en color azul, rojo y verde respectivamente. Imagen tomada de Strang et al., 2020.

De forma muy resumida, el consumo intensivo de opioides y su correspondiente abstinencia conducen a la aparición recurrente de hipohedonia (disminución de los efectos placenteros de la droga y otros reforzantes), un estado emocional negativo, hiperalgesia y respuestas comportamentales al estrés más pronunciadas, que el individuo intenta mitigar consumiendo más opioides. En este marco teórico, el abuso de la sustancia se intensifica o reaparece durante la abstinencia de forma compulsiva debido al refuerzo negativo, ya que el consumo previene o alivia temporalmente el malestar emocional asociado con la abstinencia, conocido como hiperkatifeia. Esta búsqueda compulsiva intenta restaurar un estado hedónico normal, el cual ha sido desplazado por la carga alostática derivada del consumo repetido de la sustancia y la generación de procesos oponentes, lo que provoca una desviación de un estado hedónico homeostático a un estado hedónico alostático (Koob, 2020).

INTRODUCCIÓN

La interrupción del consumo, especialmente en el caso de opioides, provoca estados emocionales negativos tanto en la abstinencia aguda como prolongada, lo que añade un segundo factor motivacional que se suma al refuerzo negativo. La abstinencia prolongada incluye elementos residuales de estados emocionales negativos y *craving* inducido por estímulos contextuales y asociados a la droga, lo que contribuye a la fase de preocupación/anticipación. Es importante destacar que un individuo puede entrar en el ciclo en diferentes etapas. A diferencia de lo que ocurre con otras drogas de abuso, la fase de refuerzo negativo puede ser la primera en aparecer en el TCO, ya sea por automedicación o por el manejo del dolor crónico (Koob, 2020).

4.1 Bases neurobiológicas de la fase de consumo intensivo e intoxicación

Los agonistas MOR son fármacos y drogas con potentes efectos reforzantes en animales de experimentación y humanos. Esto se evidencia claramente por el hecho de que ratones, ratas, primates no humanos y humanos se autoadministran opioides y muestran preferencia por lugares asociados a opioides en modelos de Condicionamiento de Preferencia de Lugar (CPP) (Strang et al., 2020).

Como todas las drogas de abuso, los opioides activan los sistemas de recompensa mesocorticolímbicos (Koob & Volkow, 2016). El elemento central responsable del efecto reforzante en este circuito es la proyección de neuronas dopaminérgicas desde el área tegmental ventral (VTA) hacia el *nucleus accumbens* (NAcc). En el caso de los opioides, este efecto está mediado por la reducción del tono inhibitorio de las interneuronas GABAérgicas en el VTA debido a la acción de MOR en estas poblaciones. La disminución del control inhibitorio de las interneuronas GABAérgicas sobre las neuronas dopaminérgicas del VTA potencia la neurotransmisión dopaminérgica hacia el NAcc, incrementando así la señalización de recompensa (Fields & Margolis, 2015; Johnson & North, 1992; Wise & Rompre, 1989).

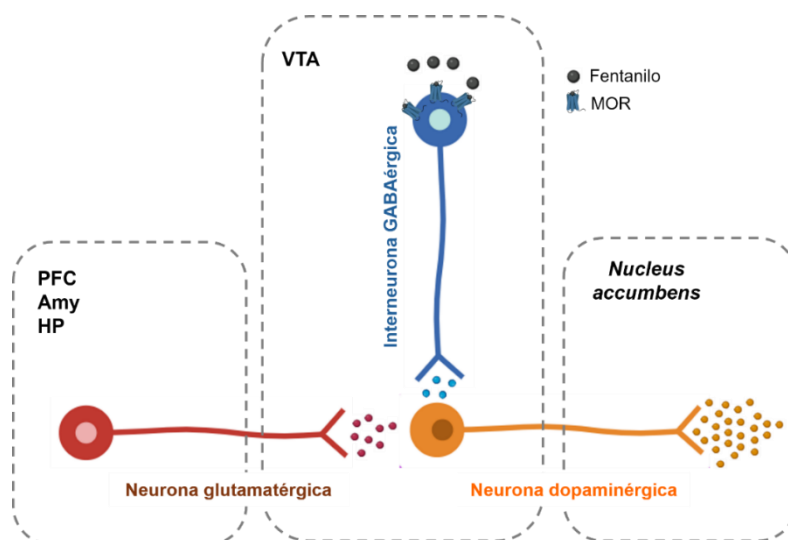


Figura 8 | Neurobiología del refuerzo opioide. El agonismo MOR por parte de opioides, en este caso fentanilo, provoca en el VTA la desinhibición de neuronas dopaminérgicas que proyectan hacia el NAcc. La neurotransmisión dopaminérgica entre VTA y NAcc se ve también sometida a control excitatorio por parte de proyecciones glutamatérgicas desde PFC, Amy (amígdala), o HP (hipocampo). Imagen realizada con BioRender.

Aunque esta hipótesis de la desinhibición es la más aceptada, respaldada por numerosos estudios farmacológicos y electrofisiológicos, no es el único mecanismo que podría influir en el papel de los MOR en la neurotransmisión dopaminérgica. Los MOR también son abundantes en áreas que reciben aferentes dopaminérgicos, notablemente en neuronas del NAcc que proyectan hacia el VTA (Charbogne et al., 2017; Cui et al., 2014). Además, se ha documentado la existencia de recompensa inducida por opioides a través de mecanismos independientes de dopamina (DA) (Ettenberg et al., 1982; Hnasko et al., 2005; Laviolette & Van Der Kooy, 2004; Narayanan et al., 2004; A. C. W. Smith et al., 2024), aunque se sabe poco del papel en el refuerzo de opioides de las neuronas que expresan MOR más allá de aquellas en el VTA (Darcq & Kieffer, 2018; Koob & Volkow, 2016).

Durante la fase de consumo intensivo/intoxicación se produce el refuerzo condicionado. En este proceso, estímulos neutros sin valor reforzante intrínseco se asocian a un estímulo reforzante como es la droga. De esta forma, un estímulo neutro pasa a ser considerado un estímulo reforzante por sí mismo, denominado estímulo condicionado (Koob & Volkow, 2016). El refuerzo condicionado constituye una de las bases para el desarrollo de la teoría de la sensibilización a incentivos (Robinson & Berridge, 1993). Esta teoría postula que la droga sensibiliza los circuitos cerebrales encargados de atribuir valor de incentivo a los estímulos, lo que provoca que el individuo se vuelva hiperreactivo tanto a la droga como a los estímulos asociados a la misma. Además, sugiere que la atribución de valor de incentivo a la droga y a los estímulos asociados evoluciona de forma independiente a las adaptaciones neuronales que median la variación en el efecto subjetivo hedónico de la droga y a los sistemas que regulan la abstinencia. Los procesos de refuerzo condicionado y saliencia de incentivo, ambos mediados por el sistema de recompensa mesocorticolímbico, son constructos que fundamentan parte de la metodología empleada a nivel preclínico, como los procedimientos de búsqueda de droga inducida por estímulos condicionados, la conducta de autoadministración y posiblemente, la transición hacia la búsqueda compulsiva de droga (Koob & Volkow, 2016). Un estudio en primates no humanos muestra estos fenómenos de forma particularmente ilustrativa (Schultz et al., 1997). En este estudio se mostró cómo las neuronas dopaminérgicas mesencefálicas dejan de activarse tras la exposición repetida a un refuerzo y, en su lugar, empiezan a hacerlo ante la simple presentación del estímulo condicionado que precedía el refuerzo. Para que este proceso de condicionamiento, en el que se otorga saliencia de incentivo a un estímulo condicionado originalmente neutro, ocurra, es necesaria la señalización fásica de DA y la actividad de este neurotransmisor en los receptores de dopamina D1 de baja afinidad (Koob & Volkow, 2016; Ungless et al., 2001).

La señalización fásica dopaminérgica en el estriado ventral inducida por la droga o por estímulos condicionados conduce al reclutamiento de bucles estriado-pálido-talamocorticales que actúan sobre el estriado dorsal, lo cual conduce a la formación de hábitos (Belin et al., 2009) y está implicado en la búsqueda compulsiva de drogas (Belin & Everitt, 2008). La capacidad de los estímulos condicionados para reclutar estos circuitos potencia la progresión del ciclo adictivo y contribuye a explicar el *craving* y el consumo compulsivo cuando individuos dependientes son expuestos a estímulos condicionados o a contextos de estrés asociados a estados emocionales negativos (Koob & Volkow, 2016). El refuerzo condicionado y la saliencia de incentivo parecen emplear la señalización dopaminérgica para mantener la motivación de consumir, incluso cuando

los efectos farmacológicos de la droga son menores (Schultz et al., 1997; Volkow et al., 2014; Volkow & Morales, 2015). Por el contrario, a medida que se progresa en el ciclo de la conducta adictiva, los cambios en la actividad tónica dopaminérgica de neuronas que proyectan a la PFC generan niveles estables inferiores de DA, lo que parece ser responsable de las alteraciones en la función ejecutiva y la toma de decisiones en un mecanismo mediado por receptores D1 (Bello et al., 2011; Caine et al., 2002; Koob & Volkow, 2016). La ya comentada señalización fásica dopaminérgica provocada por la administración de drogas de abuso genera neuroadaptaciones en los circuitos de los ganglios basales. Se han descrito neuroadaptaciones a nivel sináptico en los receptores de glutamato NMDA y AMPA en proyecciones glutamatérgicas desde la PFC y la amígdala hasta el VTA y el NAcc (Kalivas, 2009; Lüscher & Malenka, 2011; Wolf & Ferrario, 2010). El circuito de recompensa mesocorticolímbico no está aislado y posee aferentes y eferentes que interactúan con circuitos implicados en la regulación del estado de ánimo, la reactividad al estrés (amígdala, hipotálamo, habénula) y la interocepción (ínsula, corteza cingulada anterior). La función equilibrada de estos circuitos genera un control inhibitorio adecuado, así como una correcta toma de decisiones, procesamiento de recompensa, gestión del estrés, motivación y memoria. Las drogas de abuso, de hecho, alteran estos circuitos mediante neuroadaptaciones relacionadas con la señalización de DA, encefalinas, glutamato, GABA, noradrenalina, factor liberador de corticotropina (CRF), dinorfinas, neuropéptido Y y endocannabinoides (Koob & Volkow, 2016).

4.2 Bases neurobiológicas de la fase de abstinencia/afecto negativo: hiperkatifeia

La etapa de abstinencia/afecto negativo está marcada por el refuerzo negativo (Koob & Volkow, 2016). El refuerzo negativo asociado con la búsqueda compulsiva de opioides deriva de la bien establecida teoría de los procesos oponentes. Esta teoría, de forma breve, sostiene que se desencadena un proceso oponente de disforia (proceso b) que sigue al proceso inicial de euforia (proceso a) inducido por el opioide. El proceso b se incrementa con el consumo repetido, lo cual se traduce en el desarrollo de abstinencia y dependencia. El desarrollo del proceso b refleja la aparición de un estado emocional negativo en oposición a los efectos hedónicos (proceso a) del opioide, caracterizado por malestar, irritabilidad, alexitimia, ansiedad, disforia y efectos subjetivos de incomodidad, así como la sensación de no sentirse hedónicamente normal (eutímico). Todos estos síntomas son indicativos de abstinencia. Este estado emocional negativo ha sido acuñado como hiperkatifeia y se ha propuesto que empeora a medida que progresa el consumo repetido. La hiperkatifeia es una entidad dissociable de los síntomas somáticos de abstinencia y de los trastornos psiquiátricos comórbidos o relacionados con el TCO (Koob, 2020; Koob & Le Moal, 1997, 2008).

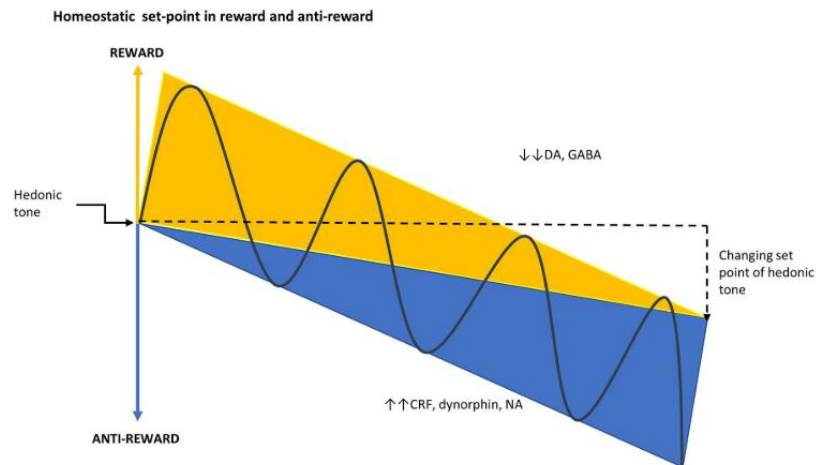


Figura 9 | Tono hedónico y acción de los sistemas de recompensa y anti-recompensa en el ciclo de la conducta adictiva. Con la evolución de la conducta adictiva se produce un cambio en el tono hedónico como resultado de una desviación del punto de partida hedónico. Esto ocurre debido a la regulación a la baja del sistema recompensa y al reclutamiento de los sistemas de estrés, también denominado sistema de anti-recompensa. Imagen tomada de Kakko et al., 2019.

Mientras que en la etapa de intoxicación el uso de la sustancia genera un gran refuerzo positivo, en la etapa de abstinencia el refuerzo negativo se convierte en el principal factor motivante que conduce a la búsqueda de la droga. El individuo se esforzará por reducir, finalizar o prevenir el estado emocional negativo. El consumo de la sustancia se requiere de forma más abundante y recurrente para mantener o incluso aproximarse a la eutimia, un estado anímico normal. En resumen, el consumo intensivo de opioides y su correspondiente abstinencia conducen a la repetida aparición de hipohedonia, hiperkatifeia, hiperalgesia y respuestas comportamentales frente al estrés, que son cada vez más pronunciadas, las cuales el individuo trata de evitar consumiendo más. En este marco teórico, el abuso de la sustancia se escala o renueva (en la abstinencia) de forma compulsiva por efecto del refuerzo negativo ya que este previene o alivia transitoriamente el estado emocional negativo de la abstinencia (hiperkatifeia). Esta búsqueda compulsiva trata de mantener un estado hedónico normal inalcanzable por el efecto del consumo repetido de la sustancia y la generación de procesos oponentes, con la consecuente desviación de un estado hedónico homeostático a un estado hedónico alostático (Koob, 2020).

Las neuroadaptaciones implicadas en la etapa de abstinencia y afecto negativo se pueden producir dentro del sistema de recompensa (neuroadaptaciones intrínsecas o dentro del sistema) o en sistemas ajenos al mismo (neuroadaptaciones extrínsecas o entre sistemas), concretamente, en los sistemas cerebrales relacionados con el estrés (Koob, 2020).

4.2.1 Neuroadaptaciones entre sistemas

La amígdala extendida juega un papel muy relevante en las neuroadaptaciones entre sistemas durante la etapa de abstinencia e hiperkatifeia tanto a nivel neuroquímico como en los circuitos cerebrales. Este complejo está implicado en los circuitos cerebrales relacionados con el estrés y consta de varias estructuras, entre las cuales se encuentran el núcleo del lecho de la estria terminal (*bed nucleus of stria terminalis*, BNST), el núcleo central de la amígdala (CeA), la sustancia *innominata* sublenticular y el NAcc *shell* (Heimer & Alheid, 1991). Estos circuitos, mediados por señalización de CRF,

INTRODUCCIÓN

noradrenalina y dinorfina entre otros neurotransmisores, son uno de los principales factores que conducen a los estímulos aversivos de la abstinencia opioide que causan la búsqueda compulsiva (Koob, 2020). El bloqueo de receptores noradrenérgicos y de CRF en CeA o BNST impide los efectos aversivos de la abstinencia de opioides, como lo demuestran experimentos en los que se previene el desarrollo de aversión al lugar condicionado por abstinencia de opioides (Delfs et al., 2000; Heinrichs et al., 1995; Watanabe et al., 2003). Los mismos sistemas neurofarmacológicos que median los efectos aversivos de la abstinencia a opioides también están implicados en el consumo y búsqueda compulsiva característicos de los modelos animales de autoadministración intravenosa de acceso extendido. Tanto los antagonistas adrenérgicos como los de CRF, disminuyen de forma dosis dependiente el consumo compulsivo en ratas sometidas al modelo de autoadministración intravenosa de acceso extendido (Greenwell, Funk, et al., 2009; Greenwell, Walker, et al., 2009; P. E. Park et al., 2015).

La señalización por dinorfinas se activa tras la presentación de estresores, y, de hecho, el bloqueo de los KOR elimina los efectos aversivos del estrés y reduce los síntomas de depresión en modelos preclínicos (Knoll & Carlezon, 2010; Land et al., 2008). Además, la activación de KOR disminuye la liberación de DA en el NAcc y produce aversión condicionada por lugar (Shippenberg et al., 2007). Así, está bien establecido que los antagonistas KOR no bloquean los efectos reforzantes de heroína, que son similares a euforia, mientras que sí inhiben la potenciación del refuerzo del opioide inducida por estrés, la reinstauración de la conducta de búsqueda de la droga provocada por estrés y la escalada del consumo en modelos animales de acceso extendido (Schlosburg et al., 2013).

Existen otros neurotransmisores y áreas cerebrales implicados en las neuroadaptaciones entre sistemas durante esta etapa. En condiciones de abstinencia a opioides, se activa el neuropéptido Y, la oxitocina y los sistemas endocannabinoides en la amígdala extendida para compensar la reacción de estrés asociada a la abstinencia (Koob, 2020).

En pacientes dependientes de opioides de prescripción médica se han descrito marcadas alteraciones en la estructura y conectividad de la amígdala: pérdida volumétrica bilateral, disminución de la anisotropía en aferentes y eferentes de la amígdala y disminución de conectividad funcional en circuitos neuronales que implican la amígdala, ínsula y NAcc, incluyendo una disminución en la conectividad funcional entre amígdala y sustancia gris periacueductal (PAG) (Upadhyay et al., 2010). La PAG es conocida por su papel en el procesamiento del dolor en la vía espinotalámica y el componente emocional del dolor por la vía parabraquial a través de sus conexiones con la amígdala. Además, está implicada en la hiperkatifeia (Koob, 2020; Price, 2000). Por ejemplo, la administración local en PAG de un inhibidor de encefalinasa bloquea la abstinencia a opioides precipitada por naloxona (Fukunaga et al., 1998; Maldonado et al., 1992). Uno de los mecanismos que se postula para mediar las neuroadaptaciones en el PAG involucra las respuestas neuroinflamatorias, dado que la tolerancia a morfina se desarrolla en paralelo con el incremento en la expresión génica de factores proinflamatorios en la PAG, como el receptor TLR-4 (*Toll-like receptor 4*), el factor de necrosis tumoral α (TNF α) o la interleucina-1 β (IL-1 β). Este estado proinflamatorio conduce a un aumento en neurotransmisión excitatoria mediada por el incremento del tono glutamatérgico, el cual se desarrolla hipotéticamente para compensar activamente el efecto inhibitorio analgésico de la morfina (Eidson et al., 2016; Eidson & Murphy, 2013; X. Wang et al., 2012).

Además, la inducción del gen que codifica la citoquina antiinflamatoria interleucina-4 aminora los síntomas de abstinencia en un modelo murino (Yi et al., 2017), mientras que la disminución de la expresión de TNF α al inicio del tratamiento con morfina, reduce la abstinencia precipitada en ratas (Hao et al., 2010).

Las adaptaciones descritas hasta ahora se denominan neuroadaptaciones fuera del sistema, ya que no generan efectos directamente dentro del sistema de recompensa. Por otro lado, están aquellas que se producen en el sistema de recompensa (Koob, 2020).

4.2.2 Neuroadaptaciones dentro del sistema de recompensa

Como hemos visto, los receptores MOR median el efecto reforzante de los opioides, además de la tolerancia. Las neuroadaptaciones dentro del sistema de recompensa pueden ocurrir a nivel celular, a corto y largo plazo, a nivel de receptores MOR, proteínas G acopladas a estos o segundos mensajeros. Se ha descrito la desensibilización del receptor y el remodelado de espinas dendríticas, lo que indica que la tolerancia a nivel celular está influenciada por la suma de múltiples factores (Koob, 2020).

A nivel de circuitos neuronales, la abstinencia de opioides se asocia con la disminución de los niveles extracelulares de DA en el NAcc y el sistema mesolímbico, además de una reducción en la generación de potenciales de acción (Diana, 2011; Pothos et al., 1991; Rossetti et al., 1992). La administración crónica de morfina se asocia con una disminución en el tamaño de neuronas dopaminérgicas en el VTA y un aumento en la sensibilidad a los antagonistas de receptores dopaminérgicos. Además, se ha descrito un aumento en la actividad de GABA (Bonci & Williams, 1997) y en la sensibilidad de receptores metabotrópicos de glutamato (mGlu), lo que genera una disminución en la liberación de glutamato en el VTA conduciendo a un estado hipodopaminérgico (Koob, 2020).

En humanos se ha encontrado una menor disponibilidad basal del receptor de dopamina D2 en el estriado de pacientes dependientes de opioides en comparación con controles (G. J. Wang et al., 1997). La disponibilidad de receptores D2 en putamen se ha correlacionado negativamente con los años de consumo de opioides. Una de las teorías sobre este estado hipodopaminérgico sugiere que el AMPc (adenosín monofosfato cíclico) de la cascada de señalización opioide acaba activando la producción de dinorfina en el NAcc *shell* (Koob, 2020).

Otra área que ha mostrado un papel importante en la abstinencia es la habénula lateral. Esta región cerebral está conectada con las áreas del circuito de recompensa mesocorticolímbico y participa en la codificación y mediación de estados aversivos (Hikosaka, 2010). La activación de esta área inhibe las neuronas dopaminérgicas del VTA, por lo que se especula que esta área media los efectos aversivos de las drogas de abuso y de su abstinencia (Lecca et al., 2014). Por ejemplo, la administración en habénula lateral de un inhibidor de la protein quinasa 2 dependiente de calcio/calmodulina (CaMKII) elimina la aversión de lugar inducida por naloxona en ratones dependientes de morfina. Además, se ha descrito la sobreexpresión de CaMKII en la habénula lateral de ratas y ratones sometidos a un modelo crónico de administración de morfina (Chen et al., 2008; J. Wang et al., 2017). En humanos, se ha observado un aumento de la conectividad habénula-estriado en pacientes en condiciones de evitación de abstinencia o aversión (Curtis et al., 2017; Koob, 2020)

INTRODUCCIÓN

En resumen, la administración crónica de opioides desregula los sistemas neurofarmacológicos que se encuentran en la intersección de los sistemas de recompensa y estrés en el NAcc y en la amígdala extendida. El resultado es una disminución de la función de refuerzo y un incremento del estrés y el dolor. Los sistemas cerebrales pro-estrés pueden conducir a la aparición de hiperkatifeia y los sistemas anti-estrés pueden revertirla (Koob, 2020).

4.2.3 Abstinencia condicionada

Dentro de la etapa de abstinencia juega un papel importante el concepto de la abstinencia condicionada. Las neuroadaptaciones en los sistemas de recompensa y estrés posibilitan una rápida recaída meses o incluso años tras la desintoxicación y el inicio de la abstinencia de opioides. El *craving* y la conducta de búsqueda de droga no están asociados únicamente al deseo de obtener los efectos hedónicos y positivos de los opioides, también pueden ser desencadenados por estímulos y contextos asociados a la abstinencia a través del proceso de abstinencia condicionada (Koob, 2020).

Este fenómeno se ha ejemplificado claramente en pacientes en tratamiento con metadona a los que se precipitó un síndrome de abstinencia leve mediante naloxona. La presentación de un estímulo neutro, en este caso aroma a menta (estímulo condicionado) asociado repetidas veces a la abstinencia (respuesta incondicionada), puede acabar generando por sí mismo síntomas subjetivos y fisiológicos del síndrome de abstinencia inducido por opioides (O'Brien et al., 1977). Este fenómeno también ha sido modelado en animales en los protocolos de aversión de lugar condicionado y autoadministración intravenosa operante. En un modelo de autoadministración intravenosa operante de heroína en ratas, los individuos fueron condicionados de tal forma que se estableció la asociación de un olor y una luz con la abstinencia precipitada por naloxona. La posterior presentación a este olor y luz, en ausencia de tratamiento con naloxona, provocó abstinencia condicionada evidenciada por el aumento de umbral de autoestimulación intracraneal y un aumento en el consumo de heroína. Así, el estímulo condicionado parece predecir el inicio de la abstinencia y el déficit de refuerzo, lo que puede jugar un papel fundamental en la aparición del *craving* y la recaída en humanos (Kenny et al., 2006). En un estudio publicado este mismo año, los autores proponen un modelo operante de refuerzo negativo que genera dos grupos de ratas según su capacidad para evitar la abstinencia condicionada inducida por naloxona (Chow et al., 2024). Además, se ha descrito la activación de la amígdala extendida en respuesta a aversión condicionada por lugar medida por la expresión de la proteína Fos (Gracy et al., 2001). Diferentes estudios apuntan a un papel fundamental de la conexión entre amígdala basolateral y la amígdala extendida en la mediación del *craving* inducido por estímulos de valencia negativa, como muestra el hecho de que la inactivación bilateral de la amígdala basolateral bloquea el desarrollo de abstinencia condicionada a opioides (Schulteis et al., 2000).

4.3 Bases neurobiológicas de la etapa de preocupación/anticipación: *craving*

La etapa de preocupación/anticipación desempeña un papel esencial en el fenómeno de recaída en humanos, y es probablemente, la responsable de que los trastornos por consumo de sustancias (TCS) se definan como una enfermedad crónica recidivante. Esta etapa siempre se ha asociado al constructo del *craving*, es decir, el intenso deseo de consumir, a pesar de que este fenómeno es difícil de valorar en la clínica y no siempre

correlaciona con la recaída. En cualquier caso, discernir los mecanismos neurobiológicos implicados en la recaída y desarrollar tratamientos para prevenirla, hace que el estudio de esta etapa sea fundamental (Koob & Volkow, 2016).

En esta etapa el individuo reinstaura su conducta de búsqueda de la droga tras la abstinencia. El control ejecutivo sobre la saliencia de los incentivos ante estímulos condicionados es esencial para el mantenimiento de la conducta dirigida a un objetivo y la flexibilidad en las asociaciones entre estímulo y respuesta. En ratas, la corteza prefrontal (PFC) envía eferentes glutamatérgicos directos a neuronas dopaminérgicas en VTA, y, por lo tanto, ejerce un control excitatorio de la frecuencia de los potenciales de acción y la liberación de DA en la PFC (Geisler & Wise, 2008). Dado que existen proyecciones dopaminérgicas desde el VTA hacia el NAcc, las proyecciones glutamatérgicas de PFC podrían contribuir al desarrollo de saliencia de incentivos.

También surgen proyecciones glutamatérgicas desde la PFC al caudado y el estriado ventral que modulan el control del sistema estriado-pálido-tálamo-cortical, implicado en la formación de hábitos y en la respuesta compulsiva a drogas (Belin et al., 2009). Así, la PFC está en buena posición para regular la saliencia de incentivos y el comportamiento condicionado cuando un estímulo es presentado al individuo (Jentsch & Taylor, 1999; Koob, 2020). En este sentido, los sustratos neurobiológicos responsables de las distintas modalidades de reinstauración de búsqueda de la droga en roedores están bien definidos. La reinstauración inducida por la propia droga esta mediada por el circuito formado por la proyección glutamatérgica desde corteza límbica hacia el NAcc que es modulada por la señalización dopaminérgica a través de receptores D1 y D2 en la corteza frontal (McFarland & Kalivas, 2001). Cuando los animales reinstauran su conducta de búsqueda tras la presentación de estímulos condicionados se activan proyecciones glutamatérgicas desde la corteza prelímbica, amígdala basolateral y subículo ventral hacia el NAcc, reguladas por señalización dopaminérgica en amígdala basolateral y estriado dorsal (Everitt & Wolf, 2002; Vanderschuren et al., 2005). Por último, la reinstauración inducida por estrés parece estar mediada por la señalización de CRF y dinorfina en la amígdala extendida y el VTA (Shaham et al., 2003). En definitiva, en base a estudios con roedores, incrementos en la actividad del sistema glutamatérgico en PFC podría generar una marcada respuesta glutamatérgica que media las respuestas similares a *craving* durante la etapa de preocupación/anticipación (Koob & Volkow, 2016). El *craving* inducido por estímulos condicionados en humanos parece estar mediado por circuitos similares, activándose la PFC, en concreto, la región dorsolateral de PFC, la corteza medial orbitofrontal y el giro cingulado anterior, entre otras áreas (Kakko et al., 2019; Koob & Volkow, 2016; Q. Li et al., 2012). Por ejemplo, estudios de imagen han mostrado una menor función basal general y dopaminérgica en la corteza orbitofrontal y cingulada anterior en pacientes dependientes. Ante la presencia de *craving* agudo se reactivaba la función dopaminérgica y el sistema de recompensa (Volkow et al., 1999). De forma concomitante con la activación de la PFC mediada por glutamato, estudios de imagen han mostrado que los déficits en funciones ejecutivas se reflejan en disminuciones de la actividad de la corteza frontal que interfieren con la toma de decisiones, la autorregulación y el control inhibitorio (Volkow et al., 2011).

5. La vía de la kinurenina

La vía de la kinurenina (KynP) es la principal ruta catabólica del triptófano (TRP), siendo responsable de la degradación del 95% del TRP. El resto del TRP es empleado en la biosíntesis de proteínas, hidroxilado para generar serotonina (5-HT) y melatonina, decarboxilado para generar triptamina, o transaminado para generar ácido indolpirúvico (A. A.-B. Badawy, 2017; Schwarcz, 1993).

La primera reacción enzimática de la KynP está mediada por las enzimas triptófano 2,3-dioxigenasa (TDO) y la enzima indolamina 2,3-dioxigenasa (IDO), las cuales generan N'-formilkinurenina (N-formilKYN) a partir del TRP. Posteriormente se genera el metabolito clave kinurenina (KYN) por acción de la N'-formilkinurenina formamidasa. En este punto, la KynP se separa en tres ramas. Por un lado, la kinureninasa puede producir ácido antranílico, que puede acabar produciendo a su vez ácido 3-hidroxiantranílico (3-HAA). Por otro lado, se produce ácido kinurénico (KYNA) por acción de la kinurenina aminotransferasa (KAT). La última rama empieza con la hidroxilación de KYN y obtención de 3-hidroxicinurenina (3-HK) en una reacción catalizada por la enzima kinurenina monooxigenasa (KMO). La 3-HK puede sufrir posteriormente una hidrólisis mediada por la enzima kinureninasa para generar 3-HAA, o bien puede ser transaminada por kinurenina aminotransferasa (KAT) para generar ácido xanturénico (XA). Desde el 3-HAA se puede producir (1) ácido picolínico (PA) por una oxidación catalizada por acción de la 3-HA-oxidasa (3-HAO) y una ciclación no enzimática, (2) ácido cinabarínico por oxidación, o (3) ácido quinolínico (QUIN) por acción de 3-HAO y una ciclación no enzimática. QUIN acabará produciendo tras una serie de reacciones el cofactor nicotin-adenin-dinucleotido (NAD^+) (A. A.-B. Badawy, 2017; Schwarcz et al., 2012).

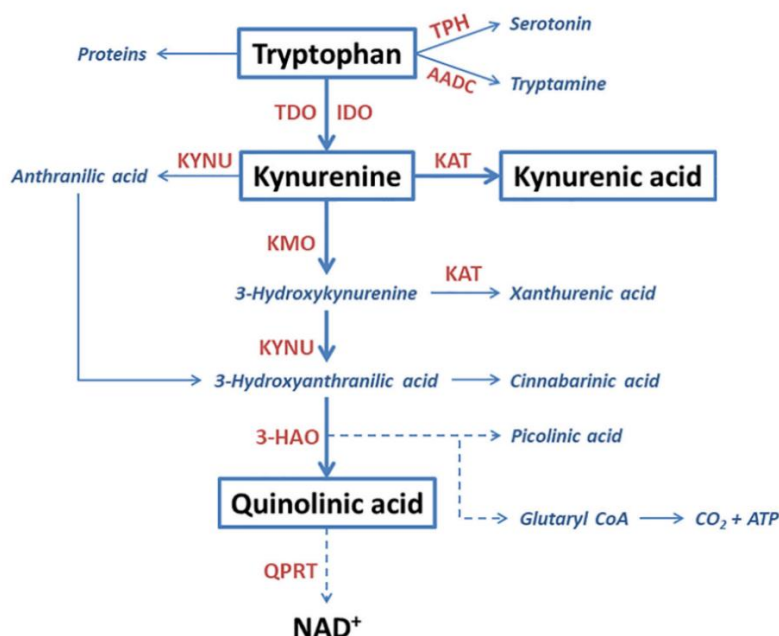


Figura 10 | Esquema del catabolismo del TRP por la KynP. TPH: TRP hidroxilasa; AADC: decarboxilasa de aminoácidos aromáticos; KYNU: kinureninasa; QPRT: ácido quinolínico-fosforibosiltransferasa. Imagen modificada de Morales-Puerto et al., 2021.

El estudio de la KynP ha adquirido una gran importancia en el siglo XXI debido a su relación con numerosas patologías, al potencial terapéutico derivado de la modulación de dianas dentro de esta ruta metabólica, y al posible uso de componentes de la KynP como biomarcadores. El papel de la KYN es especialmente relevante en patologías que implican al SNC como enfermedades neurodegenerativas o neuropsiquiátricas, pero también en cáncer, enfermedades autoinmunes o infecciosas (Behl et al., 2021; Bizjak et al., 2022; Erhardt, Schwieler, et al., 2017; M. Kim & Tomek, 2021; Michal et al., 2023; J. H. Park, 2022; Parker et al., 2023; Platten et al., 2019; Sandi et al., 2021; Ueland et al., 2023). Teniendo esto en cuenta, no es sorprendente que la KynP se haya propuesto como una diana terapéutica para modular el abuso, la búsqueda y la recaída inducida por distintas drogas (Morales-Puerto et al., 2021).

5.1 Distribución y regulación de las enzimas de la KynP

El órgano con un mayor papel regulador de los niveles de TRP circulantes es el hígado. Coherentemente, este órgano expresa todas las enzimas implicadas en la KynP y es capaz de catabolizar entre el 90 y el 95% del TRP disponible (A. A.-B. Badawy, 2017). El resto del TRP se degrada en tejidos extrahepáticos en un porcentaje variable que responde a condiciones patológicas como la inflamación, el estrés, así como al ejercicio y a ciertos fármacos (Schwarcz et al., 2012; Tutakhail et al., 2020).

El cerebro es uno de los órganos extrahepáticos en los que se producen las reacciones de la KynP, lo cual es coherente con la relevancia que tienen algunos de los metabolitos de la KynP en trastornos neurológicos y neuropsiquiátricos (Platten et al., 2019; Schwarcz et al., 2012). Si bien se ha reportado la expresión de las enzimas de la KynP en diferentes áreas cerebrales, es cierto que la expresión está compartimentalizada a nivel de tipos celulares. A nivel central, QUIN se produce principalmente en microglía por la presencia mayoritaria en este tipo celular de la enzima KMO, mientras que la producción de KYNA ocurre en astrocitos por la presencia mayoritaria de KAT (Guillemin et al., 2001, 2007; Guillemin, Smith, et al., 2003).

5.1.1 Triptófano 2,3-dioxigenasa (TDO)

La enzima TDO se encuentra en hígado y cerebro, y es responsable de la formación de N-formilKYN a partir de TRP (A. A.-B. Badawy, 2017). Esta enzima está formada por cuatro subunidades y utiliza al grupo hemo como cofactor enzimático (Forouhar et al., 2007). El principal mecanismo de regulación que afecta a la TDO es la concentración de sustrato, lo cual es esencial para mantener la homeostasis del TRP (Bender, 1983). El incremento de la disponibilidad de TRP genera un aumento de la semivida y de la actividad enzimática, la cual puede duplicarse además en presencia del cofactor hemo (A. A. B. Badawy & Evans, 1975). En sentido inverso, se ha descrito un mecanismo de retroalimentación negativa mediado por NADPH (A. A. B. Badawy & Bano, 2016). A pesar de que la regulación de TDO se produce mayoritariamente a nivel de actividad, el incremento en los niveles circulantes de glucocorticoides produce una activación de la transcripción de la enzima TDO (Nakamura et al., 1987).

5.1.2 Indolamina 2,3-dioxigenasa (IDO)

IDO presenta una amplia expresión en diferentes tejidos y cataboliza la misma reacción que TDO, pero presenta una estructura monomérica que contiene el grupo hemo, sin que

este grupo sea requerido para la activación de la enzima. Además, IDO presenta otras diferencias con respecto a TDO. Su actividad enzimática emplea O_2 como cosustrato y es menos específica, dado que también actúa sobre otras indolaminas como 5-HT, melatonina o triptamina. La afinidad de IDO por el TRP es mayor que la de TDO, mientras que su capacidad enzimática es mucho menor. Por último, la regulación de esta enzima también difiere de la de TDO, pudiendo inhibirse por altas concentraciones de TRP (A. A. B. Badawy, 2017).

Hace ya casi dos décadas se describió una segunda isoforma de IDO, conocida como IDO-2 (Metz et al., 2007). Esta isoforma presenta una expresión más restringida, así como una menor afinidad y capacidad catalítica en comparación con IDO-1. A pesar de estas propiedades enzimáticas y del hecho de que la delección de esta isoforma no genera alteraciones en los niveles de KYN en plasma, IDO-2 parece tener un importante papel en el control de la inflamación y de la inmunidad adaptativa (A. A.-B. Badawy, 2017; Merlo et al., 2014).

Aunque la actividad de la TDO hepática es la principal responsable de la degradación del TRP, la IDO-1 puede desempeñar un papel importante en condiciones de inflamación (A. A.-B. Badawy, 2017). El interferón γ ($IFN\gamma$) especialmente, junto con otras citoquinas proinflamatorias como el $IFN\alpha$ (Ozaki et al., 1987; Pfefferkorn et al., 1986), la $IL-1\beta$ o el $TNF\alpha$ regulan al alza la transcripción de IDO-1, mientras que las citoquinas antiinflamatorias pueden inhibir la inducción de la enzima a través de $IFN\gamma$ (A. A. B. Badawy, 2013). Otro factor regulador de IDO que puede influir en la función inmune es el óxido nítrico (NO), que inhibe su actividad (Hucke et al., 2004).

5.1.3 Kinurenina 3-monooxigenasa (KMO)

La enzima KMO es una flavoproteína mitocondrial implicada en la hidroxilación de la KYN para generar 3-HK utilizando NADPH como cofactor (A. A.-B. Badawy, 2017). Esta enzima desempeña un papel crítico en rama de la KynP responsable de la formación de QUIN, dado que entre las enzimas que pueden metabolizar KYN, KMO es la que tiene mayor afinidad y, por lo tanto, es la enzima con un papel más importante en la regulación de los niveles fisiológicos de KYN (Amaral et al., 2013; Bender & McCreanor, 1982). A nivel de regulación, la expresión de KMO se ve regulada al alza por acción de estímulos inflamatorios, como la administración de lipopolisacárido bacteriano (LPS) (Molteni et al., 2013), la presencia de $IL-1\beta$ (Zunszain et al., 2012) o $IFN\gamma$ (Connor et al., 2008). Por el contrario, el déficit de riboflavina (vitamina B2) puede producir una disminución de la actividad de KMO ya que esta enzima es una flavoproteína dependiente de la coenzima flavin-adenin-dinucleótido (FAD) (Verjee, 1971).

5.1.4 Kinurenina aminotransferasa (KAT)

La KAT es responsable de la transaminación irreversible de la KYN para generar KYNA usando piridoxal fosfato (PLP) como cofactor. En condiciones normales la actividad de esta enzima es minoritaria comparada con la de KMO debido a su baja afinidad por el sustrato, sin embargo, la producción de KYNA puede ser significativa en casos de sobrecarga de TRP y/o KYN (Bender, 1983) o por inhibición de KMO (Chiarugi et al., 1995). Existen cuatro isoformas para la enzima KAT. La isoforma KAT II es la mayoritaria en el cerebro humano y de roedores (Q. Han et al., 2008, 2010). Sin embargo, se ha demostrado que en ratones transgénicos que no expresan esta isoforma, los niveles

de KYNA y actividad total de KAT en cerebro son similares a los de a sus congéneres *wild type* (Yu et al., 2004). La expresión de la KAT se ve regulada a la baja por IFN γ (Adams et al., 2014), mientras que incrementa por la administración de LPS (Song et al., 2018). En cuanto a la regulación de la actividad de la KAT, esta se ha visto disminuida en ratas privadas de piridoxina y puede ser regulada por la concentración de sustrato (Takeuchi & Shibata, 1984).

5.2 Funciones del triptófano y sus metabolitos

5.2.1 Triptófano (TRP)

El TRP es un aminoácido esencial, es decir, no se puede sintetizar en el organismo y se debe obtener a través de la dieta. Este aminoácido viaja unido a la albumina en plasma en un 90%, mientras que el 10% restante se encuentra libre en plasma y puede ser empleado en diferentes tejidos y vías metabólicas (A. A. B. Badawy, 2000). Teniendo en cuenta que el hígado es el principal órgano que expresa la enzima TDO, este órgano es también el principal responsable de la regulación de los niveles de TRP y lo hace través de su depósito o catabolismo por la KynP (A. A. B. Badawy, 2000, 2017). Dado que el 95% del TRP es metabolizado por la KynP, el aumento de la actividad en esta ruta metabólica produce una disminución en la disponibilidad del TRP y limita la biosíntesis de 5-HT (Oxenkrug, 2013). Por otro lado, se han descrito mecanismos que pueden aumentar la captación tisular del TRP. Uno de ellos consiste en el desplazamiento del TRP unido a albumina provocado por un aumento de los niveles de ácidos grasos libres circulantes. Estos aumentos en los niveles de ácidos grasos se pueden deber a la acción de catecolaminas y ciertos fármacos (A. A. B. Badawy, 2017; A. B. Badawy, 2010). Por otro lado, la estimulación de receptores β -adrenérgicos puede producir un incremento en la expresión del transportador de aminoácidos neutro (LAT) en cerebro. El transportador LAT es responsable de captar TRP y otros aminoácidos de la periferia e introducirlos en el cerebro, por lo que un aumento en la expresión puede producir en un incremento en la concentración de TRP en SNC (Eriksson & Carlsson, 1988; Sekine et al., 2015).

5.2.2 Serotonina (5-HT)

La 5-HT (5-hidroxitriptamina) es una amina biógena que se sintetiza mayoritariamente en las células enterocromafines del tracto gastrointestinal y, en menor medida, en las neuronas serotoninérgicas del SNC. La síntesis de 5-HT se produce a partir del TRP mediante la oxidación por la triptófano hidroxilasa (TPH) y decarboxilación por la decarboxilasa de aminoácidos aromáticos (AADC) (Höglund et al., 2019; Welford et al., 2016). El 90% de la 5-HT se localiza en las células cromafines intestinales, mientras que, de la parte restante, el 10% se encuentra en plaquetas y solo el 1-2% está presente en SNC, donde actúa como neurotransmisor. A pesar de que ciertos alimentos son una fuente de 5-HT, esta molécula no puede atravesar la BHE y, por tanto, no llega a SNC, por lo que toda la 5-HT presente en SNC se sintetiza *in situ* en las neuronas serotoninérgicas (Gershon & Tack, 2007).

La 5-HT desempeña un importante papel en la motilidad gastrointestinal, la hemostasia, la regulación del tono vascular, la curación de heridas y las respuestas inflamatorias (Welford et al., 2016). Como neurotransmisor en SNC, participa en aspectos relevantes como el estado del ánimo, la percepción sensorial, memoria y aprendizaje, sueño, control

INTRODUCCIÓN

del apetito, regulación de temperatura corporal, agresividad, sexualidad, respuesta a estrés, miedo o control motor (Berger et al., 2009).

5.2.3 Kinurenina (KYN)

La KYN es el metabolito pivotal de la KynP y a partir de ella se generan todos los metabolitos de esta vía a excepción del TRP.

Entre el 60 y el 80% de la KYN presente en SNC proviene de fuentes periféricas, dado que en condiciones fisiológicas la KYN atraviesa la BHE mediante el transportador LAT (Fukui et al., 1991; Gál & Sherman, 1980; Kita et al., 2002). Sin embargo, en condiciones de activación inmune sistémica inducida por LPS, la KYN presente a nivel central proviene en su totalidad de la periferia, mientras que, si la administración de LPS se aplica a nivel cerebral, la KYN se forma localmente a partir del TRP (Kita et al., 2002). Es importante mencionar que LAT no solo transporta TRP y KYN hacia el SNC, sino también otros aminoácidos (Sekine et al., 2015). Aprovechando que algunos de ellos presentan mayor afinidad por el transportador, se ha observado que la administración de leucina bloquea el paso de KYN, tanto endógena como exógena a través de LAT1. Esto impide el desarrollo de conductas similares a la depresión en un modelo murino de administración de LPS (Walker et al., 2019) y mitiga el efecto de disminución del consumo inducido por el inhibidor de KMO Ro 61-8048 en ratones dependientes de etanol sometidos al modelo CIE (exposición crónica intermitente) (Gil de Biedma-Elduayen et al., 2022).

El transportador responsable de la salida de la KYN desde el SNC hacia la periferia es el transportador de aniones orgánicos (OAT) (Bahn et al., 2005). En concreto, OAT1 y OAT3 participan en la extracción de KYN, KYNA y QUIN del cerebro (Morrison et al., 1999; Wu et al., 2017). Además, este transportador también está implicado en el transporte de KYN, KYNA y QUIN en riñón e hígado. Se ha demostrado que tanto KYNA (Uwai et al., 2012) como XA (Uwai & Honjo, 2013) tienen afinidad por los transportadores OAT1 y OAT3. Al igual que con el transportador LAT, la modulación de la extracción de KYN de SNC mediada por OAT ha sido estudiada empleando probenecid. Este fármaco provoca un aumento los niveles de KYN y KYNA en cerebro debido a la inhibición de OAT (Moroni et al., 1988; Morrison et al., 1999). Este efecto del probenecid ha sido empleado para potenciar los efectos anticonvulsivantes de la KYN (por su metabolismo a KYNA) o para prolongar el efecto de reducción del consumo de etanol en el modelo de dependencia a etanol CIE (Gil de Biedma-Elduayen et al., 2022). KYN se emplea como biomarcador para valorar el estado del metabolismo del TRP en enfermedades neurológicas (Ciapala et al., 2021; Fujigaki et al., 2017). En cuanto a su farmacodinamia, KYN actúa como un agonista endógeno del receptor de hidrocarburos de arilos (AhR) (Opitz et al., 2011). Este receptor está implicado en el metabolismo de xenobióticos, la proliferación y diferenciación celular, la modulación del sistema inmune y la respuesta antioxidante (Juricek & Coumoul, 2018). Por último, existe evidencia de que la KYN por sí misma (sin producir otros metabolitos) es una molécula antioxidante con capacidad para secuestrar radicales libres (González Esquivel et al., 2017; Peyrot & Ducrocq, 2008; Reyes Ocampo et al., 2014).

5.2.4 Ácido kinurénico (KYNA)

El KYNA, junto con QUIN, es el metabolito mayoritario producido por la KynP. Estos dos metabolitos han sido estudiados en profundidad por sus propiedades neuroactivas. La producción de KYNA esta mediada por la acción de las isoformas de KAT, por lo que la actividad de esta enzima es la responsable de las concentraciones de KYNA (T. W. Stone, 1993). Teniendo en cuenta que este metabolito no atraviesa la BHE, su producción a nivel central debe llevarse a cabo *in situ* a partir de alguno de sus precursores (Fukui et al., 1991). Dado que KYN sí puede atravesar la BHE, las variaciones en los niveles de este metabolito a nivel periférico pueden influir en los niveles centrales de KYNA (Gál & Sherman, 1980; T. W. Stone et al., 2024).

El KYNA presenta un perfil farmacológico complejo ejerciendo efectos sobre cinco dianas farmacológicas. KYNA es un antagonista de los receptores de glutamato (Perkins & Stone, 1982; Schwarcz et al., 2012), un modulador alostérico negativo de los receptores nicotínicos de acetilcolina $\alpha 7$ ($\alpha 7$ nAChR) (Albuquerque & Schwarcz, 2013; Hilmas et al., 2001; Stone, 2020), un agonista sobre los receptores AhR (DiNatale et al., 2010), un agonista sobre el receptor acoplado a proteína G GPR35 (T. W. Stone et al., 2013; J. Wang et al., 2006), y posee actividad antioxidante al ser capaz de secuestrar radicales libres (González Esquivel et al., 2017; Lugo-Huitrón et al., 2011). Todos estos efectos han llevado a considerar al KYNA como un metabolito con propiedades neuroprotectoras (T. W. Stone et al., 2013). Sin embargo, se ha implicado la presencia de altos niveles de KYNA en la etiología de la esquizofrenia. Se han observado niveles elevados de KYNA en líquido cefalorraquídeo y corteza prefrontal de pacientes con esquizofrenia y hay evidencia en estudios preclínicos que apoya la hipótesis de que el KYNA juega un papel relevante en esta patología (Erhardt et al., 2001, 2007; Erhardt, Schwieler, et al., 2017).

Como hemos mencionado, KYNA, al igual que KYN es un agonista endógeno del receptor AhR (DiNatale et al., 2010). El agonismo AhR conlleva un cambio conformacional y la translocación del receptor al núcleo, donde actúa como factor de transcripción favoreciendo la expresión de enzimas implicadas en el metabolismo, como las enzimas del citocromo P450, uridinadifosfato glucuronil transferasa (UGT), subunidad Ya de la glutatión S-transferasa o NADPH/quinona oxidoreductasa (NQO1), así como IDO1 y TDO (Hankinson, 1995; Larigot et al., 2024; Rothhammer & Quintana, 2019; Tijet et al., 2006). Por otro lado, también se ha descrito que el agonismo AhR es importante en la modulación del sistema inmune (Gutiérrez-Vázquez & Quintana, 2018), mediando una respuesta antiinflamatoria por interacción con el factor de transcripción NF- κ B (factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras *kappa* de las células B activadas) (Rothhammer et al., 2016). Además, modula la respuesta antioxidante al interactuar con el factor de transcripción Nrf2 (factor nuclear eritroide similar al factor 2), promoviendo así la expresión de enzimas antioxidantes como NQO-1 o hemoxigenasa 1 (HO-1) (Dietrich, 2016).

El receptor GPR35 se encuentra principalmente en células inmunes y del tracto gastrointestinal, pero también está presente en astrocitos (Schwarcz & Stone, 2017). En cuanto al agonismo de KYNA sobre el receptor GPR35, se ha observado que la activación de este receptor puede provocar una reducción en la excitabilidad neuronal mediante la disminución de liberación de glutamato (Albuquerque & Schwarcz, 2013), modulación de la producción de AMPc e inhibición de los canales de calcio de tipo N en neuronas del

sistema nervioso simpático y astrocitos (Savitz, 2020). La actividad de este receptor también se ha asociado con efectos antinociceptivos. La administración de zaniprast, un agonista de GPR35, reduce la hipersensibilidad táctil y térmica en un modelo murino de dolor neuropático y potencia la analgesia inducida por morfina y buprenorfina (Resta et al., 2016; Rojewska et al., 2019; Rojewska, Piotrowska, et al., 2018).

La actividad de KYNA sobre receptores glutamatérgicos y $\alpha 7$ nAChR será desarrollada en mayor profundidad a continuación, dado que se ha estudiado en este Tesis Doctoral el efecto de la modulación de estos receptores.

5.2.4.1 Receptores nicotínicos $\alpha 7$ ($\alpha 7$ nAChR)

Los $\alpha 7$ nAChR forman parte de la superfamilia de canales iónicos regulados por ligando. Este subtipo, junto con el heteropentamérico $\alpha 4\beta 2$, son los que más se expresan en SNC. Estos receptores están formados por cinco monómeros $\alpha 7$ que conforman un poro catiónico permeable a iones Na^+ , K^+ y Ca^{2+} con un tiempo de apertura muy limitado y una rápida desensibilización (Egea et al., 2015).

Estos receptores se distribuyen en hipocampo, corteza cerebral y áreas relevantes en el sistema de recompensa como el NAcc y el VTA (Gotti et al., 2006; Jones & Wonnacott, 2004; Maex et al., 2014; Schilström et al., 2000). A nivel sináptico, se encuentran en las terminaciones pre- y postsinápticas, donde ejercen una función moduladora fundamental al favorecer la liberación de glutamato (Gotti & Clementi, 2004; T. W. Stone, 2021).

En cuanto a los efectos de este receptor, a nivel periférico los $\alpha 7$ nAChR participan en el control inflamatorio a través de la vía colinérgica (Hajiasgharzadeh et al., 2019). A nivel central, se ha demostrado que el $\alpha 7$ nAChR ejerce un efecto neuroprotector. En un modelo murino de ictus, la administración de un agonista de este receptor ejerce un efecto antiinflamatorio a través de un mecanismo dependiente de Nrf2 y HO-1 en microglía (Parada et al., 2013). Así mismo, en un modelo de la enfermedad de Parkinson, el uso del mismo agonista atenuó la neuroinflamación y la pérdida de neuronas dopaminérgicas inducida por la toxina MPTP (1-metil-4-fenil,6-tetrahidropiridina) (Stuckenholz et al., 2013).

Existen evidencias que respaldan el potencial de la modulación alostérica negativa sobre el $\alpha 7$ nAChR ejercida por el KYNA en modelos preclínicos de conducta adictiva. Diversos estudios han demostrado que KYNA puede disminuir la liberación de DA inducida por drogas de abuso como el $\Delta 9$ -tetrahidrocannabinol (THC) (Justinova et al., 2013), la nicotina (Secci et al., 2017) o el etanol (Giménez-Gómez et al., 2018).

5.2.4.2 Receptores glutamatérgicos: NMDA, AMPA y kainato

Los receptores glutamatérgicos están formados por cuatro subunidades que forman un poro selectivo para cationes tras la unión del glutamato. Una vez que el agonista se une al receptor, se permite el flujo de iones Na^+ , y en ciertos casos de Ca^{2+} , hacia el interior de la célula, mientras que el catión K^+ sale al medio extracelular. Este proceso genera un aumento del potencial membrana neuronal que favorece la iniciación del impulso nervioso (Hansen et al., 2021).

Cada receptor tetramérico NMDA está formado por la unión de dos dímeros. Las subunidades monoméricas que pueden constituir estos dímeros son las GluN1, GluN2 y

GluN3. Cada dímero está formado siempre por una subunidad GluN1 acompañada de alguna de las isoformas de GluN2 (GluN2A, 2B, 2C y 2D), o con menor frecuencia, GluN3. La presencia de diferentes isoformas de subunidades GluN2 o GluN3 influye en las propiedades fisiológicas y farmacológicas del receptor (Hansen et al., 2021). El receptor NMDA requiere la unión simultánea de dos ligandos para inducir la apertura del canal, estos son, la unión de glutamato u otros agonistas a la subunidad GluN2 y la unión del coactivador glicina a la subunidad GluN1. Además, en condiciones de reposo el poro del canal está bloqueado por el catión Mg^{2+} , el cual se libera durante la despolarización de la membrana. Esto implica que la activación del receptor requiere la coincidencia entre la liberación de glutamato desde la neurona presináptica y la llegada del impulso nervioso a la neurona postsináptica. La fuerza del bloqueo del catión Mg^{2+} depende de las subunidades que formen el receptor: los receptores que contienen las subunidades GluN2A y GluN2B presentan un bloqueo más fuerte en comparación con aquellos que incluyen GluN2C y GluN2D (Cull-Candy et al., 2001).

Las subunidades GluN2A y GluN2B son las que presentan mayor expresión y han sido objeto de investigación por su importante papel en la plasticidad sináptica. La presencia de GluN2A aumenta la probabilidad de apertura del NMDAR, mientras que la activación de receptores con subunidades GluN2B genera el doble de carga debido a una desactivación más lenta. Además, los receptores que contienen GluN2B parecen ser más permeables al flujo de Ca^{2+} y presentan una mayor afinidad por glutamato en comparación con aquellos que incluyen GluN2A. Cabe destacar que los receptores que contienen GluN2B suelen localizarse en el entorno extrasináptico, a diferencia de GluN2A que se encuentra en la densidad postsináptica, lo que puede compensar su menor afinidad por glutamato (Sanz-Clemente et al., 2013; Yashiro & Philpot, 2008).

El KYNA es un antagonista de amplio espectro sobre los receptores glutamatérgicos, ya que inhibe los receptores NMDA, AMPA y kainato aproximadamente al mismo nivel en concentraciones micromolares (Perkins & Stone, 1982; Schwarcz et al., 2012). Sin embargo, el KYNA presenta mayor afinidad para el sitio del coagonista glicina en el receptor NMDA, por lo que esta es su diana farmacológica preferente (Parsons et al., 1997), donde actúa como antagonista no competitivo. Además, se ha descrito que KYNA puede actuar también como antagonista competitivo en el sitio de glutamato (T. W. Stone et al., 2013). Los NMDAR desempeñan un papel fundamental en la sinaptogénesis, la maduración sináptica, la plasticidad sináptica y la cognición (Dupuis et al., 2023).

En el contexto de la modulación de la conducta adictiva se han empleado diferentes estrategias que implican a NMDAR. Destaca el estudio llevado a cabo por Shen y colaboradores en 2011. Demostraron que la autoadministración de heroína y su posterior extinción en ratas generaron un aumento en la expresión en superficie de los receptores NMDA que contienen subunidades GluN2B en el NAcc *core*. La inhibición de los receptores NMDA con subunidades GluN2B mediante la administración sistémica o en NAcc *core* de ifenprodilo, redujo la reinstauración de búsqueda de heroína inducida tanto por la droga como por estímulo condicionado (H. Shen et al., 2011). El ifenprodilo también fue capaz de bloquear de forma dosis-dependiente el desarrollo, mantenimiento y reinstauración de la preferencia de lugar inducida por morfina sin afectar a la memoria y aprendizaje espacial. Estos hallazgos sugieren un papel importante de los receptores

INTRODUCCIÓN

NMDA que contienen GluN2B en la modulación de la conducta adictiva inducida por opioides (Ma et al., 2011).

Otra de las herramientas empleadas para modular NMDAR ha sido la memantina. Este fármaco, que bloquea el poro iónico del receptor, ha demostrado ser eficaz en la reducción del consumo, *craving* y síndrome de abstinencia inducido por opioides (Montemitto et al., 2021) y otras drogas como nicotina o cocaína (Tomek et al., 2013). Por ejemplo, en investigación clínica, el uso de memantina redujo modestamente los efectos subjetivos de la heroína sin alterar su valor reforzante en usuarios que habían sido desintoxicados de esta sustancia (Comer & Sullivan, 2007). A nivel preclínico, este antagonista ha mostrado atenuar la adquisición de autoadministración de morfina y generar un desplazamiento de la curva dosis-respuesta de morfina hacia abajo y la derecha (Semenova et al., 1999).

Otros compuestos como el acamprosato o la D-cicloserina, modulador y agonista parcial del NMDAR respectivamente, han mostrado efectos beneficiosos en las conductas adictivas inducidas por distintas drogas de abuso (Tomek et al., 2013). Se ha propuesto también un potencial efecto beneficioso del tratamiento con otros agonistas parciales de NMDAR como D-Serina, moduladores alostéricos positivos del receptor metabotrópico de glutamato mGlu5, inhibidores del transportador de glicina GlyT1, o moduladores alostéricos positivos del receptor AMPA. Todos estos compuestos han mostrado efectividad a nivel preclínico al facilitar el proceso de extinción de la conducta de autoadministración. Por lo tanto, su uso como medicación coadyuvante podría contribuir a mejorar los resultados en la clínica durante la terapia de exposición, atenuando la reactividad ante estímulos asociados a la droga y disminuyendo la probabilidad de recaída (Cleva et al., 2010).

En definitiva, la evidencia acumulada sugiere que el papel de los receptores NMDA y la señalización glutamatérgica es fundamental en las diferentes fases de la conducta adictiva inducida por diferentes drogas de abuso.

5.2.5 Ácido quinolínico (QUIN)

QUIN es el otro metabolito mayoritario de la KynP y no es capaz de atravesar la BHE (Fukui et al., 1991). Esto significa que la concentración de este metabolito en cerebro depende de la actividad de la enzima KMO en este tejido y puede variar según las alteraciones en la concentración periférica de su precursor KYN (Gál & Sherman, 1980; T. W. Stone, 1993).

A diferencia de lo que ocurre con el KYNA, QUIN se considera un metabolito neurotóxico que ejerce su efecto mediante diversos mecanismos, algunos de los cuales son totalmente opuestos a los ejercidos por KYNA (Lugo-Huitrón et al., 2013). QUIN es un potente agente excitotóxico que actúa como agonista de NMDAR, siendo especialmente eficaz en áreas con elevada expresión de este receptor como estriado o hipocampo (Nakanishi, 1992; Schwarcz & Köhler, 1983). Asimismo, se ha descrito que la QPRT, enzima responsable de la conversión de QUIN a NAD^+ , está presente en muchas menos células que la enzima 3-HAO, que genera QUIN a partir de 3-HAA. Además, la velocidad de producción de QUIN es mucho más rápida que la de obtención de NAD^+ , lo que tiene implicaciones para la acumulación de QUIN en ciertas condiciones patológicas (Foster et al., 1986; Kohler et al., 1988; Lugo-Huitrón et al., 2013). El QUIN puede provocar un aumento en la liberación de glutamato e inhibir su recaptación por parte de

los astrocitos (Tavares et al., 2020). Además, limita el reciclado astrocitario de glutamato al disminuir la actividad de la glutamina sintetasa (Ting et al., 2009). QUIN también puede generar disfunción mitocondrial, ya que se ha observado que reduce la respiración celular y los niveles de ATP (Bordelon et al., 1997, 1998). Otro mecanismo implicado en la neurotoxicidad de QUIN es la producción de estrés oxidativo, que se genera a través de la formación de complejos de QUIN con Fe^{2+} (Goda et al., 1996), la activación de la enzima óxido nítrico sintasa (NOS) en astrocitos y neuronas (Cruz et al., 2010) o mediante la modificación del perfil de actividad de ciertas enzimas antioxidantes (Rodríguez-Martínez et al., 2000). Estos procesos pueden causar daño en el ADN y peroxidación lipídica (Guillemin, 2012; Lugo-Huitrón et al., 2013). Por último, QUIN puede alterar la permeabilidad de la BHE (Reynolds & Morton, 1998; Št'astný et al., 2000), desestabilizar los citoesqueletos neuronales y astrocitarios mediante la fosforilación de proteínas estructurales (Pierozan et al., 2010; Rahman et al., 2009) y parece afectar los procesos de autofagia (Silva-Islas et al., 2022). Los efectos neurotóxicos de QUIN son conocidos desde hace décadas; sin embargo, los efectos gliotóxicos se han descrito más recientemente. El QUIN genera astrogliosis, induce la expresión de citoquinas proinflamatorias (Guillemin, Croitoru-Lamoury, et al., 2003; M. C. Lee et al., 2010) y puede provocar la apoptosis de astrocitos (Guillemin et al., 2005) mediante mecanismos que son, al menos en parte, mediados por NMDAR (Guillemin, 2012).

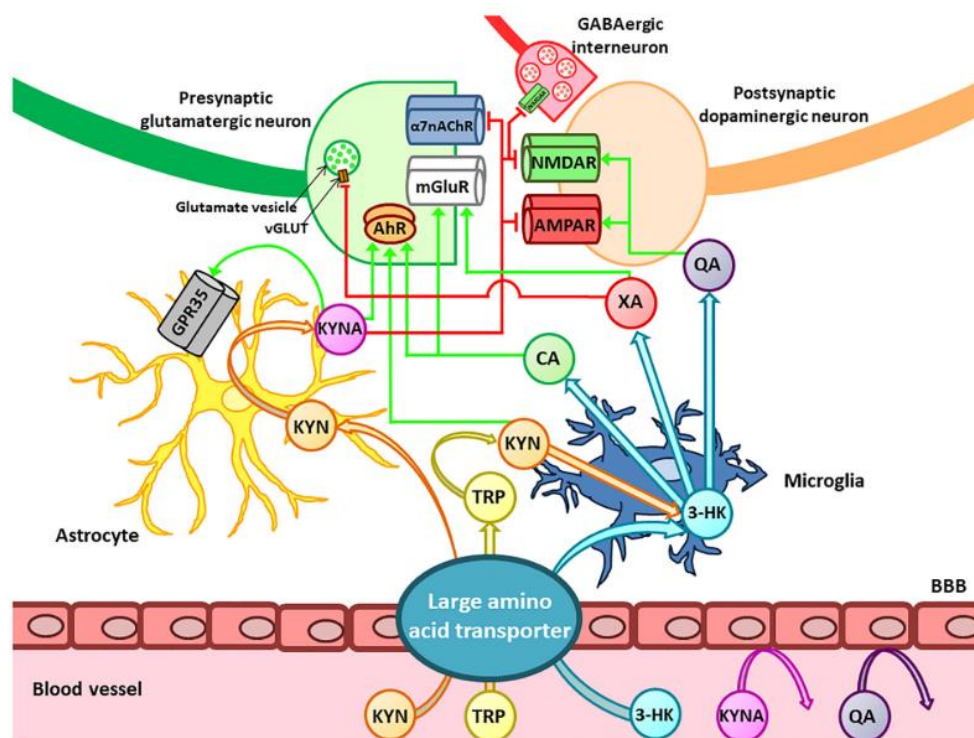


Figura 11 | Dianas de los metabolitos de la KynP en el SNC. Las líneas verdes indican activación, las rojas indican inhibición. QA: ácido quinolínico. CA: ácido cinabaránico. BBB: barrera hematoencefálica. mGluR: receptor metabotrópico de glutamato. vGLUT: transportador vesicular de glutamato. Imagen tomada de Morales-Puerto et al., 2021.

5.2.6 Otros metabolitos de la KynP

La mayoría de los estudios que describen el perfil de efectos de los metabolitos de la KynP se han centrado en KYNA y QUIN, aunque otros metabolitos también son neuroactivos.

La 3-HK presenta propiedades neurotóxicas ya que produce radicales libres, lo que conduce a la muerte neuronal y apoptosis (Chiarugi et al., 2001; Okuda et al., 1998). Además, la acción de 3-HK produce superóxido y peróxido de hidrogeno, promueve el daño oxidativo a proteínas y afecta al metabolismo energético celular (Goldstein et al., 2000). No obstante, en otros estudios 3-HK actúa como antioxidante y secuestrador de radicales libres y se postula que las concentraciones empleadas de 3-HK empleadas en dichos estudios superan considerablemente las encontradas en condiciones fisiológicas y patológicas. Mas allá del discutido papel prooxidante o antioxidante de 3-HK, este metabolito en las altas concentraciones observadas en condiciones patológicas puede alterar proteínas por interacción directa, reacciones de autooxidación e interacción con otras moléculas, así como alterar la función mitocondrial y dañar el ADN (Colín-González et al., 2013).

El XA es un producto de la transaminación de 3-HK que se encuentra principalmente a nivel neuronal, y debido a esto, históricamente se postula que ejerce un efecto beneficioso al detoxificar 3-HK (Maitre et al., 2024). Además, este metabolito tiene un efecto antioxidante derivado de su capacidad quelante de iones metálicos, es un agonista del receptor AhR (DiNatale et al., 2010), potencia la actividad de receptores metabotrópicos de glutamato mGlu2/3 (Fazio et al., 2015) e inhibe el transportador vesicular de glutamato vGLUT (Fazio et al., 2017; Neale et al., 2014). También se ha sugerido que XA podría desempeñar un papel en la señalización intracelular cerebral ya que se ha identificado la existencia de un GPCR específico para este metabolito (Taleb et al., 2012). A diferencia de KYNA, XA estimula la liberación de DA (Gobaille et al., 2008), por lo que el equilibrio entre estos dos metabolitos podría ser crucial en la regulación de la liberación de glutamato y DA. Por último, el XA cerebral podría representar una señal homeostática entre la periferia y varias áreas cerebrales, ya que se ha demostrado que se acumula en el cerebro tras su administración periférica (Maitre et al., 2024).

El 3-HAA puede ser generado por acción de la kinureninasa a partir de 3-HK, o provenir del ácido antranílico, siendo esta última la ruta preferida en cerebro (Baran & Schwarcz, 1990). Existen evidencias que muestran tanto un papel prooxidante (Goldstein et al., 2000) como antioxidante (Christen et al., 1990) de este metabolito, dependiendo de las condiciones redox presentes (Darlington et al., 2010). Un estudio reciente ha demostrado que la suplementación con este metabolito, o la disminución de la expresión de la enzima 3-HAO, responsable de su oxidación, extiende la vida de *C. elegans* y ratones, además de retrasar el deterioro de la salud asociado a la edad. En el modelo del nematodo, el 3-HAA aumentó la resistencia al estrés oxidativo mediante la modulación de los niveles de peróxido de hidrogeno, tanto endógeno como exógeno, y la activación de la respuesta al estrés oxidativo a través del factor homólogo a Nrf2 en *C. elegans*, SKN-1 (Dang et al., 2023).

El ácido cinabarínico, producido por la autooxidación del 3-HA, es un agonista débil del receptor mGlu4. Se ha demostrado que este compuesto atenúa la muerte celular por

excitotoxicidad en cultivos celulares y protege a las neuronas nigro-estriatales de la toxicidad inducida por la inyección de la toxina MPTP en el globo pálido (Fazio et al., 2012). Además, al igual que KYN y KYNA, el ácido cinabarinico actúa como un agonista endógeno de AhR, y se ha observado que juega un papel en la modulación de la tolerancia inmune al promover la diferenciación de linfocitos T (Fazio et al., 2017; Lowe et al., 2014). Sin embargo, el estudio de las acciones de este metabolito es complicado debido a que sus concentraciones suelen estar por debajo del límite de cuantificación (Gawel, 2024).

El PA se produce por la acción enzimática de una decarboxilasa sobre el producto inestable generado por la enzima 3-HAO. Aunque la relevancia fisiológica de este metabolito aún no se comprende completamente, se han identificado algunas de sus características más destacadas. Entre ellas, su capacidad para quelar cationes metálicas (Grant et al., 2009) y su habilidad para antagonizar la neurotoxicidad inducida por QUIN tanto *in vitro* como *in vivo*, mediante un mecanismo aún desconocido que podría involucrar la quelación del zinc endógeno (Bryleva & Brundin, 2017; Chen et al., 2011; Jhamandas et al., 1998)

Por último, es importante mencionar la nicotinamida (NAA), un producto del metabolismo de QUIN y precursor del cofactor metabólico esencial NAD^+ (Schwarcz & Stone, 2017). La NAA ha demostrado tener propiedades neuroprotectoras en un modelo de Parkinson gracias a su capacidad para inhibir histona-deacetilasas y modular el metabolismo energético mitocondrial (Harrison et al., 2019).

5.3 Patologías relacionadas con la KynP

En las últimas décadas se ha relacionado la etiología de una amplia variedad de enfermedades con la KynP. En condiciones fisiológicas, la KynP se encuentra finamente regulada, pero puede verse fuertemente inducida por la inflamación. La activación aguda de la KynP, al igual que la inflamación a corto plazo, puede ser beneficiosa, como ocurre, por ejemplo, en los procesos de supresión de replicación bacteriana o vírica (Schmidt & Schultze, 2014). Sin embargo, una activación prolongada debido a un entorno inflamatorio crónico puede alterar muchas rutas y procesos biológicos. Teniendo en cuenta todas las acciones neuroactivas e inmunomoduladoras que tienen los metabolitos de la KynP, se han descrito alteraciones patológicas de la KynP en numerosas enfermedades con componente inflamatorio (Pires et al., 2022). Un incremento en la actividad de la KynP se ha asociado con enfermedades como esquizofrenia (Erhardt, Schwieler, et al., 2017), trastorno bipolar (Kadriu et al., 2019; Trepici et al., 2021; P. Zhang et al., 2021), depresión (Correia & Vale, 2022; Zong et al., 2024), trastorno de déficit de atención con hiperactividad (Cavaleri et al., 2024), trastorno de ansiedad social (Butler et al., 2022), enfermedad de Huntington (Flint Beal et al., 1992; Sathyaikumar et al., 2018), Alzheimer (Fernandes et al., 2023; Sharma et al., 2022), esclerosis múltiple (Biernacki et al., 2020), enfermedades cardiovasculares (Ala & Eftekhar, 2022), isquemia cerebral (Cuartero et al., 2016), diabetes (Kozieł & Urbanska, 2023), artritis reumatoide (Mangoni & Zinellu, 2023; Moulin et al., 2024), osteoporosis (Ballesteros et al., 2023), cáncer (Ala, 2021; Platten et al., 2019), dolor crónico (Jovanovic et al., 2020), enfermedades producidas por virus (Gaelings et al., 2017; Thomas et al., 2020; Wickström et al., 2021), parásitos (Hunt et al., 2017) o bacterias (Krupa et al., 2022).

Asimismo, han surgido estrategias terapéuticas basadas en la modulación de la KynP, ya sea mediante la inhibición de enzimas implicadas en esta ruta o buscando incrementar los niveles de ciertos metabolitos. En este sentido, la literatura describe los efectos de diferentes inhibidores sobre las enzimas IDO, TDO, KAT y KMO. Por ejemplo, dado el papel de la activación de la KynP en cáncer, cuatro inhibidores de IDO-1 han sido evaluados en ensayos clínicos (Pires et al., 2022). Otra patología que cursa con un aumento de la actividad en la KynP es el dolor neuropático (Maganin et al., 2022). Además de la evidencia preclínica, se han encontrado niveles aumentados de expresión de IDO-1 y de la ratio KYN/TRP en el plasma de pacientes con dolor lumbar crónico (H. Kim et al., 2012), síndrome de dolor regional complejo (G. M. Alexander et al., 2013) y mialgia relacionada con enfermedades temporomandibulares (Barjandi et al., 2020). Se han obtenido resultados de dos ensayos clínicos en fase I que emplean compuestos moduladores de la actividad de la KynP, entre los cuales destaca L-4-clorokinurena (AV-101) para el tratamiento del dolor neuropático (Al-Karagholi et al., 2021; Wallace et al., 2017). Uno de los metabolitos que más atención ha recibido es el KYNA, debido a su acción sobre diferentes receptores. La inhibición de KMO y consecuente elevación de KYNA ha mostrado buenos resultados a nivel preclínico en el campo neurocientífico. La inhibición de KMO ha demostrado tener efectos beneficiosos en modelos animales de la enfermedad de Huntington (Beaumont et al., 2016), dolor neuropático (Rojewska et al., 2016), esquizofrenia (Réus et al., 2018) y depresión (Parrott et al., 2016). Recientemente ha finalizado un ensayo clínico de fase I del inhibidor de KMO KNS366, el cual ha mostrado ser seguro y bien tolerado (*ISRCTN10496020: Safety, Tolerability, Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of KNS366*, n.d.). Este candidato tiene potencial para el tratamiento de trastornos que cursan con inflamación aguda o crónica, como el daño renal agudo asociado a cirugía cardíaca, pancreatitis aguda o trastornos inmuno-inflamatorios crónicos (Edinburgh Innovations, 2024). Otra estrategia empleada ha sido la administración de KYN, la cual puede ejercer un efecto neuroprotector asociado a un incremento en la síntesis de KYNA en situaciones de isquemia cerebral (Robotka et al., 2008; Sas et al., 2008) y dolor neuropático (Ciapała et al., 2023).

Además, algunos metabolitos de la KynP han sido propuestos como potenciales biomarcadores para diferentes patologías como el cáncer (Huang et al., 2018), diabetes (Subramanian et al., 2024), COVID-19 (Bizjak et al., 2022) o enfermedades neurodegenerativas (Török et al., 2020). Un ejemplo notable es el posible uso de QUIN y XA como biomarcadores de dolor crónico (Amirdelfan et al., 2020; Gunn et al., 2020). Como se puede apreciar, la relevancia de la KynP es considerable en cuanto a su implicación, potencial terapéutico y diagnóstico en numerosas enfermedades. Aunque no podemos entrar en detalle en cada una de estas en la presente Tesis Doctoral, la implicación de la KynP en los trastornos por consumo de sustancias y el dolor ha adquirido relevancia en las últimas décadas. Dado que este tema es de particular interés en esta Tesis Doctoral, será abordado en los siguientes apartados.

6. Relación entre el TCO y la vía de kinurena

En las últimas décadas, la KynP se ha propuesto como una diana terapéutica novedosa para modular el abuso, la búsqueda y la recaída producida por diferentes drogas de abuso. Al igual que ocurre con el resto de las enfermedades en las que se ha implicado la KynP, el KYNA ha sido el metabolito que ha recibido más atención en el estudio de las

conductas adictivas (Morales-Puerto et al., 2021). Como se mencionó anteriormente, el KYNA actúa como antagonista sobre los receptores NMDA (Perkins & Stone, 1982; Schwarcz et al., 2012). Estos receptores glutamatérgicos están presentes en las neuronas dopaminérgicas y median procesos de potenciación y depresión a largo plazo que son fundamentales para la neuroplasticidad. A su vez, el fenómeno de la plasticidad está implicado en las adaptaciones de los circuitos neuronales que conducen al uso compulsivo de las drogas (Lüscher & Malenka, 2011; Zweifel et al., 2009). Además, ciertos procesos cognitivos se encuentran en la intersección entre la KynP y los trastornos adictivos. Por ejemplo, la memoria y el aprendizaje suelen verse afectados por el consumo de drogas (Ramey & Regier, 2019) y también por alteraciones en la KynP (Akagbosu et al., 2012; Chess et al., 2007; Ramirez Ortega et al., 2020). Así, los niveles elevados de KYNA en pacientes esquizofrénicos generan un déficit en la señalización glutamatérgica debido al antagonismo NMDAR, lo que podría explicar los síntomas cognitivos asociados con la esquizofrenia (Chess et al., 2007; Shepard et al., 2003). Por otro lado, el KYNA actúa como un modulador alostérico negativo del $\alpha 7$ nAChR, lo cual es relevante en el contexto de las conductas adictivas. Estos receptores se localizan a nivel presináptico en los terminales de aferentes glutamatérgicos, donde modulan la actividad de las neuronas dopaminérgicas del VTA (Jones & Wonnacott, 2004) y las neuronas dopaminérgicas D1 del NAcc (Zappettini et al., 2014). La activación de los $\alpha 7$ nAChR produce la liberación de glutamato en el VTA, lo que potencia la señalización dopaminérgica en las neuronas del VTA hacia el NAcc. Por lo tanto, la actividad de KYNA como modulador alostérico negativo sobre este receptor reducirá la liberación de glutamato en VTA, y consecuentemente, la liberación de DA en NAcc, un fenómeno esencial en el sistema de recompensa (Morales-Puerto et al., 2021).

Por último, el agonismo del GPR35 mediado por KYNA puede contribuir a la disminución de los niveles de glutamato extracelular, lo que a su vez reduce la transmisión excitatoria y podría modular la conducta adictiva (Albuquerque & Schwarcz, 2013).

En definitiva, KYNA modula la neurotransmisión glutamatérgica por diferentes vías y, por lo tanto, tiene un gran potencial para modular diversos aspectos de los procesos adictivos (Morales-Puerto et al., 2021). A pesar de esto, no se puede obviar el potencial papel que tienen el resto de los metabolitos de la KynP, dados sus variados efectos neuroactivos descritos en apartados anteriores.

Quizá la publicación más relevante que destaca la interacción entre los TCS y la KynP es la de Justinova y colaboradores (2013). En este estudio, se empleó la autoadministración de THC y el cannabinoide sintético WIN 55,2121-2 en ratas y mono ardilla. Los autores demostraron que la administración i.p. de Ro 61-8048, un inhibidor de KMO, aumenta los niveles de KYNA en NAcc *shell* y VTA, reduce la autoadministración de estos cannabinoides y previene la reinstauración de la conducta de búsqueda de la droga inducida por una dosis del cannabinoide o por los estímulos asociados al mismo. Todos estos efectos se atribuyen a la acción de KYNA sobre $\alpha 7$ nAChR, ya que se previenen mediante la administración de moduladores alostéricos positivos como PNU-120596 o galantamina. Para reforzar esta hipótesis, comprobaron que la administración de KYNA en NAcc previene el aumento de DA inducido por THC (Justinova et al., 2013). Tras este trabajo, surgieron otros estudios con enfoques similares que corroboran el potencial terapéutico de la inhibición de KMO; la administración de Ro 61-8048 reduce el consumo

INTRODUCCIÓN

de alcohol en un modelo de recaída, previene la reinstauración de la conducta de búsqueda de alcohol y cocaína inducida por estímulo condicionado en ratas (Vengeliene et al., 2016). Además, se observó que este inhibidor disminuye la autoadministración de nicotina en ratas y monos ardilla, reduce la liberación de DA en NAcc inducida por nicotina en ratas, previene la reinstauración de la búsqueda de nicotina inducida por nicotina o estímulo condicionado en mono ardilla y rata, así como la reinstauración de la búsqueda de cocaína inducida por cocaína o por estímulo condicionado en monos ardilla (Secci et al., 2017).

En nuestro laboratorio, se ha descrito detalladamente el papel de la modulación de la KynP sobre la conducta adictiva inducida por etanol, utilizando modelos murinos de consumo intensivo y dependencia. En el modelo de consumo en atracón o *binge drinking* conocido como *Drinking in the Dark* (DID), se observó que la administración del modulador alostérico positivo de $\alpha 7$ nAChR PNU-120596 previene la disminución del consumo de alcohol inducida por la administración de Ro 61-8048. Además, la administración sistémica de KYN generó una disminución del consumo de etanol (Giménez-Gómez et al., 2018). En este último estudio también se mostró que la administración i.p. de Ro 61-8048 evita la liberación de DA en NAcc provocada por el etanol. Mas recientemente, en el modelo de dependencia al etanol inducida por la exposición intermitente crónica (CIE), se observó que Ro 61-8048 reduce el consumo en ratones macho y hembra. Además, se encontró que PNU-120596 reduce de forma dosis-dependiente la disminución en el consumo de alcohol producida por el inhibidor de KMO, y que el transporte de KYN a través de los transportadores LAT y OAT es esencial en el efecto de reducción del consumo (Gil de Biedma-Elduayen et al., 2022).

En el contexto específico de modelos preclínicos de TCO, hace más de tres décadas se demostró que la administración intracerebroventricular de KYNA atenúa marcadamente la activación de neuronas del *locus coeruleus* y algunos de los síntomas de la abstinencia de morfina inducida por naltrexona (Rasmussen, 1991). Sin embargo, más allá de esta referencia, la literatura científica en la que se hayan evaluado los efectos de la modulación de la KynP sobre las conductas adictivas inducidas por opioides es escasa. Se ha descrito que la activación de los receptores NMDA está implicada en el desarrollo de la dependencia física a morfina y en el desarrollo de tolerancia analgésica (Marek et al., 1991; Trujillo & Akil, 1991). En este sentido, KYNA podría tener un efecto beneficioso al actuar sobre este receptor. Además, a pesar de que se ha descrito que KYNA no tiene afinidad por receptores opioides (Zador et al., 2014), la administración de este metabolito altera la señalización opioide mediante la modificación de la actividad de las proteínas G a través de un mecanismo que implica al receptor NMDA (Samavati et al., 2017). En cuanto a la interacción del TCO y KynP a nivel de $\alpha 7$ nAChR, la administración sistémica y en hipocampo ventral del antagonista metillicaconitina atenúa o previene la reinstauración de la preferencia de lugar condicionado por morfina (Feng et al., 2011; Wright et al., 2019). Sin embargo, este aspecto tampoco ha sido estudiado en profundidad. De manera similar, la literatura sobre el efecto del consumo de opioides en los niveles de metabolitos de la KynP es limitada. Algunos estudios apuntan que la dependencia de morfina se asocia con la disminución y el aumento en la concentración de TRP en plasma y cerebro respectivamente, teniendo un papel importante la entrada del TRP en cerebro (Larson & Takemori, 1977; Messing et al., 1978; Zaitso et al., 2014). Ghanbari y colaboradores muestran una disminución de los niveles plasmáticos de KYN y TRP en

pacientes con TCO en comparación con aquellos que son simplemente grandes consumidores de opioides (Ghanbari et al., 2021). Una revisión sistemática establece una relación indirecta entre el TCO y la KynP al señalar el papel de ciertos biomarcadores (IL-6, IL-10, CCL-2) relacionados con la inflamación crónica central y periférica (B. M. Bryant et al., 2021). También se ha observado que el tratamiento con buprenorfina o metadona reduce significativamente la neuroinflamación de pacientes con TCO (Jaureguiberry-Bravo et al., 2018; Lu et al., 2019; T. Y. Wang et al., 2017).

7. Relación entre el dolor crónico y la KynP

A diferencia de la relación existente entre KynP y TCO, existe algo más de literatura científica que explora el papel de la KynP en el dolor crónico. Mas allá del uso frecuente de opioides para el tratamiento del dolor crónico (Dowell et al., 2016, 2023), las interacciones entre neuronas y células gliales en medula espinal juegan un papel crucial en el dolor neuropático mediante la amplificación de la sensibilización central. Los mediadores liberados por células gliales que potencian la neurotransmisión glutamatérgica en la medula espinal pueden agravar el dolor neuropático. Además, la activación inmune y de células gliales tanto a nivel central como periférico, contribuye a la activación de la KynP. En este contexto, es interesante destacar que los antagonistas de NMDAR han mostrado un potencial significativo para el tratamiento de la alodinia táctil en modelos preclínicos de dolor neuropático (Hazrati et al., 2024), lo que subraya la relevancia de la KynP y sus metabolitos en el manejo del dolor crónico. Ciertos autores han investigado el efecto de la modulación de la KynP sobre la nocicepción. En condiciones fisiológicas normales, la administración i.p. de TRP, KYN, ácido antranílico, QUIN, XA y PA produce efectos antinociceptivos en ratas sometidas a las pruebas de placa caliente y de retirada de la cola (Heyliger et al., 1998). Asimismo, la administración intratecal de KYN en ratas produce efectos antinociceptivos de manera dosis-dependiente en las mismas pruebas (Kristensen et al., 1993).

En roedores sometidos a diferentes modelos de dolor neuropático, la administración de determinados metabolitos o la modulación de la KynP ha demostrado tener efectos beneficiosos. En un modelo de dolor neuropático inducido por la ligadura de los nervios espinales L5 y L6 en ratas, la coadministración i.p. de KYN y probenecid mitiga la alodinia táctil gracias al aumento de los niveles de KYNA, mientras que la administración de ambos compuestos por separado no mostró el mismo efecto. Además, la administración intratecal de KYNA alivia la alodinia, siendo este efecto potenciado por la administración sistémica de probenecid (Pineda-Farias et al., 2013). En ratones sometidos al modelo de dolor neuropático de ligadura neural por omisión (*spared nerve injury*, SNI) se ha descrito un aumento de la expresión de la KMO neuronal y de los niveles de QUIN, además de una disminución de niveles de KYNA en el hipocampo contralateral a la lesión. La administración de un antagonista del receptor de IL-1 tras la cirugía SNI previno el incremento en la transcripción del gen que codifica para KMO, aunque no tuvo ningún efecto sobre la alodinia. En este modelo SNI, se aprecia también un fenotipo depresivo en el test de natación forzada, el cual se vio prevenido por la administración intracerebroventricular de Ro 61-8048, sin afectar a la alodinia mecánica (Laumet et al., 2017). En otro estudio, la administración intratecal de KYNA redujo la hipersensibilidad térmica y mecánica en ratones sometidos al modelo de constricción crónica del nervio ciático (CCI) (Resta et al., 2016). Este efecto podría estar mediado por

INTRODUCCIÓN

la disminución de la neurotransmisión glutamatérgica y excitabilidad neuronal, atribuida a la acción de KYNA sobre los receptores GP35 (Carpenedo et al., 2001; Guo et al., 2008). Otro estudio respalda esta hipótesis, al mostrar que tanto KYNA como zaprinast, ambos agonistas del receptor GPR35, reducen en ratones el dolor provocado por CXCL17 en los test de filamentos de Von Frey y placa fría. En este estudio, además, ambos agonistas GPR35 reducen la hipersensibilidad táctil y mecánica en ratones sometidos al modelo CCI y potenciaron la efectividad analgésica de morfina (Rojewska et al., 2019).

La desregulación de las enzimas de la KynP se ha asociado con el desarrollo del dolor neuropático. Niveles incrementados de QUIN y 3-HK pueden generar daño y disfunción neuronal mediante su acción sobre receptores NMDA y generación de radicales libres (Okuda et al., 1998; Perkins & Stone, 1982). Los radicales libres conducen a la disfunción mitocondrial y neuronal en el asta dorsal de la médula espinal, siendo estos mecanismos cruciales en el desarrollo del dolor neuropático (Bae et al., 2018; H. Y. Kim et al., 2015). En estudios realizados en ratas, se ha descrito un incremento de la transcripción de los genes para IDO2, KMO y 3-HAO tras siete días desde el inicio del modelo CCI. En estos animales, la administración de minociclina, un antibiótico que inhibe la activación microglial, redujo la hipersensibilidad mecánica y táctil y los niveles de ARNm (ARN mensajero) codificante para IDO2 y KMO. La inhibición de IDO2 y KMO en estos animales atenuó el desarrollo de alodinia mecánica y térmica en los días 2 y 7 tras el inicio del modelo CCI (Rojewska, Ciapała, et al., 2018). Un estudio reciente propone de manera convincente un mecanismo implicado en el desarrollo de dolor neuropático empleando ratones sometidos al modelo SNI. Este mecanismo se desencadena por la acumulación de células dendríticas que expresan IDO-1 en las leptomeninges de la raíz dorsal, lo cual contribuye a un aumento de los niveles de KYN en la médula espinal. Posteriormente, la KYN es metabolizada por astrocitos que expresan KMO en médula espinal para generar 3-HK, un metabolito con efecto pro-nociceptivo. Además, el QUIN formado en la KynP también actúa como agonista del receptor NMDA, desempeñando un papel crucial en el desarrollo del dolor neuropático (Maganin et al., 2022). Otro estudio muy relevante es el de Ciapała y colaboradores, quienes encontraron niveles elevados de ARNm codificante para KMO, kinureninasa y 3-HAO en médula espinal de ratones siete días después de ser sometidos al modelo CCI. En estos animales, la administración intratecal única de 1-D-MT (inhibidor de IDO), UPF468 (inhibidor de KMO) o KYN atenuó la hipersensibilidad mecánica y térmica e incrementó la efectividad analgésica de opioides. Además, el pretratamiento con el inhibidor de KMO potenció el efecto anti-alodínico de KYN. Por otra parte, la administración sistémica de KYN también ejerció un efecto analgésico, el cual se potenció por el pretratamiento con minociclina. La administración de KYN ya sea por vía intratecal o intravenosa, potenció el efecto analgésico de morfina, buprenorfina u oxycodona (Ciapała et al., 2023).

Además de todas estas evidencias que sugieren que la KynP desempeña un papel relevante en el dolor neuropático, cómo se mencionó anteriormente, tanto el QUIN como el XA se postulan como biomarcadores potenciales para el dolor crónico (Auyeung et al., 2023; Gunn et al., 2020).

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Opioides como el fentanilo son analgésicos eficaces utilizados en la terapia del dolor. El marcado aumento en el consumo de estos medicamentos, independientemente de su uso terapéutico, es motivo de preocupación para las autoridades sanitarias. El conocimiento de los mecanismos moleculares que subyacen al desarrollo de la dependencia de opioides y el desarrollo de alternativas para reducir el abuso de estas drogas se ha convertido en una cuestión prioritaria de salud pública. Recientemente, la vía de la kinurena (KynP) ha sido identificada como una nueva diana farmacológica para modular el abuso de drogas, la conducta de búsqueda de drogas y la recaída.

Nuestra hipótesis postula que la KynP es una diana para el tratamiento de la adicción a opioides. Un aumento en la concentración cerebral de kinurena (KYN) y ácido kinurénico (KYNA) inducida por la inhibición periférica de kinurena 3-monooxigenasa (KMO), mediante la administración de Ro 61-8048, reduce el efecto reforzante y la reinstauración del comportamiento de búsqueda de fentanilo en ratas sometidas a un paradigma de autoadministración operante intravenosa. Dado que el dolor altera los sustratos neuronales que modulan la búsqueda de drogas y reduce la liberación de dopamina en el *nucleus accumbens* (NAcc), la respuesta a Ro 61-8048 y la conducta adictiva inducida por fentanilo será distinta en animales con dolor crónico neuropático. Además, debido a los efectos antinociceptivos del KYNA, Ro 61-8048 potencia el efecto antinociceptivo del fentanilo y reduce su autoadministración en animales con dolor.

Para contrastar estas hipótesis, se establecieron los siguientes objetivos generales y específicos:

1. Establecer un modelo de autoadministración intravenosa operante de fentanilo y definir la dosis de Ro 61-8048 efectiva para modular la conducta adictiva.
2. Evaluar el efecto de Ro 61-8048 sobre la conducta adictiva inducida por fentanilo, considerando el refuerzo, el dolor neuropático y comportamientos asociados.
 - 2.1. Determinar el impacto de Ro 61-8048 en distintas fases de la conducta adictiva (adquisición, mantenimiento, extinción y reinstauración) y su influencia sobre receptores $\alpha 7$ nACh y NMDA.
 - 2.2. Determinar el efecto de Ro 61-8048 sobre la actividad locomotora, la ansiedad y la autoadministración de sacarosa y comida.
 - 2.3. Determinar el efecto de Ro 61-8048 sobre el desarrollo de aversión de lugar condicionado inducida por naloxona en animales dependientes de fentanilo.
 - 2.4. Estudiar el impacto del dolor neuropático por el modelo de ligadura neural por omisión (SNI: *spared nerve injury*) y Ro 61-8048 sobre la conducta adictiva inducida por fentanilo y la alodinia.
3. Caracterizar las alteraciones moleculares inducidas por Ro 61-8048 y fentanilo en cerebro y plasma de animales con y sin dolor neuropático.
 - 3.1. Determinar la concentración de metabolitos de la KynP.
 - 3.2. Determinar la expresión de proteínas implicadas en la adicción a opioides: GluN2A, GluN2B, EAAT2, Akt y Erk1/2.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Animales de experimentación

Todos los procedimientos se llevaron a cabo en ratas macho adultas de la cepa Long Evans (Janvier, Francia). A su llegada, con ocho semanas de edad, las ratas tuvieron un peso comprendido entre 250 y 300 g y fueron alojadas en grupos de tres o cuatro individuos. Se estabularon en jaulas de policarbonato (60x40x18 cm; Tecniplast, Italia) con viruta de madera y un bloque de madera como enriquecimiento ambiental (*Aspen Wooden blocks*), dentro de una estancia del CAI-animalario de la Universidad Complutense de Madrid (número de registro ES280790000086) con condiciones de temperatura (21 ± 2 °C) y humedad (50-55%) controladas y sometidos a un ciclo de iluminación inversa de 12 h (luces encendidas a las 20:00). Las ratas tuvieron acceso *ad libitum* a comida y agua excepto cuando se encontraban en las cámaras de autoadministración o cuando se sometían a restricción de comida en el entrenamiento operante previo a la autoadministración intravenosa. En todos los casos los experimentos se llevaron a cabo en la fase oscura del ciclo de luz, entre las 8:00 y las 19:00, en una sala aladaña a la habitación donde los animales estaban estabulados.

Las ratas se mantuvieron en estas condiciones al menos una semana tras la llegada a las instalaciones, periodo destinado a la aclimatación de los animales a la estancia y a los experimentadores. A continuación, se realizó la cirugía de cateterización de la vena yugular tras la cual las ratas fueron alojadas de forma individual (45x25x16cm; Tecniplast, Italia) para evitar daños en los catéteres y replicar las condiciones habituales en los experimentos de autoadministración (Engeln et al., 2021; Thomsen & Caine, 2005).

La cepa Long Evans fue seleccionada por su uso habitual en investigación conductual relacionada con aprendizaje y, en concreto, en estudios de conducta adictiva (Janvier, 2017; Simms et al., 2010; Zanni et al., 2020). Esta cepa presenta además mejor agudeza visual (Janvier, 2017; S. Li et al., 2022; Prusky et al., 2002), lo que puede jugar un papel importante en los experimentos en los que los animales se exponen a estímulos visuales.

Todos los procedimientos experimentales fueron examinados por el Comité de Bienestar Animal de la Universidad Complutense de Madrid y aprobados por la Comunidad de Madrid (referencia de aprobación ética: PROEX 154.6/20), siguiendo la Directiva de la Unión Europea 2010/63/UE, Real Decreto 1337 de 1 de febrero 2013 (BOE nº 34, 8 febrero 2013; Orden ECC/566/2015, de 20 de marzo).

2. Compuestos administrados

- Fentanilo, en forma de sal citrato (AEMPS, Kern Pharma, España, PubChem CID: 13810). El compuesto se disolvió en solución salina estéril (NaCl al 0.9% p/v) a una concentración de 500 µg/mL; posteriormente se diluyó a la concentración requerida determinada por el peso de cada uno de los individuos expuestos a autoadministración operante intravenosa. La dosis por infusión empleada en la mayoría de los experimentos fue de 3.2 µg/kg/infusión en un volumen por infusión de 80 µL administrada en 4.6 seg. Las dosis están referidas a fentanilo en forma base. En los estudios con administración vía subcutánea (s.c.) se empleó una dosis de 15 o 50 µg/kg administrada en un volumen de inyección de 1 mL/kg.

- Naloxona, en forma de sal clorhidrato dihidratada (N7758, Merck, Alemania; PubChem CID: 20112022). El fármaco se disolvió en solución salina. Se administró en dosis de 1 mg/kg vía intraperitoneal (i.p.) en un volumen de 1 mL/kg.
- Ro 61-8048 (3,4-Dimetoxi-[-N-4-(nitrofenil)tiazol-2-il]-bencenosulfonamida) (3254. Tocris, EE. UU.; PubChem CID: 5282337). El compuesto se disolvió en solución salina estéril (NaCl al 0.9% p/v) que contenía NaOH 60 mM y se ajustó el pH a 7.4 con HCl (654 pH Meter, Metrohm, Suiza). Se administró vía i.p. en un volumen de 2 mL/kg y a una dosis de 100 mg/kg en todos los estudios.
- PNU-120596 (1-(5-Cloro-2,4-dimetoxifenil)-3-(5-metil-1,2-oxazol-3-il)urea) (2498. Tocris, EE. UU.; PubChem CID: 311434). El compuesto se disolvió en solución salina estéril que contenía 5% DMSO (dimetil sulfóxido; Merck, Alemania) y 5% TWEEN® 80 (Merck, Alemania). Se administró i.p. en un volumen de 2 mL/kg y a la dosis de 8 mg/kg, 30 min antes de la inyección de Ro 61-8048.
- D-Serina (S4250. Merck, Alemania; PubChem CID: 710779). El compuesto se disolvió en solución salina y se administró una dosis de 800 mg/kg i.p. en un volumen de 2.5 mL/kg, 30 min antes de la administración de Ro 61-8048

3. Diseño experimental

3.1 Autoadministración intravenosa operante

En la mayoría de experimentos desarrollados a lo largo de esta Tesis Doctoral se emplearon los mismos parámetros de autoadministración. Las ratas se sometieron a una sesión diaria (los siete días de la semana) de 2 h de duración a un paradigma de refuerzo de razón fija, *fixed ratio 1* (FR1), en el que cada vez que la rata pulsó la palanca activa recibió una dosis de fentanilo vía intravenosa (i.v.). La dosis de fentanilo de 3.2 µg/kg/infusión se administró en un volumen de 80 µL y un tiempo de 4.6 seg (You et al., 2019). En este periodo de tiempo, la infusión se vio acompañada por un estímulo condicionado (*conditioning stimuli*) que duró lo mismo que la infusión. Este estímulo consistió en el encendido de la luz de señal y la emisión de un sonido (2900 Hz, 78 dB) de forma simultánea. En este periodo de 4.6 seg inmediatamente posterior a la presión de la palanca activa, denominado inactivo o *timeout period*, se registró el número de veces que se pulsaron las palancas activa e inactiva, pero no conllevó ningún tipo de consecuencia, ya sea la infusión de fentanilo o la presentación del estímulo condicionado. La pulsación de la palanca inactiva en cualquier periodo tampoco conllevó ninguna consecuencia. Al iniciar cada sesión de autoadministración de fentanilo, las ratas recibieron una dosis no contingente (dosis no asociada a la presión de la palanca activa) vía i.v. de fentanilo para promover la conducta de autoadministración (*priming*), si bien esta infusión no contingente inicial no se administró en las fases de extinción o reinstauración de la conducta de búsqueda de fentanilo. El número de infusiones de fentanilo se limitó a cincuenta en 2 h para evitar una potencial sobredosis.

En la fase de extinción de la conducta de búsqueda de fentanilo, la presión de la palanca activa tuvo como único resultado la obtención de una dosis de salino (80 µL en 4.6 seg) sin la presentación de ningún estímulo asociado. La presión de la palanca inactiva no conllevó ningún tipo de consecuencia.

En el estudio de reinstauración inducida por la droga, las condiciones de autoadministración fueron idénticas a las de fase de extinción. Sin embargo, en el

MATERIALES Y MÉTODOS

experimento de reinstauración inducida por estímulo condicionado (luz, sonido), se expuso a los animales de forma no contingente al estímulo condicionado asociado a fentanilo al entrar en las cámaras de autoadministración. En este caso, además, al presionar la palanca activa se presentó el estímulo condicionado asociado al fentanilo en condiciones idénticas a las de las fases de adquisición y mantenimiento, junto con la administración de una dosis intravenosa de salino. Durante los 4.6 seg de duración del estímulo, presionar la palanca activa no tuvo ninguna consecuencia, al igual que sucedió con la palanca inactiva en cualquiera de los periodos.

En los resultados presentados, se mostrarán los valores del número de presiones en la palanca activa e inactiva y el de infusiones de fentanilo. Al darse el consumo de fentanilo solo en las fases de adquisición y mantenimiento, se incidirá en resultados relativos a estas fases en todos los parámetros mencionados. La razón para mostrar, además del número de infusiones, el número de presiones en la palanca activa e inactiva, es el hecho de que a pesar de que los valores de infusiones y respuestas sobre la palancas activa siempre serán parcialmente correlativas (especialmente empleando el paradigma de refuerzo FR1), el animal puede haber presionado la palanca activa numerosas veces en el periodo de tiempo en que esta presión no conlleva ninguna consecuencia, lo que tiene implicaciones al asociarse a compulsividad y nos permite percibir diferencias en dos cuestiones íntimamente relacionadas pero no idénticas: el consumo de fentanilo y la conducta de búsqueda asociada al mismo. En los resultados relativos a las fases de extinción y reinstauración, el objetivo es mostrar la conducta de búsqueda del animal en ausencia de fentanilo, y por lo tanto se mostrará el número de presiones sobre la palanca activa e inactiva.

Los parámetros de autoadministración difirieron ligeramente de los mencionados anteriormente en los experimentos destinados a estudiar las concentraciones de varios metabolitos de la vía de la kinurenina (KynP) en diferentes fases de la conducta adictiva en animales sometidos a autoadministración de salino o fentanilo, y el destinado a evaluar el efecto de Ro 61-8048 y fentanilo en animales sometidos al modelo de dolor crónico neuropático *spared nerve injury* (SNI). En estos dos estudios las sesiones tuvieron una duración de 1 h para posibilitar la realización de experimentos con un mayor número de grupos experimentales en los seis equipos de autoadministración disponibles.

El otro experimento que difirió en los parámetros es aquel en el que utilizamos un paradigma de refuerzo de razón progresiva (*progressive ratio*, PR). En este caso, el número de presiones sobre la palanca activa que tuvo que realizar el animal para obtener una dosis de fentanilo fue aumentando de forma exponencial según las obtenía de acuerdo al siguiente orden: 1,2,4,6,9,12,15,20,25,32,40.....2459. Este orden deriva de la formula $(5 \times e^{0.2n}) - 5$, redondeando al número entero más cercano, en la que n es la posición en la secuencia de la ratio (Richardson & Roberts, 1996). Esto quiere decir que, por ejemplo, al animal le costó obtener el cuarto refuerzo seis presiones en la palanca activa, mientras que, para obtener el trigésimo primer refuerzo, esa única dosis le costaría 2459 presiones en la palanca activa. La duración de la sesión de autoadministración en este caso fue variable. Estas sesiones pudieron terminar por dos motivos: la falta de obtención de un refuerzo en el lapso de 1 h o el límite de duración establecido de 5 h (Bossert et al., 2019; Panlilio & Schindler, 2000).

3.1.1 Equipo

Los estudios se llevaron a cabo utilizando seis cámaras de autoadministración (C1-PKG, Med Associates, EE. UU.) cada una de ellas equipada con un dispensador de pellets de comida y bomba de infusión (PHM-107, Med Associates, EE. UU.). La parte más distal de la correa (en inglés, *tether*) (KVABR1TH/MED, Instech, Alemania) con respecto a la rata se conectó a una jeringa de polipropileno (BD Emerald, 10 mL, 307736, BD, España) conteniendo la correspondiente solución a autoadministrar. Por la parte más proximal a la rata, el *tether* se conectó al puerto de acceso vascular (*vascular access button*, VAB41B/22, Instech, Alemania) (Fig. 13F) que se implantó en cada rata. El *tether* consta de un tubo de poliuretano rodeado por un muelle (PS95H, Instech, Alemania) que le protege, conectados a una pieza giratoria (*swivel*) que otorga a la rata libertad de movimiento dentro de la jaula. Todo este sistema está acoplado a un contrapeso a la altura del *swivel* con el fin de que el animal no perciba tirantez o presión a la altura del puerto de acceso vascular.

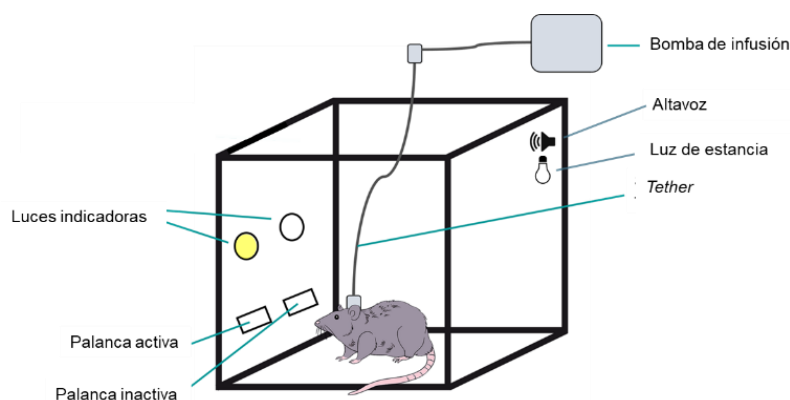


Figura 12 | Esquema del equipo de autoadministración operante.

La jaula, con dimensiones de 29 x 25 x 30 cm, se colocó dentro de un cubículo ventilado para aislar al animal del entorno externo. En su interior, se instalaron dos palancas retráctiles a 7 cm de altura sobre el suelo, ubicadas a cada lado del recipiente de pellets, el cual está a 2 cm del suelo. A 6 cm por encima de cada palanca, se encuentran dos luces indicadoras (*cue lights*). En la parte opuesta de la cámara se sitúa un altavoz y una luz de estancia. Toda la jaula y los componentes, a excepción de la bomba de la infusión, se encuentran dentro del cubículo ventilado. Las pulsaciones de las palancas dentro de la cámara se registran empleando un ordenador y el programa Med-PC (Med Associates, EE.UU.)

Cuando los animales no estaban siendo sometidos a autoadministración, el puerto de acceso vascular se protegió con tapones magnéticos (VABRC, Instech, Alemania) (Fig. 13G).

3.1.2 Cateterización de la vena yugular externa derecha

Las ratas se anestesiaron con una mezcla de isoflurano (Isoflutek; C.N 586259, Laboratorios Karizoo, España) y oxígeno. Se empleó 5% de isoflurano durante la inducción en cámara y 2% para el mantenimiento de la anestesia. Una vez anestesiada la rata, se afeitó la zona a intervenir y se aplicó dos veces de forma alternativa clorhexidina al 1% (Desinclor, IMARK+, España) y etanol al 70% sobre las áreas de la piel en las que

MATERIALES Y MÉTODOS

se intervino. Se hicieron dos incisiones de aproximadamente 2.5 y 1 cm en la región interescapular y la zona de piel superficial que se encuentra por encima de la vena yugular (Fig. 13A, B). Mediante disección roma se localizó y aisló la vena yugular externa derecha (Fig. 13C) y se introdujo un catéter estéril de poliuretano (C30PU-RJV1631, Instech, Alemania) de 13 cm de longitud total, 0.62 mm de diámetro interno y 1.02 mm de diámetro externo (Fig. 13D). El catéter se insertó aproximadamente hasta a llegar al nivel de la aurícula y se fijó empleando suturas. Después, se hizo pasar el catéter por un bolsillo subdérmico generado por disección roma que comunicó las regiones ventral y dorsal en las que se había realizado la incisión, y fue conectado al puerto de acceso vascular, el cual se fijó con sutura en la región interescapular (Fig. 13E).

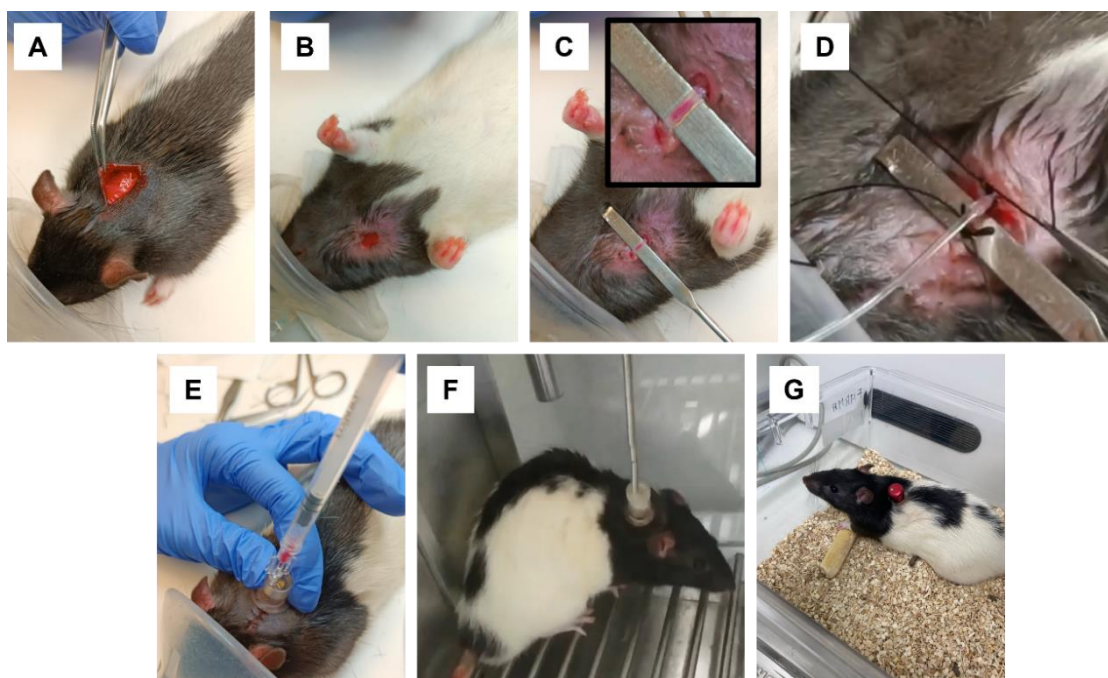


Figura 13 | Cateterización de la rata adulta macho Long Evans. (A) Incisión en la región interescapular y (B) zona superficial subdérmica sobre la vena yugular. (C) Vena yugular externa derecha aislada e (D) inserción del catéter. (E) Jeringa con adaptador empleada para el mantenimiento del catéter. (F) Rata acoplada al *tether* en la jaula de autoadministración. (G) Protección del puerto de acceso vascular con tapón magnético.

El día de la cirugía y los dos posteriores, los animales recibieron una dosis s.c. diaria de buprenorfina (0.05 mg/kg, volumen de inyección 1 mL/kg; Bupredin, C.N 585314, Le Vet Beheer B.V, Holanda) y de marbofloxacino (2 mg/kg, volumen de inyección 1 mL/kg; Marbocyl F.D, C.N 576465, Vetoquinol, España), además de recibir 7 g de comida húmeda a la que se añadió meloxicam (2.85 mL de solución por cada 100 g de comida; Meloxidyl 1.5 mg/mL, C.N 573407, Ceva Sante Animale, España). A lo largo de todos los experimentos se hizo pasar diariamente por el catéter 100 μ L de una solución que contenía heparina (30 IU/mL) (H3393, Merck, Alemania) y gentamicina (1 mg/mL) (Gentasol, C.N 571084, Labiana Life Sciences, España) con el fin de asegurar la permeabilidad del catéter y evitar infecciones (Ucha et al., 2019; You et al., 2019). Los animales tuvieron un mínimo de cinco días para recuperarse de la intervención antes de empezar otros protocolos.

3.1.3 Entrenamiento de la conducta operante con comida

Se llevó a cabo el entrenamiento de la conducta operante, es decir, del acto de pulsar las palancas para obtener un refuerzo, empleando pellets de comida estándar (Testdiet, 5TUM, EE. UU.). El objetivo de este protocolo es familiarizar a los animales con la conducta operante para obtener reforzantes usando las palancas y facilitar posteriormente la adquisición de la búsqueda de fentanilo (Bongiovanni & See, 2008).

El protocolo consistió en cinco sesiones de 1 h cada día. Los dos primeros días las sesiones se dividieron en tres etapas. En la primera, de 28 min, los animales recibieron un total de quince pellets de comida de forma no contingente (sin necesidad de presionar la palanca activa). El periodo entre refuerzos fue variable y aleatorio, con la liberación de un pellet por cada periodo de tiempo de entre 90 a 150 seg. Ante la pulsación de la palanca activa en este periodo, el animal obtuvo también un pellet, mientras que la inactiva no generó ninguna consecuencia. La administración del pellet no fue asociada a ningún estímulo condicionante, más allá del propio sonido del pellet cayendo en el receptáculo, para no inducir posibles confusiones con los estímulos que posteriormente se asociaron a fentanilo. Tras los 28 min, las palancas se retrajeron y la luz de estancia se encendió durante 3 min para señalar un cambio de paradigma. Las condiciones con el nuevo paradigma se desarrollaron durante 29 min, en los que la rata solo podía obtener los pellets de forma contingente, tras la presión de la palanca activa, en un paradigma de refuerzo FR1. No se entregaron pellets de forma no contingente. Durante los tres primeros días se empleó una restricción diaria de comida de 10 g para incentivar la conducta operante, teniendo en cuenta siempre que la disminución de peso fuera menor al 10% y que la pérdida de peso hubiera revertido previamente al inicio de la autoadministración (Buczek et al., 1999; Garcia et al., 2014).

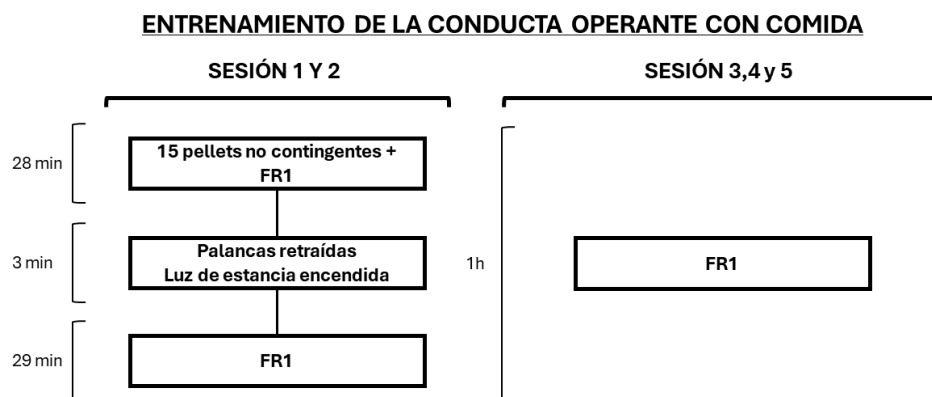


Figura 14 | Diseño experimental empleado para el entrenamiento de la conducta operante con comida. Los animales estuvieron expuestos a la restricción de comida durante los tres primeros días. FR1: refuerzo de razón fija 1.

Desde la tercera hasta la quinta sesión, los animales se expusieron a un paradigma de refuerzo de FR1 durante 1 h. Para evitar la sobreexposición al protocolo de las ratas más activas en la conducta operante (definidas como aquellas que obtenían un número de refuerzos por encima de la media de todos los individuos), estas recibían tres pellets de comida en lugar de uno por cada palanca activa. En todos los casos, el número de refuerzos otorgados total se limitó a cincuenta, al igual que con el fentanilo.

3.1.4 Fases en la conducta adictiva inducida por fentanilo y otros reforzantes

La conducta adictiva inducida se enmarcó en diferentes fases. La primera fue la adquisición. En esta, las ratas *naïve* a fentanilo se expusieron de forma inicial a la posibilidad de autoadministrarse la sustancia. En esta fase se pudo percibir cómo el animal discriminó la palanca activa e inactiva.

La siguiente fase se denomina mantenimiento y se caracterizó por un consumo de fentanilo estable. En esta etapa el animal ya conoce las propiedades reforzantes de la sustancia y cuál es la conducta requerida para recibir la dosis que desea.

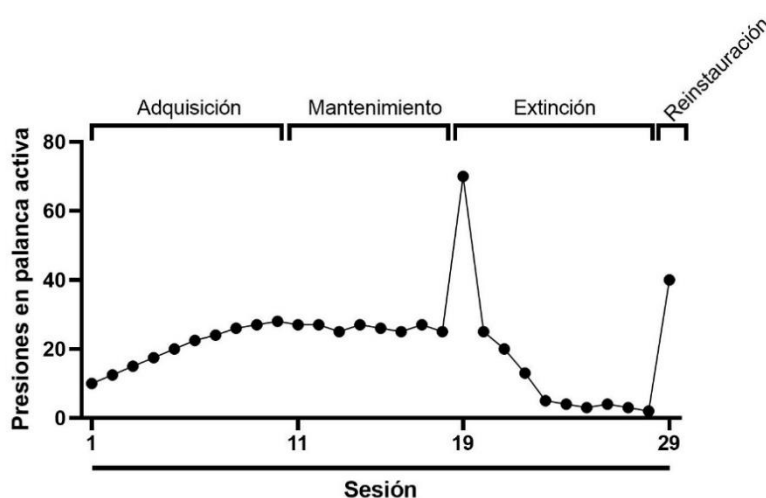


Figura 15 | Fases de la conducta adictiva inducida por fentanilo en el protocolo de autoadministración. Se muestra un número representativo de presiones sobre la palanca activa en cada una de las fases definidas, con una extensión de 11, 7, 10 y 1 sesiones de administración para adquisición, mantenimiento, extinción y reinstauración, respectivamente.

La siguiente fase se inició con la retirada por parte del experimentador del fentanilo y sus estímulos asociados, y se denomina extinción. En esta fase pudimos observar cómo inicialmente los animales sufren un pico inicial en la búsqueda de la sustancia que paulatinamente se redujo hasta niveles mínimos.

Por último, se definió la fase de reinstauración de la conducta de búsqueda, ampliamente conocida por el término inglés *reinstatement*. En esta fase se emplearon diversos estímulos para provocar que el animal volviera a buscar la sustancia reforzante. En este trabajo se emplearon los estímulos asociados a la droga (reinstauración inducida por estímulo condicionado, *cue-induced reinstatement*, CIR) o una dosis de la droga (reinstauración inducida por la droga, *drug-induced reinstatement*, DIR).

Los criterios descritos en la literatura científica para definir si un animal o grupo experimental está en una fase u otra varían ampliamente en cuanto a los parámetros a valorar y el margen de variabilidad conductual y temporal empleados. En nuestro caso utilizamos criterios de estabilidad aplicados de forma individual a cada rata. Se prefijaron unos criterios para definir la estabilidad en la adquisición de la conducta de autoadministración y paso a mantenimiento, y para la estabilidad en la extinción de la

conducta de búsqueda y paso a la reinstauración de la conducta de búsqueda o *reinstatement*.

El criterio de estabilidad para paso a mantenimiento se predefinió como una variación del número de infusiones en tres sesiones consecutivas de menos de un 20% respecto a la media móvil de las tres sesiones previas, sin presencia de tendencias positivas ni negativas (Townsend et al., 2019). La media móvil de cada día se calculó empleando los datos de las tres sesiones de autoadministración previas y fue actualizada diariamente.

Por otro lado, el criterio de estabilidad para la extinción de la conducta de búsqueda se definió como una reducción consecutiva de más del 70% en el número de pulsaciones en la palanca activa durante dos días, en comparación con los niveles basales de búsqueda de fentanilo, es decir, la media de los últimos tres días en los que consumieron fentanilo. Además, se estableció un periodo mínimo de cinco días para llegar a este criterio (Justinova et al., 2013; Zhan et al., 2018).

3.2 Estudios realizados

3.2.1 Aversión de lugar condicionado

El objetivo de este estudio fue evaluar el posible efecto de Ro 61-8048 en el desarrollo de la expresión de aversión de lugar condicionado (CPA) inducida por naloxona en animales dependientes de fentanilo. Para este experimento se emplearon cuatro grupos de animales que recibieron fentanilo o su control (solución salina 0.9% NaCl), y Ro 61-8048 o su control, que denominaremos vehículo (Veh).

El equipo de CPA estaba formado por tres compartimentos unidos por un área intermedia triangular que daba acceso a todos ellos (40x35x35 cm por compartimento). Cada uno de los compartimentos presentaba estímulos visuales y táctiles característicos para que fuera distinguible para los animales. Los tres compartimentos estaban situados en un ángulo de 120° uno respecto a otro (López-Moreno et al., 2004).

El protocolo experimental se llevó a cabo en ocho días. El objetivo del protocolo durante los dos primeros días fue generar dependencia a los animales que recibieron fentanilo. Así, los animales recibieron dos inyecciones de fentanilo s.c. de 50 µg/kg separadas por 8 h, o bien la dosis isovolumétrica de solución salina.

El tercer día, además de recibir las dos dosis de fentanilo como en los días anteriores, se realizó una sesión de precondicionamiento. En este procedimiento, se permitió que el animal explorara el equipo durante 15 min, 4 h después de recibir la primera dosis diaria de fentanilo o solución salina. Se evaluó el tiempo que el animal pasaba en cada uno de los tres compartimentos para excluir aquel en el que los animales pasaran un tiempo anómalo (C) y asignar uno de los otros dos restantes (A o B) a la naloxona. La exclusión del compartimento (C) se hizo atendiendo al hecho de que el tiempo pasado en este fuera significativamente diferente del pasado en los otros dos compartimentos.

Entre los días 4 y 7 se realizó el condicionamiento de los animales. Los días 4 y 6 los individuos recibieron fentanilo o salino como era habitual, y 4 h después de la primera dosis se les confinó durante 30 min en un compartimento (A) del equipo CPA, el cual asociaron a fentanilo o salino.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los días 5 y 7, sin embargo, se procedió a condicionar a los animales con naloxona o su vehículo al compartimento restante no asociado a fentanilo o salino. Las ratas recibieron salino o fentanilo, al igual que en días previos, pero 1 h antes de colocarlas en el equipo recibieron una dosis de Ro 61-8048 o vehículo, y justo antes de ser confinadas en el compartimento (B) una dosis de naloxona (1 mg/kg i.p.) para provocar abstinencia en los animales dependientes de fentanilo.

En el último día, se dejó a los animales explorar la totalidad de los compartimentos durante 30 min y se evaluó el número de entradas y tiempo que los animales pasaron en el compartimento condicionado con naloxona para evaluar si el tratamiento con Ro 61-8048 tuvo algún efecto en el desarrollo de la aversión condicionada de lugar.

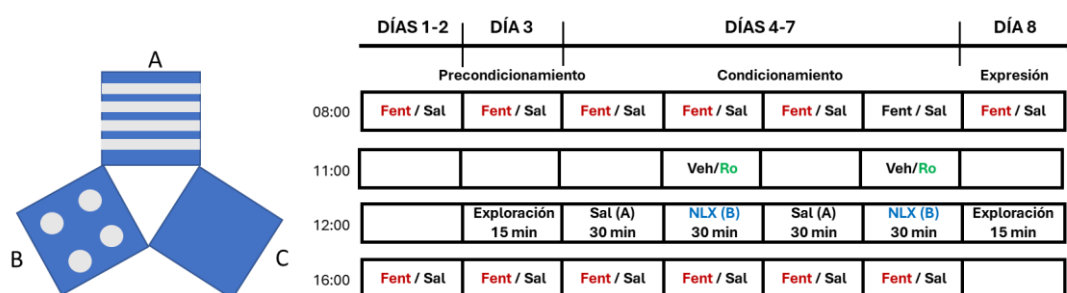


Figura 16 | Esquema del equipo y diseño experimental de la aversión condicionada de lugar. Los días 4 y 7 se desarrolló el condicionamiento inducido por naloxona mediante el confinamiento en determinado compartimento (B) asociado a la misma con o sin previo tratamiento con Ro 61-8048 (100 mg/kg i.p.). Se valoró en el día 8 la expresión de la aversión en los animales mediante la exploración de la totalidad del aparato.

3.2.2 Modelo de autoadministración de fentanilo: elección de la dosis por infusión de fentanilo y Ro 61-8048

El experimento piloto para la autoadministración de fentanilo duró cinco semanas. Basándose en bibliografía se seleccionaron cuatro dosis de fentanilo: 0.32, 1.0, 3.2 y 10 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{infusión}$ (Townsend et al., 2019). Por la experiencia previa en un modelo no contingente y en aras de las tres R's de la experimentación animal, procedimos a emplear las dosis de 0.32 y 10 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{infusión}$ en un total de diez animales. Se emplearon estrategias usadas clásicamente en el condicionamiento operante para favorecer la adquisición de la conducta operante, como son la restricción de comida, la entrega de una dosis no contingente de fentanilo al iniciar la sesión de autoadministración, conocida como *priming dose* y la incentivación de la conducta de búsqueda colocando comida sobre la palanca activa (Mavrikaki et al., 2017). Tras comprobar que en estas condiciones no se lograba la adquisición en el tiempo y forma referidos en la literatura científica usando las dosis extremas, decidimos cambiar los grupos a las otras dosis por infusión: 1.0 y 3.2 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{infusión}$.

Una vez la conducta de autoadministración cumplió el criterio establecido de estabilidad para pasar a mantenimiento empleando la dosis de 3.2 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{infusión}$, procedimos a evaluar la dosis efectiva y el momento de administración de Ro 61-8048, seleccionando en base a la bibliografía dos dosis: 50 y 100 mg/kg (Gil de Biedma-Elduayen et al., 2022; Giménez-Gómez et al., 2018; Justinova et al., 2013; Richter & Hamann, 2003; Secci et al., 2017, 2019; Zakhary et al., 2020). Se comprobó el efecto de Ro 61-8048 en el mantenimiento de la autoadministración de fentanilo, empleando el inhibidor de KMO a

las dosis de 50 y 100 mg/kg, administradas vía i.p. 30 min o 1 h antes de la sesión de autoadministración, dejando periodos de lavado entre tratamientos, y también se comprobó el efecto de dos dosis consecutivas a lo largo de dos días.

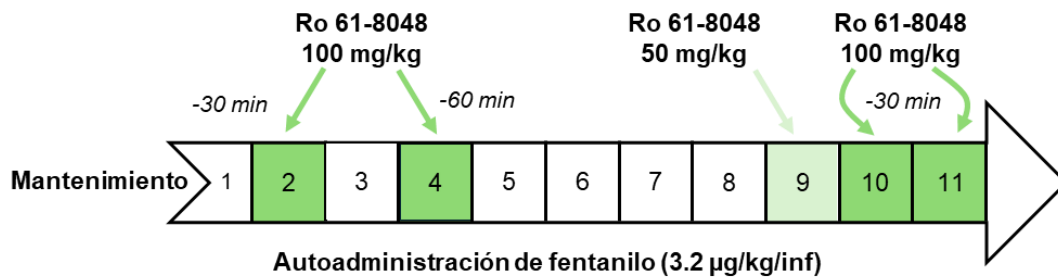


Figura 17 | Diseño experimental del experimento destinado a la elección de dosis efectiva de Ro 61-8048. Una vez los animales mostraron un consumo de fentanilo estable (mantenimiento), se administró Ro 61-8048 vía i.p. 30 o 60 min antes de la sesión de autoadministración.

3.2.3 Efecto de Ro 61-8048 en la adquisición, mantenimiento, extinción y reinstauración inducida por fentanilo y estímulo condicionado

La evaluación del efecto de Ro 61-8048 en las diferentes fases de la conducta adictiva se realizó en diferentes experimentos. En algunos de estos se emplearon los mismos animales para evaluar diferentes fases o tratamientos. En la Figura 18 se encuentra detallado el ciclo experimental de diferentes grupos de animales. Para facilitar la comprensión del lector, los estudios se mostrarán en orden cronológico en cuanto al desarrollo de la conducta adictiva.

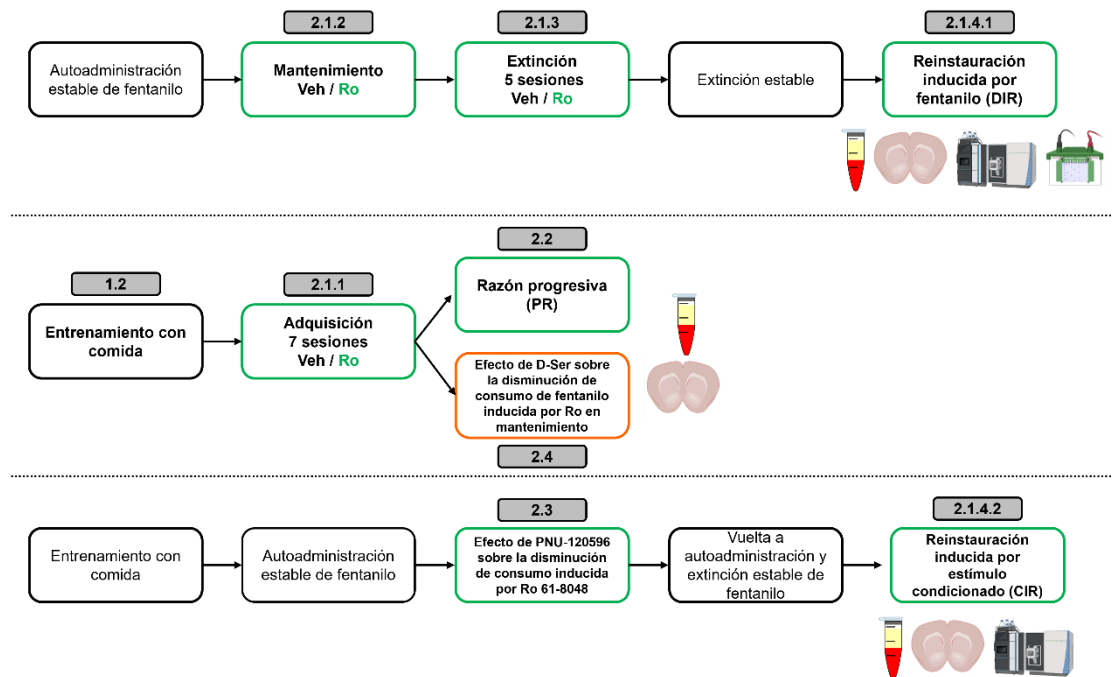


Figura 18 | Ciclo experimental de grupos de animales que no son detallados en su correspondiente sección. Las líneas discontinuas indican el empleo de diferentes grupos de animales de experimentación. Los símbolos mostrados al final de la experimentación simbolizan el sacrificio y el uso de muestra de (por orden de aparición) plasma o *nucleus accumbens* (NAcc) para su uso en UPLC-MS/MS o western blot. Los cuadros grises representan la sección con los resultados asociados.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se estudió en primer lugar el efecto de Ro 61-8048 en la **adquisición** de la autoadministración operante de fentanilo. Sometimos a los animales al protocolo de entrenamiento de la conducta operante con comida para facilitar la posterior adquisición de la conducta de búsqueda de fentanilo. Según la conducta que mantuvieron en el entrenamiento con comida, se distribuyeron en los dos grupos vehículo o Ro 61-8048 de forma homogénea y pseudoaleatoria. Durante los primeros siete días, los animales *naive* a fentanilo se pretrataron con Ro 61-8048 o su vehículo e introdujeron en las cámaras de autoadministración de fentanilo. La adquisición en ausencia de tratamiento con Ro 61-8048 prosiguió hasta llegar al criterio de estabilidad para determinar un posible efecto en la latencia hasta autoadministración estable.

Seguidamente, se evaluó el efecto de Ro 61-8048 en la fase de **mantenimiento** empleando animales que cumplieron el criterio de estabilidad de consumo de fentanilo en adquisición. Cada uno de los animales fue asignado al grupo de tratamiento o control de forma equilibrada entre grupos en base a su conducta de autoadministración de fentanilo en fase de adquisición. Concretamente, para distribuir a los animales en grupos, se utilizó el promedio de las pulsaciones en la palanca activa durante las tres últimas sesiones previas al ensayo de mantenimiento. Los animales recibieron Ro 61-8048 en la sesión inmediatamente posterior al cumplimiento del criterio de estabilidad y fueron introducidos en las cámaras de autoadministración.

Para estudiar el efecto de Ro 61-8048 sobre la **extinción** de la conducta de búsqueda de fentanilo empleamos animales dependientes de fentanilo, los cuales habían cumplido criterio de estabilidad para su consumo. Los animales fueron asignados al grupo de tratamiento o control según el promedio del número de pulsaciones en la palanca activa obtenidas en las tres sesiones previas al inicio de la extinción. En la sesión inmediatamente posterior al cumplimiento del criterio de estabilidad en mantenimiento, iniciamos la fase de extinción al sustituir la solución de fentanilo por solución salina y utilizar un programa de autoadministración en el que la pulsación de la palanca activa solo conllevara la infusión de una dosis de salino de 80 μ L, sin la presentación del estímulo condicionado asociado. Se administró Ro 61-8048 antes de cada una de las cinco primeras sesiones de extinción, mientras que el resto de las sesiones se desarrollaron sin administrar ningún compuesto. El paradigma de extinción se desarrolló hasta el cumplimiento del criterio de estabilidad en extinción para evaluar un posible efecto del compuesto en el tiempo que los animales tardan en extinguir la conducta de búsqueda de fentanilo.

Con el fin de estudiar el efecto de Ro 61-8048 sobre la **reinstauración** de la conducta de búsqueda de fentanilo, realizamos dos estudios empleando diferentes estímulos para que los animales volvieran a mostrar la conducta de búsqueda que se había extinguido. En ambos casos se emplearon animales que habían cumplido previamente criterios de estabilidad en mantenimiento y extinción, es decir, que eran dependientes de fentanilo y habían extinguido su conducta de búsqueda por el mismo. Los animales fueron distribuidos de forma homogénea y pseudoaleatoria en los grupos de tratamiento y control teniendo en cuenta la conducta de autoadministración en cuanto a presiones en la palanca activa obtenidas de media en las dos sesiones inmediatamente anteriores al cumplimiento del criterio de estabilidad en extinción. En la sesión inmediatamente posterior a aquella

en la que se cumplió el criterio de extinción, los animales se expusieron a los estímulos que iban a inducir el restablecimiento de la conducta de búsqueda.

En el modelo de reinstauración de la conducta de búsqueda inducida por fentanilo (*drug-induced reinstatement*; DIR) los animales recibieron la dosis de Ro 61-8048 30 min antes del inicio de la sesión de autoadministración. Inmediatamente antes del inicio de la sesión, se administró una dosis de fentanilo s.c. de 50 µg/kg y se introdujo a los animales en las jaulas de autoadministración en condiciones idénticas a las que habían sido expuestas en fase de extinción, es decir, la palanca activa conllevaría la obtención de una dosis de salino (80 µL) sin ningún tipo de estímulo visual o auditivo, y la pulsación de la palanca inactiva no tendría ningún efecto.

En otro grupo de animales se evaluó el efecto de Ro 61-8048 en la reinstauración de la conducta adictiva inducida por estímulo condicionado (*cue-induced reinstatement*; CIR). En este modelo, los animales recibieron la dosis de Ro 61-8048 30 min antes del inicio de la sesión de autoadministración. Se introdujo a los animales en las jaulas y se les expuso inicialmente de forma no contingente al estímulo condicionado previamente asociado a fentanilo. Posteriormente, cada presión de la palanca activa conllevó la exposición al estímulo condicionado (luz y tono) y una infusión de salino. La palanca inactiva no generó ninguna consecuencia como es habitual.

Los animales fueron sacrificados por decapitación inmediatamente después de los experimentos de reinstauración de la conducta de búsqueda (2 h tras el inicio de la sesión de autoadministración, 2.5 h tras la administración de Ro 61-8048 o su vehículo).

3.2.4 Efecto de la modulación de $\alpha 7$ nAChR y NMDAR sobre la disminución del consumo de fentanilo inducida por Ro 61-8048

Se llevó a cabo un experimento para evaluar el efecto de la modulación de los receptores $\alpha 7$ nACh, (administrando PNU-120596) y de los receptores NMDA (administrando D-Ser) sobre la reducción del consumo de fentanilo inducida por Ro 61-8048.

Los animales fueron sometidos al protocolo habitual de entrenamiento con comida y autoadministración de fentanilo hasta cumplir el criterio de estabilidad en mantenimiento. Llegados a este punto, repartimos a los animales en cuatro grupos de forma homogénea y pseudoaleatoria en cuanto al número promedio de infusiones en las tres sesiones previas a la prueba. Estos cuatro grupos recibirían: PNU-120596 + Ro 61-8048, PNU-120596 + Veh (de Ro 61-8048), Veh (de PNU-120596) + Ro 61-8048, Veh + Veh. Ro 61-8048 se administró 30 min antes del inicio de la sesión de mantenimiento, mientras que el PNU-120596 se administró 1 h antes del inicio de la sesión.

Los datos de un experimento piloto mostraron que el efecto era altamente variable, por lo que decidimos seguir un diseño cruzado: los animales recibieron dos tratamientos de forma contrabalanceada pasando por un periodo intermedio tras el primer tratamiento en el que les permitimos volver a cumplir el criterio de estabilidad de consumo de fentanilo, y volvimos a tratar con la combinación de compuestos opuesta a la administrada inicialmente, es decir, correlativamente: Veh + Veh, Veh (de PNU-120596) + Ro 61-8048, PNU-120596 + Veh (de Ro 61-8048), PNU-120596 + Ro 61-8048 (Fig. 19A).

MATERIALES Y MÉTODOS

En otro grupo de animales, evaluamos el efecto de D-Ser sobre la disminución de consumo de fentanilo inducida por Ro 61-8048 en la fase de mantenimiento (Fig. 19B). En este caso, empleamos animales que fueron sometidos al entrenamiento con comida y adquisición de la conducta de autoadministración de fentanilo. Tras el cumplimiento del criterio de estabilidad en mantenimiento, los animales se distribuyeron en dos grupos homogéneos según su conducta de autoadministración representada por el número medio de infusiones obtenidas en las tres sesiones previas a la sesión de tratamiento: D-Ser + Ro 61-8048 o Veh + Ro 61-8048. Los tratamientos se administraron 60 y 30 min antes del inicio de la sesión de autoadministración de fentanilo, respectivamente. Los animales fueron sacrificados por decapitación inmediatamente después de la sesión de autoadministración.

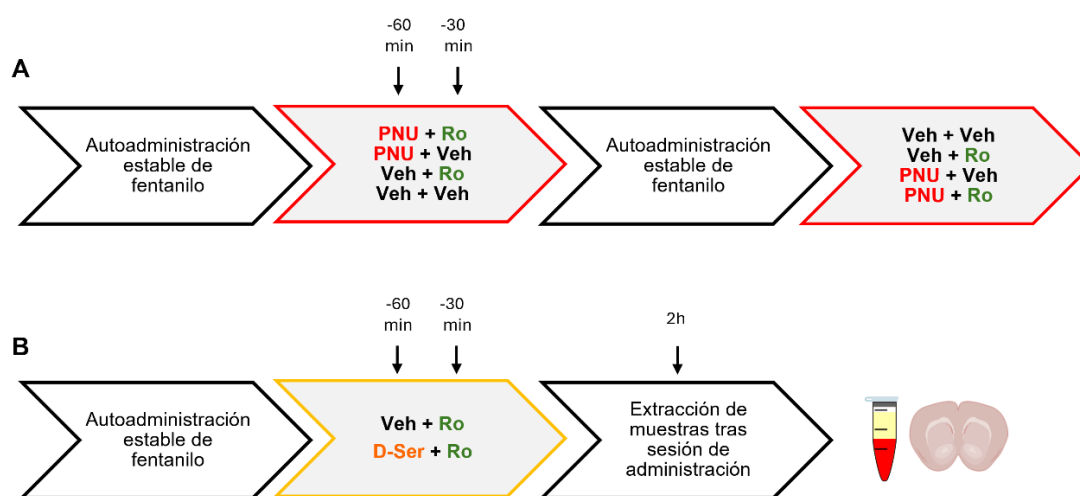


Figura 19 | Diseño experimental empleado para analizar el efecto de (A) PNU-120596 (PNU, 8 mg/kg i.p.) y (B) D-Serina (D-Ser, 800 mg/kg i.p.) sobre la disminución de consumo de fentanilo inducida por Ro 61-8048 (Ro). (A) Se realizó un diseño contrabalanceado y cruzado con tratamientos en fase de mantenimiento de autoadministración de fentanilo. (B) Se realizó un único tratamiento con D-Ser y Ro 61-8048 y se obtuvieron muestras de plasma y NAcc tras finalizar la sesión de autoadministración.

3.2.5 Efecto de la autoadministración de fentanilo, Ro 61-8048 y la fase de la conducta adictiva en los metabolitos de la KynP

Se realizó un experimento para valorar posibles diferencias en los metabolitos de la KynP derivados de la historia de autoadministración de fentanilo, la fase de la conducta adictiva y el tratamiento con Ro 61-8048. Este experimento se distingue de los demás por haberse realizado con un esquema cerrado en cuanto a la duración de las diversas fases del comportamiento adictivo, basado en experimentos previos, y por haber tenido sesiones de 1 h de duración para obtener un tamaño muestral más amplio. Este tamaño muestral mayor deriva de la inclusión de dos grupos adicionales a los habituales, teniendo en este experimento un total de seis grupos en base a (1) la autoadministración de fentanilo o su control, salino; (2) el tratamiento con Ro 61-8048 o su vehículo; y (3) la fase en la que obtuvimos las muestras, extinción o reinstauración.

En primer lugar, como es habitual se realizó la cateterización y entrenamiento con comida de todas las ratas. Posteriormente, iniciamos el protocolo con diseño cerrado, es decir, con la duración de las fases de autoadministración previamente definidas: veintidós sesiones de adquisición, catorce de extinción y una última donde se llevó a cabo de la

prueba de reinstauración y el sacrificio (2.5 h tras la administración de Ro 61-8048) por perfusión bajo anestesia terminal con pentobarbital (120 mg/kg i.p., Dolethal, Vetoquinol, España) para obtener muestras de plasma y cerebro para futuros estudios de inmunofluorescencia (estos últimos no mostrados en la presente Tesis Doctoral). Obtuvimos un total de seis grupos experimentales. Cuatro grupos de animales autoadministraron fentanilo y recibieron vehículo o Ro 61-8048, bien en el día 1 de la fase de extinción o bien tras ser sometidos a la reinstauración por estímulo condicionado. En sucesivos apartados nos referimos a estos últimos animales como animales con una historia de autoadministración de fentanilo. Los dos grupos restantes cuentan con los animales control, que estuvieron expuestos a autoadministración de salino durante todo el protocolo y fueron sacrificados tras la prueba de reinstauración inducida por estímulo condicionado habiendo sido pretratados con Ro 61-8048 o su vehículo.

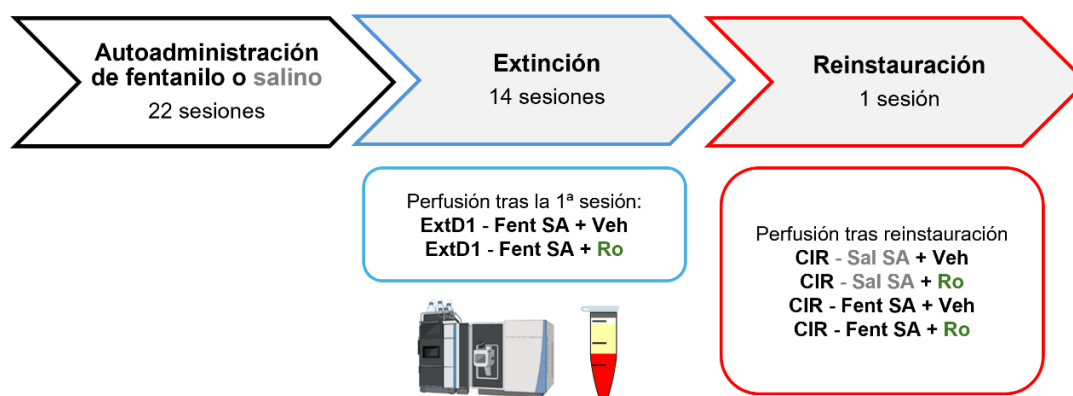


Figura 20 | Diseño experimental empleado para estudiar el efecto de la autoadministración de fentanilo y/o el pretratamiento con Ro 61-8048 sobre la concentración de metabolitos de la KynP en plasma de animales sacrificados en fase de extinción o reinstauración inducida por estímulo condicionado. Los animales fueron sacrificados 2.5 h tras el tratamiento con Ro 61-8048 mediante perfusión tras la primera sesión de extinción (ExtD1) o la reinstauración inducida por estímulo condicionado (CIR). El plasma se empleó para el análisis de metabolitos de la KynP por UPLC-MS/MS.

3.2.6 Efecto de Ro 61-8048 sobre la autoadministración de fentanilo en un paradigma de razón progresiva

Los animales fueron expuestos al protocolo de entrenamiento de la conducta operante con comida y a la adquisición de la autoadministración de fentanilo hasta cumplir el criterio de estabilidad de consumo de fentanilo en la fase de mantenimiento. Después, se cambió el paradigma de refuerzo por uno de razón progresiva (PR). Con este paradigma el número de veces que el animal ha de presionar la palanca activa para conseguir una dosis de fentanilo va aumentando de forma exponencial según van aumentando las dosis ya obtenidas. Con este paradigma se evaluó el parámetro denominado *breakpoint* o punto de quiebre, el cual se define como la máxima carga de trabajo, representada por el número de pulsaciones en la palanca activa necesarias para obtener una dosis de fentanilo antes de que el animal pase un periodo de 1 h sin lograr obtener una dosis. En la presente Tesis Doctoral se representará como *breakpoint* la última ratio completada que implicó la obtención de una infusión de fentanilo. Se consideró que los animales mostraban un comportamiento estable cuando el número de incrementos o disminuciones de la ratio no varió en más de dos niveles durante tres sesiones consecutivas. La sesión finalizó cuando los animales no consiguieron obtener una dosis en el periodo de 1 h o tras un tiempo

máximo de 5 h, criterio que no se llegó a producir nunca (You et al., 2019). Los animales fueron sacrificados por decapitación inmediatamente después de finalizar la segunda sesión de autoadministración en la que recibieron tratamiento, dado que llevamos a cabo un diseño cruzado. Esto quiere decir que los individuos recibieron un primer tratamiento (Veh o Ro 61-8048) en la sesión inmediatamente posterior a aquella en la que mostraron por primera vez un comportamiento estable. Luego, se les permitió entrar en la cámara de autoadministración tantas sesiones como fueran necesarias, hasta que mostraron un comportamiento estable por segunda vez. En la sesión inmediatamente posterior, se administró el tratamiento alternativo (Ro 61-8048 o Veh) al anterior.



Figura 21 | Diseño experimental empleado para estudiar el efecto de Ro 61-8048 (Ro) sobre la autoadministración de fentanilo con paradigma de ratio progresivo (PR). FR1: razón fija 1 (*fixed ratio 1*). Los animales que recibieron Veh en el primer tratamiento tras mostrar autoadministración estable de fentanilo con el paradigma de refuerzo PR, recibieron tras recuperar la autoadministración estable el tratamiento con Ro 61-8048(100 mg/kg, i.p.), y viceversa. Los animales se sacrificaron tras el segundo tratamiento.

3.2.7 Efecto de Ro 61-8048 sobre reforzantes naturales

3.2.7.1 Efecto de Ro 61-8048 sobre la autoadministración oral de sacarosa

Se llevó a cabo en primer lugar el entrenamiento de la conducta operante empleando pellets de comida. Una vez realizado este entrenamiento, se expuso a los animales a la autoadministración de pellets de sacarosa de 45 mg (Testdiet, 5TUT, EE. UU.). Esta se dio de forma similar a la autoadministración de fentanilo, es decir, con un paradigma FR1, un periodo inactivo de 4.6 seg y el estímulo condicionado asociado consistente en la presentación de luz y tono. La única diferencia con respecto al protocolo con fentanilo fue la limitación del número de refuerzos, 150 en este caso.

Una vez los animales mostraron una conducta estable según el criterio de estabilidad en mantenimiento previamente definido, se evaluó el efecto de Ro 61-8048 en esta fase. Para aumentar la toma de medidas en este experimento, utilizamos un diseño cruzado y contrabalanceado. Los animales fueron asignados a dos grupos de tratamiento de forma homogénea y pseudoaleatoria según el número medio de respuesta sobre la palanca activa en las tres sesiones inmediatamente anteriores a la sesión de tratamiento. Las ratas fueron tratadas dos veces en mantenimiento, una de ellas con Ro 61-8048 y otra con vehículo. Entre un tratamiento y el otro dejamos a los individuos volver a cumplir el criterio de estabilidad.

Posteriormente, los animales pasaron a fase de extinción, donde la pulsación de ambas palancas no condujo a ningún tipo de contingencia. Una vez se cumplió el criterio de estabilidad en extinción, se expuso a los animales a los estímulos previamente asociados al refuerzo con sacarosa y se evaluó el efecto del pretratamiento con Ro 61-8048. Una vez más, para obtener más datos, se realizó un diseño cruzado, siendo cada animal tratado en dos momentos diferentes con Ro 61-8048 o su vehículo. Entre estos dos tratamientos se permitió al animal volver a cumplir los criterios de estabilidad en extinción (reextinción). Inmediatamente tras realizar la segunda prueba de reinstauración de la conducta adictiva se procedió al sacrificio por decapitación de los animales.

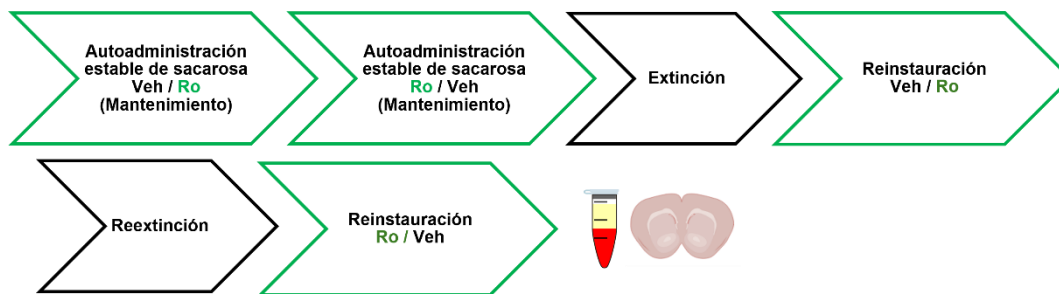


Figura 22 | Diseño experimental empleado para estudiar el efecto de Ro 61-8048 en el mantenimiento y la reinstauración inducida por estímulo condicionado en animales sometidos a autoadministración oral de pellets de sacarosa. Los tratamientos fueron cruzados y contrabalanceados, es decir, los animales que recibieron Veh en el primer tratamiento en mantenimiento recibieron Ro 61-8048 (100 mg/kg i.p.) en el segundo mantenimiento, tras volver a cumplir el criterio de estabilidad. La mitad de los animales en cada uno de estos mantenimientos fueron tratados con Veh, y la otra mitad con Ro 61-8048. Los animales se sacrificaron tras la segunda prueba de reinstauración.

3.2.7.2 Efecto de Ro 61-8048 sobre la autoadministración de comida

La metodología de este experimento fue idéntica a la anterior, con la excepción de la limitación de refuerzos en 200 unidades y que la presencia de estímulo condicionado (sonido y luz) asociado a los pellets de comida (TestDiet 45 mg, 5TUM) estuvo presente desde el entrenamiento de la conducta operante, en la que usamos la misma comida. Sí cabe mencionar que, dado el reducido poder reforzante de la comida empleada, los criterios de estabilidad en mantenimiento no llegaron a cumplirse, pasando los animales a fase de extinción tras treinta y seis sesiones de autoadministración. Tras cumplir el criterio de extinción, los animales fueron expuestos al pretratamiento con Ro 61-8048 o el vehículo y la prueba de reinstauración de la conducta de búsqueda inducida por estímulo condicionado. Se les permitió volver a cumplir el criterio de estabilidad en extinción para que pudieran ser tratados con el compuesto que no recibieron en la anterior prueba, es decir, empleamos un diseño cruzado y contrabalanceado. Los animales fueron asignados a los grupos vehículo o Ro 61-8048 de forma homogénea y pseudoaleatoria, sin que existan diferencias en ambos en cuanto a obtención de refuerzos de forma estable o conducta de búsqueda en mantenimiento y extinción, respectivamente.



Figura 23 | Diseño experimental empleado para estudiar el efecto de Ro 61-8048 en la reinstauración inducida por estímulo condicionado en animales sometidos a autoadministración oral de pellets de comida. Los tratamientos fueron cruzados y contrabalanceados, es decir, los animales que recibieron Veh en el primer tratamiento en reinstauración recibieron Ro 61-8048 (100 mg/kg i.p.) en la segunda reinstauración, tras volver a cumplir criterio de estabilidad en extinción. La mitad de los animales en cada uno de estos mantenimientos fueron tratados con Veh, y la otra mitad con Ro 61-8048.

3.2.8 Efecto de Ro 61-8048 sobre la actividad locomotora

3.2.8.1 Prueba de campo abierto

La prueba de campo abierto se empleó para evaluar posibles efectos en la actividad locomotora y en la conducta exploratoria indicativa de ansiedad en animales *naive* a fentanilo expuestos a Ro 61-8048.

MATERIALES Y MÉTODOS

El procedimiento se llevó a cabo en un compartimento de metacrilato gris de un tamaño de 90x90x60 cm. Los animales se introdujeron en el centro de este equipo y se les permitió explorar durante un periodo de 30 min. La actividad exploratoria fue grabada en video de tal forma que pudo ser analizada cuantitativa- y cualitativamente: actividad locomotora total del animal y la ubicación dentro del aparato donde se movían los animales, respectivamente. Con este fin, el aparato se dividió virtualmente para el análisis en dieciséis cuadrículas de 22.5 cm², constituyendo la región central del aparato las cuatro cuadrículas centrales, y la región periférica el resto (Swiergiel & Dunn, 2007). Estos parámetros se cuantificaron empleando el software AnyMaze (Stoelting Europe, Ireland).

Los animales fueron aclimatados al aparato y el procedimiento durante tres sesiones de 30 min, una al día. Recibieron además 30 min antes de cada sesión una inyección simulada, es decir, el mismo procedimiento de sujeción, retención y punción que se desarrolla en una administración i.p, pero sin inyectar ninguna sustancia. Las sesiones de aclimatación al aparato fueron grabadas para tomar medidas basales y asignar a los animales a los grupos vehículo o Ro 61-8048 de forma homogénea en cuanto a su actividad locomotora total. Este proceso de aclimatación se realizó con el fin de aislar el componente novedoso y aversivo de esta prueba de la posible alteración en actividad locomotora inducida por Ro 61-8048.

El día de la prueba, se administró el tratamiento correspondiente, Ro 61-8048 o vehículo, y se introdujeron las ratas en las cámaras 30 min después para monitorizar por video su actividad durante un total de 30 min.

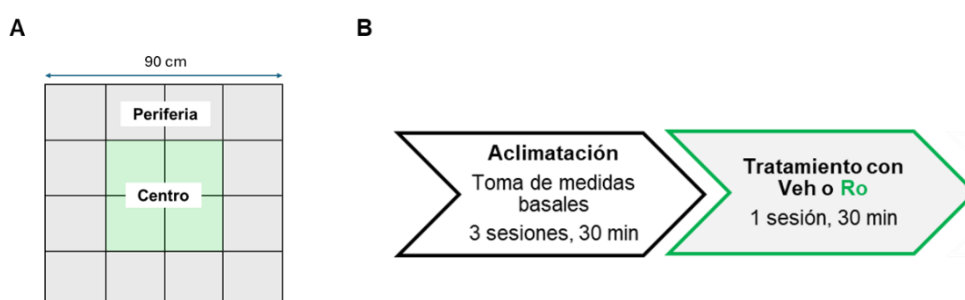


Figura 24 | (A) Esquema del equipo empleado en la prueba de campo abierto (*open field*) y (B) diseño experimental empleado.

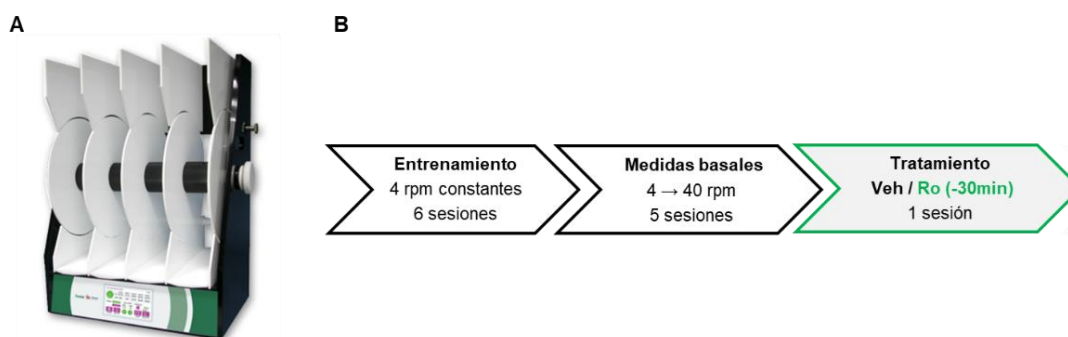
3.2.8.2 Prueba de *Rotarod*

Se llevó a cabo la prueba de *Rotarod* (LE8505, Panlab, España) para evaluar potenciales efectos motores y la influencia en la conducta motora dirigida (Douton et al., 2022; Voigt et al., 2014) inducidos por Ro 61-8048 en animales *naïve* a fentanilo. El cilindro empleado tenía un diámetro de 60 mm y la caída desde el mismo era de 21.5 cm. La anchura del carril en el que estaba cada rata era de 75 mm, y a pesar de tener cuatro carriles disponibles, empleamos solos dos de ellos para mantener distancia entre los individuos y que no interaccionasen. El cilindro estaba rodeado por una pieza de metacrilato que les impedía la movilidad hacia arriba. El dispositivo cuenta con unos resortes que nos permiten cuantificar la latencia del animal a la hora de caer. Los animales se aclimataron a la sala donde se llevó a cabo el experimento un mínimo de 30 min.

En primer lugar, las ratas fueron sometidas al entrenamiento en el aparato con el cilindro rotando de forma constante a 4 rpm durante 5 min. Si la rata se caía del cilindro, se le volvía a poner sobre el mismo hasta que acabaran los 5 min. Este procedimiento se llevó a cabo tres veces al día durante dos días.

Posteriormente, cuando las ratas sabían cómo mantenerse en el *Rotarod*, tomamos medidas basales con el cilindro programado para que la velocidad incremente de forma uniforme desde 4 a 40 rpm en un lapso de 5 min. Se realizaron cinco sesiones de toma de medidas basales. Cada una de las sesiones constó de tres medidas capturadas con un tiempo mínimo de 15 min entre ensayos. Se emplearon los valores promedio de las últimas cuatro sesiones para definir la latencia basal.

En la última sesión, los animales fueron tratados con Ro 61-8048 o su vehículo 30 min antes de iniciar la prueba de *Rotarod*. Se tomaron medidas de la latencia de caída en los siguientes tiempos tras el inicio del test: 0, 15, 30 min.



3.2.9 Interacción entre el modelo de dolor neuropático *spared nerve injury*, la autoadministración de fentanilo y Ro 61-8048

Dada la relevancia y prevalencia del dolor neuropático y el uso de opioides para su tratamiento, se evaluó si Ro 61-8048 tenía algún efecto sobre ratas sometidas a un modelo de dolor neuropático y autoadministración de fentanilo.

Una vez las ratas estaban habituadas a las instalaciones y a los investigadores, fueron sometidas al entrenamiento de la conducta operante empleando comida. Para poder validar el modelo de dolor neuropático, se tomaron medidas basales del umbral de respuesta nociceptiva ante estímulos mecánicos empleando filamentos de Von Frey. Estas medidas fueron tomadas en dos ocasiones: una semana y un día antes de la operación para generar el modelo de dolor neuropático. En todos los casos los animales fueron aclimatados al entorno de la medida durante un mínimo de 20 min.

Las medidas de la alodinia mecánica se tomaron aplicando los filamentos graduados (UB-37450-27, Ugo Basile, Italia) (Fig. 27D) de forma perpendicular a la región plantar lateral de ambas extremidades posteriores del animal (Fig. 27A). Los animales se situaron sobre una rejilla metálica dentro de un habitáculo de 22 x 16.5 x 14 cm (Fig. 27B, C). Se emplearon los filamentos de menor a mayor fuerza de forma consecutiva (entre 0.16 y 26 g), considerando como respuesta positiva el levantamiento brusco o lamido de la pata. Con cada uno de los filamentos se realizaron cinco aplicaciones, considerando como valor

MATERIALES Y MÉTODOS

umbral aquel para el cual se dieron tres respuestas positivas (Deuis et al., 2017; Rodríguez-Rivera et al., 2020). Esta prueba fue realizada inmediatamente antes y después de la sesión de autoadministración siempre por el mismo experimentador que desconocía a que grupo experimental pertenecían los animales.

El modelo de dolor neuropático empleado se denomina *spared nerve injury* (SNI) (Decosterd & Woolf, 2000). Brevemente, se indujo y mantuvo el plano anestésico con isoflurano. Se realizó una incisión a nivel del bíceps femoral izquierdo, exponiendo así el nervio ciático con sus tres ramas terminales: sural, común peroneal y tibial. Las ramas común peroneal y tibial fueron ligadas y axotomizadas, mientras que la rama sural permaneció intacta. Este modelo genera alodinia mecánica en la región lateral de la pata intervenida de forma reproducible durante seis meses. Además de los animales sometidos al modelo, se realizó una cirugía simulada en otros animales (*sham*), en los que únicamente se expuso el nervio ciático para tener un control de la intervención quirúrgica.

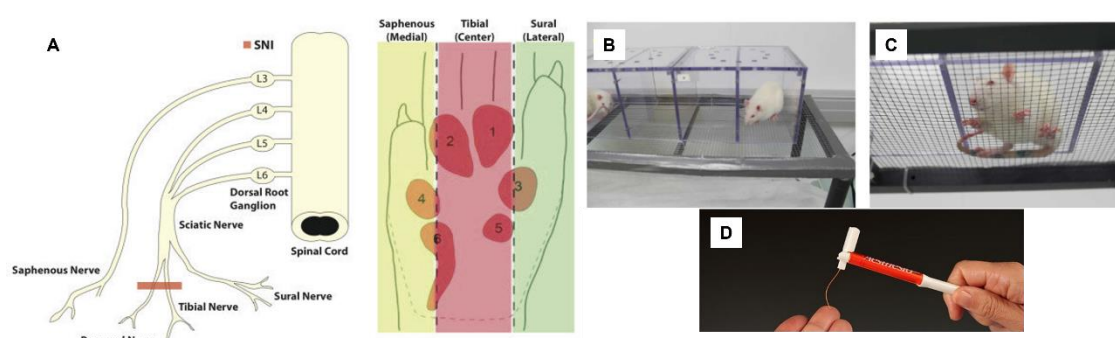


Figura 26 | (A) Esquema de la lesión producida por el modelo SNI y la región de la pata afectada. Imágenes representativas de ratas en la rejilla y compartimento (B,C) y filamento de Von Frey (D). La intervención consistió en la ligadura y sección de los nervios común peroneal y tibial, dejando intacta la rama sural del nervio ciático. Esta lesión produjo hipersensibilidad en la región inervada por la rama sural del nervio ciático, es decir, la región lateral de la pata ipsilateral a la lesión. Imágenes (B) y (C) obtenidas de Duraku et al., 2012 y Ferrier et al., 2016.

Para validar que el modelo había generado de forma adecuada la alodinia mecánica, se realizó el test de Von Frey cinco días después de la operación. Si en este último punto temporal el animal no presentaba alodinia, no se incluyó en el estudio (Pertin et al., 2012). Se valoró la alodinia mecánica en los animales que continuaron en el estudio antes y después de la sesión de autoadministración en el primer día de acceso a fentanilo (día 14 tras SNI), el décimo día de acceso a fentanilo (día 24 tras SNI) y el día de reinstauración de la conducta adictiva inducida por estímulo condicionado (día 46 tras SNI). Se administró Ro 61-8048 vía i.p. 30 min antes del inicio de la sesión de autoadministración en el día 24 y 46 tras SNI, es decir, en momentos análogos a las fases de mantenimiento y reinstauración.

A los seis días de recuperación quirúrgica tras el SNI, sometimos a los animales a la cateterización de la vena yugular como se describió anteriormente. En ambas cirugías, los animales recibieron una dosis s.c. diaria de carprofeno (5 mg/kg, volumen de inyección 1 mL/kg; Rycarfa, CN 582761, KRKA, Eslovenia) y marbofloxacino (2 mg/kg, volumen de inyección 1 mL/kg.; Marbocyl F.D, CN 576465, Vetoquinol, España) durante el día de la cirugía y los dos siguientes. Los animales se recuperaron de la cateterización durante otros seis días, para posteriormente iniciar la autoadministración de fentanilo.

En cuanto al protocolo de autoadministración de fentanilo, se llevó a cabo un diseño ligeramente diferente al empleado en la mayoría del contenido de este trabajo en lo relativo a diseño experimental y duración de la sesión de autoadministración. En este caso seguimos un diseño cerrado en cuanto a número de sesiones de autoadministración, las cuales tuvieron además una duración de 1 h. En base a los experimentos previos, los animales fueron sometidos a veintidós sesiones de autoadministración con acceso a fentanilo, seguidas de diez en las que se extinguió la conducta de búsqueda de fentanilo al sustituir el mismo por solución salina. Después, se sometió a los animales a una prueba de reinstauración de la conducta de búsqueda inducida por estímulo condicionado en la que recibieron pretratamiento con Ro 61-8048 o su correspondiente vehículo. Para finalizar, tras un periodo de reextinción de diez días en ausencia de acceso a fentanilo, se sometió a los animales a la prueba de reinstauración inducida por fentanilo usando una dosis s.c. de 15 $\mu\text{g}/\text{kg}$ para inducir la reinstauración. Treinta minutos antes del inicio de la sesión, los animales recibieron también el pretratamiento con Ro 61-8048 o su vehículo. Los animales fueron sacrificados por decapitación 2 h tras el inicio de la sesión de autoadministración (Fig. 27).



Figura 27 | Diseño experimental para evaluar el efecto de Ro 61-8048 sobre la conducta adictiva inducida por fentanilo y la alodinia mecánica en animales sometidos al modelo de dolor neuropático *spared nerve injury* (SNI). Los animales fueron sacrificados 2.5 h tras el tratamiento con Ro 61-8048 para la obtención de muestras de plasma y NAcc y el análisis de los metabolitos de la KynP mediante UPLC-MS/MS. I.V.: cirugía de cateterización. VF: test de Von Frey. SNI: cirugía de inducción de dolor neuropático. CIR: reinstauración inducida por estímulo condicionado. DIR: reinstauración inducida por la droga.

4. Obtención, procesamiento de muestras y técnicas empleadas

4.1 Obtención de muestras biológicas

En todos los experimentos a excepción del destinado a estudiar el efecto de la autoadministración de fentanilo, la fase de la conducta adictiva y el tratamiento con Ro 61-8048 en animales sometidos a reinstauración inducida por estímulo condicionado (apartado 3.2.5, Fig. 20), los animales fueron decapitados para obtener las muestras en fresco. Se extrajo el cerebro, que fue diseccionado para obtener el NAcc. Las muestras fueron almacenadas a -80°C hasta su uso. Además, se obtuvo la sangre troncal que fue recogida en tubos de EDTA comerciales (Deltalab, España) y centrifugada a 3250 g (HermLe Z 400 K, HermLe Labortechnik GmbH, Wehingen, Alemania) durante 10 min a 4°C para obtener el plasma que se almacenó a -80°C hasta su uso.

En el experimento en que se realizó el sacrificio mediante perfusión, los animales recibieron una dosis anestésica terminal (120 mg/kg i.p.) de pentobarbital. Se extrajo sangre por punción cardiaca para proceder posteriormente con la perfusión transcárdica y obtención de secciones cerebrales en criostato que serán empleados en futuros estudios.

4.2 Procesamiento de muestras para western blot

Los tejidos cerebrales fueron homogenizados en 10 volúmenes (1 mg tejido:10 μ L de buffer) de buffer de lisis (Tris base 50 mM, NaCl 100 mM, MgCl₂ 2 mM, NP-40 1%, pH 7,4) suplementado con un coctel de inhibidor de proteasas (p8340, Sigma, Madrid, España) al 5% e inhibidor de fosfatasa (p5726, Sigma, Madrid, España) al 1%, empleando cuatro ciclos en el TissueLyserII (QIAGEN, EE.UU.) a 30 Hz durante 45 seg empleando bolas de acero (69989, QIAGEN, EE.UU.). El homogeneizado se centrifugó a 16200 g (Sorvall ST 8R Centrifuge, Thermo Scientific, España) durante 10 min a 4 °C. El sobrenadante se recogió y congeló a -80°C hasta el momento de su utilización.

Antes de ensayar la expresión de proteínas por western blot, se realizó la determinación de su concentración en los homogeneizados totales empleando el ensayo colorimétrico comercial DC Protein Assay® (BioRad, España). Este método es una modificación del método de Lowry (Lowry et al., 1951). Se ensayaron 5 μ L de la solución de proteínas junto con una mezcla en proporción 1:50 de solución alcalina de tartrato de cobre y solución surfactante. Se incubó durante 5 min junto con 200 μ L de reactivo de Folin diluido. La reducción del reactivo de Folin genera un compuesto coloreado de forma proporcional a la cantidad de proteína presente en la muestra, que cuantificamos mediante espectrofotometría con una longitud de onda de 750 nm (ELX8080 IU, Ultra Microplate Reader, Bio-Tek Instruments Inc., EE. UU.). Se tomaron medidas triplicadas de los valores de absorbancia de la solución de proteína a determinar y los de una recta de calibración constituida por diferentes concentraciones de seroalbúmina bovina (BSA) que ensayamos en el mismo momento y condiciones que las muestras. De esta forma, pudimos conocer mediante interpolación la concentración de proteína del homogeneizado total de las muestras.

4.2.1 Western blot

Para determinar la expresión de proteínas en el NAcc se empleó la técnica de western blot. Con esta técnica analizamos la expresión de subunidades de receptores glutamatérgicos GluN2A y GluN2B, del transportador de glutamato EAAT2 y de las quinasas Akt y Erk 1/2 en su forma nativa y fosforilada.

Las muestras se diluyeron en proporción 3:1 en tampón de carga reductor (Tris-HCl 25 mM, pH 6.8, SDS 20%, glicerol 10%, β -mercaptoetanol 4% y azul de bromofenol). Posteriormente fueron calentadas a 95°C durante 5 min y se cargó 20 μ g de proteína total en cada uno de los pocillos de geles de SDS-poliacrilamida de porcentaje variable (7-15%).

Tras la electroforesis, las proteínas del gel se sometieron a la transferencia a membranas de PVDF o nitrocelulosa por transferencia semihúmeda (Trans-Blot® Turbo™ Transfer System, Bio-Rad, EE. UU.) o húmeda durante 2 h a 4°C usando un tampón que contenía Tris-base 25 mM, glicina 190 mM y metanol 20%. Para evitar las uniones inespecíficas de los anticuerpos empleados posteriormente, las membranas se bloquearon en TBST (Tris 0.5 M a pH 7.5, NaCl 1.5 M; TWEEN®-20 0.1%) con un 5% de leche desnatada o BSA durante 1 h a temperatura ambiente. Después, las membranas se incubaron durante 16 h a 4°C bajo agitación suave con los anticuerpos primarios que reconocen a las diferentes proteínas diana que se muestran en la Tabla 1. Se analizó la expresión β -actina como control de carga.

Anticuerpos primarios				
Anticuerpo frente a	Huésped	Dilución	Casa comercial	Referencia
NMDA2A	Conejo	1:1000 en 5% BSA TBST	Cell Signaling	4205
NMDA2B	Conejo	1:1000 en TBST	Cell Signaling	4207
EAAT2	Conejo	1:1000 en TBST	Abcam	ab41621
Akt	Ratón	1:500 en TBST	Santa Cruz	sc5298
pAkt Ser473	Conejo	1:1000 en TBST	Cell Signaling	9271
Erk 1/2	Conejo	1:1000 en 5% BSA TBST	Cell Signaling	4695
pErk 1/2 (Thr202/Tyr204)	Conejo	1:1000 en 5% BSA TBST	Cell Signaling	4370
β -actina	Ratón	1:20000 en TBST	Sigma Aldrich	A5441
Anticuerpos secundarios				
Anticuerpo frente a	Huésped	Dilución	Casa comercial	Referencia
IgG de conejo conjugado con HRP	Cabra	1:10000 en TBST	Millipore	12-348
IgG de raton conjugado con HRP	Cabra	1:10000 en TBST	Calbiochem	401215
IgG de ratón conjugado con fluoróforo IRDye 680RD	Cabra	1:10000 en TBST	LI-COR Biosciences	926-68070

Tabla 1 | Anticuerpos primarios y secundarios utilizados en la determinación de la expresión de proteínas mediante western blot.

Tras el lavado del exceso de anticuerpo con TBST, las membranas se incubaron con los correspondientes anticuerpos secundarios conjugados con la peroxidasa de rábano (HRP) o con un fluorocromo.

La inmunoreactividad de las bandas se detectó empleando reactivos comerciales que permiten la oxidación del luminol que contienen catalizada por la peroxidasa de rábano acoplada a los anticuerpos secundarios (SuperSignal™ West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate o SuperSignal™ West Femto, Thermo Fisher Scientific, EE.UU.). La quimioluminiscencia generada o bien la señal fluorescente emitida por los anticuerpos secundarios se captó mediante la exposición de la membrana en el equipo de imagen Odyssey® (LI-COR Biosciences, EE. UU.). La cuantificación de densidad de las bandas se realizó empleando el programa ImageJ versión 1.54f (NIH, EE.UU.). El valor de cada muestra se normalizó en referencia a la inmunoreactividad de la actina medida en la misma membrana.

4.3 Procesamiento de muestras para UPLC-MS/MS

Se añadió a cada muestra de plasma 1 volumen de solución de hidróxido de amonio (NH_4OH) al 3.2% que contenía en proporción 1:10 los metabolitos a detectar marcados con isótopos. Estos isótopos estables fueron utilizados como estándar interno (IS) con el fin de poder compensar la pérdida de los metabolitos objetivo a lo largo de su procesamiento y análisis. Tras su mezcla, se añadieron 2 volúmenes de solución de sulfato de zinc (Zn_2SO_4) 200 mM en relación con la muestra seguida de un volumen de metanol. Se centrifugó la mezcla a 2300 g durante 10 min a 4°C (Eppendorf 5430R, Eppendorf Nordic A/S, Suecia), para añadir al sobrenadante una cantidad isovolumétrica de ácido fórmico al 5%. Se inyectaron 1.5 μL de la muestra procesada en el UPLC-MS/MS.

Para el procesamiento del NAcc, se añadió al tejido en proporción 1:1 (mg: μL) la solución de NH_4OH al 3.2% conteniendo en proporción 1:10 los metabolitos a detectar marcados con isótopos. Se añadieron al tubo esferas de óxido de circonio de 1 mm de diámetro (ZROB10; NextAdvance, EE. UU.) para homogeneizar el tejido en un molino triturador (Bullet Blender Blue CE BBX24B-CE; Next Advance, EE. UU.). Las muestras recibieron el mismo número de ciclos de homogenización hasta llegar a tener un homogeneizado uniforme. Se añadió al homogeneizado una solución de Zn_2SO_4 200 mM y metanol en proporciones 2:1 y 1:1 respectivamente con respecto a la cantidad de tejido procesado. Las muestras se centrifugaron a 14000 g durante 10 min a 4°C (Eppendorf 5430R,

Eppendorf Nordic A/S, Suecia). El sobrenadante se mezcló con una proporción equivalente de ácido fórmico al 5%, y se centrifugó de nuevo. Este último sobrenadante se cargó en viales y 1.5 µL fueron inyectados en el sistema.

4.3.1 UPLC-MS/MS

Con el fin de caracterizar el efecto de la autoadministración de fentanilo y el tratamiento con Ro 61-8048 en los diferentes experimentos sobre la KynP, se llevó a cabo la determinación de los metabolitos mediante cromatografía líquida de ultra alto rendimiento con detección mediante espectrómetro de masas en tándem (UPLC-MS/MS; *ultrahigh performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry*). Esta técnica se llevó a cabo durante una estancia que realicé en el grupo *Neuropsychimmunology* de la Dra. Sophie Erhardt del departamento de Fisiología y Farmacología del *Karolinska Institutet* en Estocolmo.

El sistema empleado para la UPLC-MS/MS constó de un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo Xevo TQ-XS (Waters, Manchester, UK) equipado con una interfaz de electrospray Z-spray para la detección de los metabolitos. Para la separación de los componentes de las muestras, se empleó el sistema Waters Acquity UPLC I-Class FTN (Waters, MA, EE. UU.). El espectrómetro de masas se operó en modo *electrospray* - monitorización de reacciones múltiples (MRM) con una temperatura de fuente de 150°C, voltaje capilar de +3.0 kV, temperatura de desolvatación 650°C, flujo de desolvatación del gas de 1000 L/h y ganancia del detector con valor 1.

La columna cromatográfica empleada fue la Acquity HS T3 2.1 x 150 mm, 1.8 µm (186003540; Waters, MA, EE. UU.) a 50°C. Se empleó elución en gradiente empleando dos fases móviles: (A) ácido fórmico al 0.6% en agua y (B) 0.6% ácido fórmico en metanol. Una precolumna (PN: 186004476; Waters, 2.1 × 50 mm) fue empleada previamente al paso a la columna de separación para retener contaminantes de la fase móvil. El flujo de la bomba fue de 0.3 mL/min y las muestras se pasaron en 13 min.

Metabolito / IS	Masa del ion precursor	Masa del ion producido	Voltaje del cono (V)	Energía de colisión (EV)	Tiempo de retención (min)
Triptofano	206	118	20	24	7.03
KYN	209	94	20	12	5.75
KYNA	190	116	30	28	7.9
QUIN	168	78	20	18	2.9
3-HA	154	108	20	18	5.95
PA	124	78	30	16	2.19
NAA	123	78	25	16	1.99
3-HK	225	110	14	16	3.82
Trp-d ₃	208	119	40	26	7.01
KYN-d ₄	213	94	30	15	5.7
KYNA-d ₅	195	121	28	26	7.87
QUIN-d ₃	171	81	20	18	2.85
3-HA-d ₃	157	83	24	24	5.9
PA-d ₄	128	82	4	17	2.18
NAA [¹³ C ₆]	129	101	20	16	1.98
3-HK-d ₃	228	163	14	16	3.83

Tabla 2 | Transiciones y parámetros espectroscópicos empleados para los metabolitos y estándares internos (IS).

Los metabolitos en plasma y NAcc fueron detectados en concentraciones mayores al límite de detección (LOD) definido por la solución estándar de menor concentración para la cual la relación señal/ruido fue mayor a 3. Los LOD fueron: TRP, 0.05 µM; KYN, 1 nM; KYNA, 1 nM; QUIN, 5 nM; 3-HAA, 5 nM; PA, 5 nM; NAA, 1nM; 3-HK, 5 nM.

El procesamiento y análisis de los cromatogramas se realizó empleando el programa MassLynx 4.1.

4.4 Análisis estadístico

El análisis estadístico se llevó a cabo utilizando el programa GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software Inc., EE. UU.). El tamaño muestral inicial de los grupos se seleccionó en base a experiencia previa para asegurar una significación estadística considerando la posible pérdida de ratas debido a criterios de punto final humanitario si se observaban signos físicos distintos a los generados por la autoadministración de fentanilo o valores atípicos (*outliers*) determinados por la prueba de ROUT con significancia de $Q=1\%$. Estas condiciones fueron los dos únicos criterios de exclusión empleados y explican las diferencias en el tamaño de los grupos.

Todos los datos se presentan como media \pm error estándar de la media (EEM). El umbral de significancia estadística se definió en $p < 0.05$. Los test estadísticos concretos se realizaron según fueron los grupos experimentales, la toma de medidas y la distribución de los datos. Para diferencias estadísticas entre dos grupos se empleó la prueba t de Student. Se empleó la versión corregida de Welch (Welch's t-test) de esta prueba cuando la desviación estándar de los grupos era diferente de forma estadísticamente significativa según el test F de igualdad de varianzas.

Cuando existieron más de dos grupos y una variable independiente se empleó el ANOVA de una vía. Si los grupos presentaban una desviación estándar significativamente diferente entre ellos según el test de Barlett, se empleó la versión corregida de Welch de este test. Las comparaciones múltiples entre los grupos se realizaron en este caso mediante el test de Tamhane T2. En experimentos con más de dos variables independientes se empleó ANOVA de dos o tres vías. Solo en el caso de que hubiera interacción estadísticamente significativa entre dos factores, las diferencias se analizaron mediante la prueba de Sidak o Tukey como test *post-hoc*. En el caso de ausencia de algún dato por problemas en el protocolo experimental o presencia de *outliers*, la cual es incompatible con la realización de ANOVA, se llevó a cabo análisis de efectos mixtos.

En los casos en que los datos no se ajustaban a una distribución normal según el test de D'Agostino-Pearson, se emplearon los test de Kruskal-Wallis (en lugar de ANOVA de una vía) o Mann-Whitney (en lugar de t de Student).

RESULTADOS

1. Puesta a punto del modelo experimental

1.1 Determinación de la dosis por infusión de fentanilo y del tratamiento con Ro 61-8048

El primer experimento que se llevó a cabo tuvo como objetivo determinar la dosis por infusión de fentanilo que los animales se autoadministrarían, así como evaluar la efectividad de Ro 61-8048 a diferentes dosis y tiempos de administración.

En primer lugar, se evaluó el comportamiento de los animales ante la autoadministración de diferentes dosis de fentanilo por infusión bajo sesiones de autoadministración de 2 h empleando el paradigma de refuerzo de razón fija FR1. Inicialmente, se intentó establecer la adquisición de la conducta de autoadministración de fentanilo sin ningún entrenamiento operante previo o estrategia que incentivara la conducta operante en la cámara de autoadministración. Para ello expusimos a los animales a la autoadministración de dosis de fentanilo de 0.32 y 10 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{infusión}$. La conducta de obtención de fentanilo fue muy baja y errática en ambos grupos (media de infusiones \pm EEM a lo largo de siete días de autoadministración de 2.03 ± 0.72 y 0.71 ± 0.27 respectivamente). En las sucesivas sesiones de autoadministración los animales recibieron al inicio de la sesión una infusión no contingente de fentanilo (*priming*) de la misma dosis que fueran autoadministrar a lo largo de la sesión. Esta estrategia tampoco generó una mejora en la conducta de autoadministración, dado que los valores medios de infusiones fueron de 3.53 ± 0.76 y 2.19 ± 0.38 para los grupos de 0.32 y 10 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{infusión}$, respectivamente. Vistos los datos, se expuso a los animales a las dosis de 1 y 3.2 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{infusión}$ respectivamente, empleando además la estrategia de *priming*. En estas condiciones, sí se pudo observar un aumento del número de infusiones obtenidas en el grupo que autoadministró la dosis de 3.2 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{infusión}$ (sesión 7, $t_{(11)}=15.08$; $p<0.0001$) (Fig. 28)

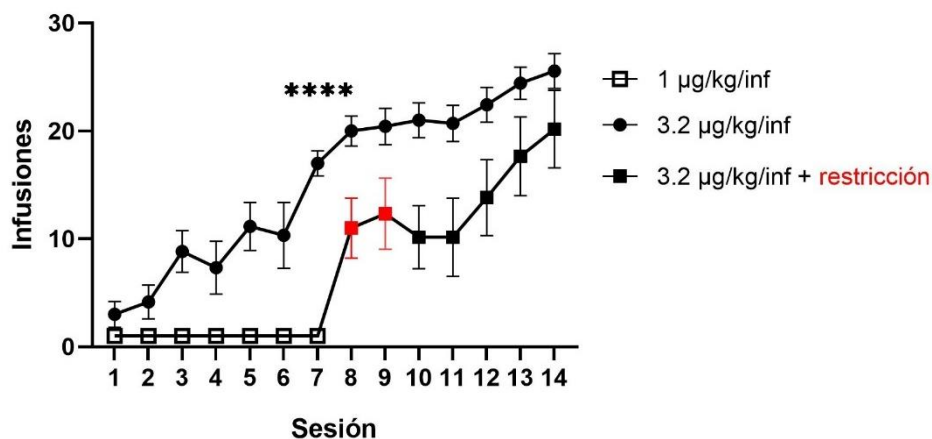


Figura 28 | Elección de la dosis por infusión de fentanilo. Se muestra el número de infusiones a lo largo de las sesiones de autoadministración empleando diferentes dosis de fentanilo (1 o 3.2 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{infusión}$) y las estrategias de *priming*. Se expuso además a un grupo de individuos a restricción de comida inicial durante dos sesiones de autoadministración (mostradas con símbolo en rojo, sesiones 8 y 9). Los datos se expresan como media \pm EEM ($n=6$). El análisis estadístico se llevó a cabo mediante el test t de Student. **** $p<0.0001$: sesión 7, vs. 1 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{infusión}$.

Al observar que la dosis de 3.2 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{infusión}$ parecía adecuada para la autoadministración, el grupo de animales que se autoadministraba 1 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{infusión}$ pasó también a autoadministrarse la dosis de 3.2 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{infusión}$, añadiendo además la

estrategia de restricción de alimento durante los dos primeros días para incentivar la conducta operante. Esta estrategia resultó efectiva, ya que en la última sesión el consumo de fentanilo de estos animales no mostró diferencias significativas (sesión 14, $t_{(11)}=1.45$; $p=0.18$) en comparación con el grupo que ya llevaba consumiendo fentanilo a la dosis de $3.2 \mu\text{g/kg/infusión}$ durante las siete anteriores sesiones (Fig. 28).

Una vez seleccionada la dosis por infusión ($3.2 \mu\text{g/kg/infusión}$) a emplear en las sesiones de autoadministración, se realizaron pruebas con Ro 61-8048 para determinar la dosis y el tiempo óptimos de administración a emplear en los experimentos subsiguientes. Los animales se distribuyeron en dos grupos con un comportamiento de autoadministración similar y se administró Ro 61-8048 a las dosis de 50 y 100 mg/kg por vía intraperitoneal (i.p.), 30 o 60 min antes del inicio de la sesión de autoadministración. La administración de 100 mg/kg fue efectiva disminuyendo el consumo cuando se inyectó 30 (sesión 2, $t_{(10)}=3.34$; $p=0.007$) o 60 min (sesión 4, $t_{(10)}=4.07$; $p=0.002$) antes de la sesión de autoadministración. Además, se observó que la administración de Ro 61-8048 30 min antes de la sesión en dosis de 100 mg/kg redujo el consumo de fentanilo cuando se administró en dos sesiones de autoadministración consecutivas (sesión 10 y 11, $t_{(10)}=4.3$; $p=0.0015$ y $t_{(10)}=2.8$; $p=0.02$) (Fig. 29). La dosis de 50 mg/kg administrada 30 minutos antes de la sesión no resultó efectiva para reducir el consumo de fentanilo (sesión 9, $t_{(10)}=1.37$; $p=0.21$). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos vehículo y Ro 61-8048 cuando no se aplicó tratamiento.

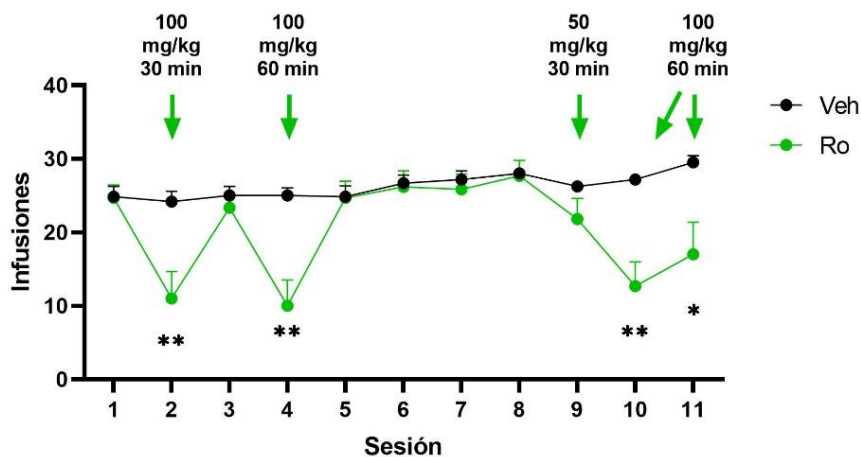


Figura 29 | Elección de la dosis y momento de administración de Ro 61-8048. Se muestra el número de infusiones a lo largo de las sesiones de autoadministración empleando diferentes dosis (50 y 100 mg/kg) y tiempos de administración (30 o 60 min antes de la sesión) para Ro 61-8048 (Ro). Los datos se expresan como media \pm EEM ($n=6$). El análisis estadístico se llevó a cabo mediante el test t de Student. * $p<0.05$, ** $p<0.01$: vs. Veh

1.2 Efecto del entrenamiento con comida sobre la conducta operante

Se llevó a cabo un protocolo de entrenamiento de la conducta operante con comida para evaluar el efecto de este sobre la adquisición de la autoadministración de fentanilo.

Los animales adquirieron la conducta operante como muestra la discriminación entre palanca activa (que suministra comida al animal) e inactiva (sin ningún tipo de consecuencia) al final del entrenamiento (sesión 5, $U=39.5$; $p<0.0001$) y el aumento de presiones en la palanca activa entre el principio y el final del protocolo ($t_{(22)}=4.83$;

RESULTADOS

$p < 0.0001$). La pérdida de peso provocada por la restricción de comida durante los tres primeros días, que corresponden a las tres primeras sesiones de autoadministración, fue recuperada de forma previa al inicio de la siguiente sesión (sesión 4) y el peso aumentó en la última sesión en relación a la primera ($t_{(22)} = 4.81$; $p < 0.0001$) (Fig. 30).

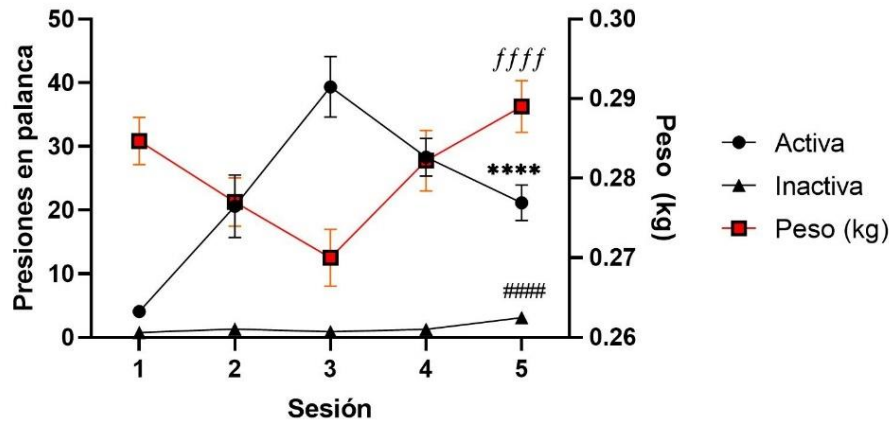


Figura 30 | Efecto del protocolo de entrenamiento con comida sobre la conducta operante y el peso. Se muestra el número de presiones en la palanca activa e inactiva y el peso a lo largo de las sesiones de autoadministración. Los datos se expresan como media \pm EEM ($n=23$). El análisis estadístico se llevó a cabo mediante el test t de Student para presiones en palanca activa y peso, y el test de Mann-Whitney para la relación de presiones en palanca activa e inactiva. **** $p < 0.0001$: vs. sesión 1. *ffff* $p < 0.0001$: vs. sesión 1. ##### $p < 0.001$: vs. activa en sesión 5.

Teniendo en cuenta el comportamiento de animales de varios experimentos que fueron sometidos a entrenamiento de la conducta operante ($n=53$), y el de aquellos que adquirieron la conducta de autoadministración de fentanilo sin entrenamiento previo (adquisición espontánea, $n=17$), el protocolo de entrenamiento con comida redujo el número de sesiones de autoadministración que los animales requirieron para alcanzar el criterio de estabilidad en el consumo de fentanilo ($U=211$; $p < 0.0007$) (Fig. 31).

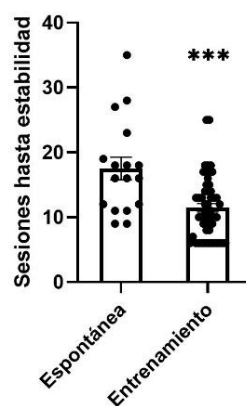


Figura 31 | Efecto del entrenamiento con comida sobre la adquisición de la conducta de obtención de fentanilo. Se muestra el número de sesiones de autoadministración requeridas para alcanzar el criterio de estabilidad de consumo de fentanilo en fase de mantenimiento. Los datos se expresan como media \pm EEM ($n=17-53$). El análisis estadístico se llevó a cabo mediante el test Mann-Whitney. *** $p < 0.001$: vs. Espontánea.

2. Efecto de la modulación de la KynP sobre el consumo y la búsqueda de fentanilo en animales sometidos a autoadministración intravenosa operante de fentanilo

2.1 Efecto de Ro 61-8048 en las diferentes fases de la conducta adictiva inducida por fentanilo

2.1.1 Adquisición

Los animales adquirieron la conducta de autoadministración de fentanilo tras haber sido sometidos previamente a entrenamiento de la conducta operante con comida. Los grupos de tratamiento con vehículo o con Ro 61-8048 fueron asignados de forma pseudoaleatoria, asegurando un equilibrio entre los grupos según el comportamiento de autoadministración de comida mostrada previamente (Fig. 32). No se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas por la prueba t de Student en ninguno de los parámetros analizados: ingesta de comida ($t_{(21)}=0.53$; $p=0.63$), presiones sobre la palanca activa ($t_{(21)}=1.45$; $p=0.16$) o inactiva ($t_{(21)}=0.24$; $p=0.81$).

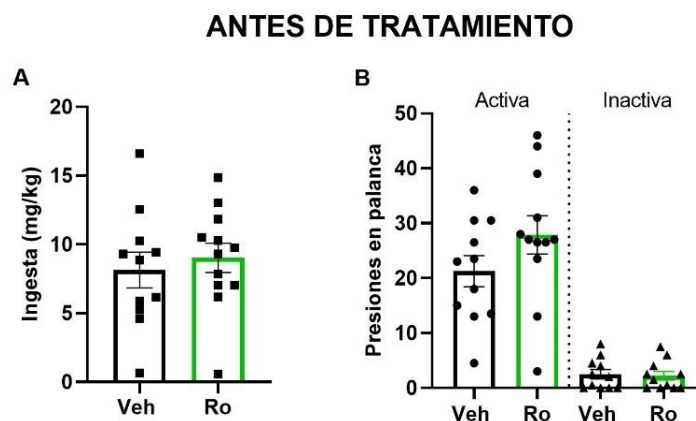


Figura 32 | Distribución de los animales en la fase de adquisición basada en el comportamiento observado durante el entrenamiento con comida. Se muestra (A) la ingesta media y (B) el número de presiones en palanca activa e inactiva en las últimas dos sesiones de entrenamiento previo al inicio del tratamiento con Ro 61-8048. Los datos se expresan como media \pm EEM ($n=11-12$). El análisis estadístico se llevó a cabo mediante el test t de Student. No hay diferencias estadísticamente significativas entre los grupos en el entrenamiento con comida previo a la adquisición.

Los animales fueron pretratados durante las siete primeras sesiones de autoadministración de fentanilo con Ro 61-8048. El análisis de efectos mixtos indicó como factores principales estadísticamente significativos el tratamiento con Ro 61-8048 y la sesión sobre el número de infusiones obtenidas (sesión: $F_{(3,58)}=5.94$; $p=0.0012$, tratamiento: $F_{(1,19)}=7.68$; $p=0.0012$, interacción: $F_{(6,113)}=2.61$; $p=0.02$) (Fig. 33A) y presiones realizadas en la palanca activa (sesión: $F_{(4,67)}=4.4$; $p=0.004$, tratamiento: $F_{(1,19)}=5.52$; $p=0.03$, interacción: $F_{(6,113)}=2.3$; $p=0.03$). El tratamiento ($F_{(1,19)}=4.36$; $p=0.005$) y la sesión ($F_{(2,27)}=2.6$; $p=0.09$) no fueron factores principales estadísticamente significativos en el análisis de efectos mixtos del número de presiones en la palanca inactiva, pero si la interacción entre ambos ($F_{(6,88)}=4.08$; $p=0.0012$) (Fig. 33B).

RESULTADOS

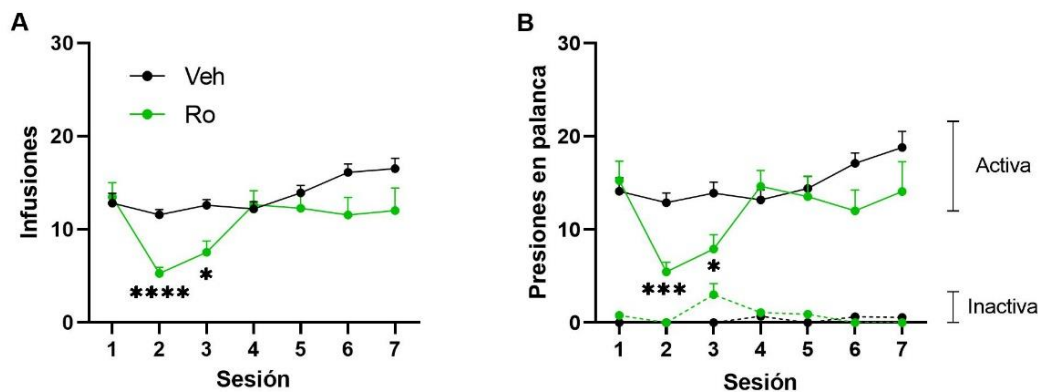


Figura 33 | Efecto del tratamiento diario con Ro 61-8048 sobre la adquisición de la autoadministración de fentanilo. Se muestra (A) el número de infusiones obtenidas y (B) y de presiones de la palanca activa e inactiva realizadas por los animales durante las siete primeras sesiones de autoadministración de 2 h en las que recibieron el pretratamiento diario con Ro 61-8048 (Ro, 100 mg/kg i.p). Los datos se expresan como media \pm EEM ($n=9-11$). El análisis estadístico se realizó empleando análisis de efectos mixtos seguido del test *post-hoc* de Sidak. * $p<0.05$, *** $p<0.001$, **** $p<0.0001$: vs. Veh.

Con el fin de valorar efectos de Ro 61-8048 una vez se cesó su tratamiento, los animales se sometieron a once sesiones adicionales de autoadministración de fentanilo sin ningún tipo de tratamiento. En cuanto al número de infusiones, el análisis de efectos mixtos mostró un efecto principal de la sesión ($F_{(4,65)}=4.84$; $p=0.002$) pero no del tratamiento previo con Ro 61-8048 ($F_{(1,18)}=1.2$; $p=0.28$) ni de la interacción entre ambos factores ($F_{(10,170)}=1.82$, $p=0.06$) (Fig. 34A). En cuanto a las presiones en la palanca activa, se observó un efecto en el que intervinieron los factores de la sesión de autoadministración ($F_{(4,75)}=3.38$; $p=0.011$) y la interacción de la sesión con el tratamiento previo ($F_{(10,176)}=2.88$; $p=0.02$), pero no del tratamiento previo con Ro 61-8048 *per se* ($F_{(1,18)}=0.96$; $p=0.34$). El número de presiones en la palanca inactiva no se vio afectado por ninguno de las factores principales analizados (sesión: $F_{(5,73)}=1.7$; $p=0.15$; tratamiento previo: $F_{(1,20)}=4.02$; $p=0.06$, interacción: $F_{(10,163)}=0.88$; $p=0.55$) (Fig. 34B).

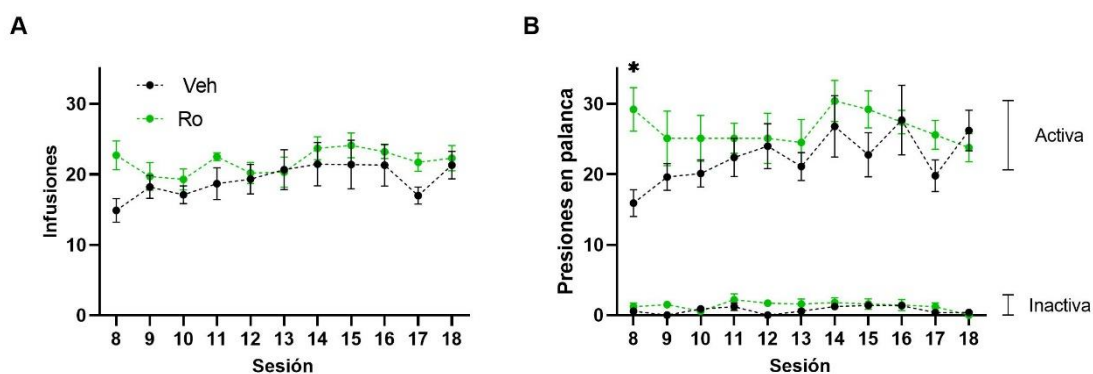


Figura 34 | Autoadministración de fentanilo en las sesiones posteriores al tratamiento con Ro 61-8048. Se muestra (A) el número de infusiones obtenidas y (B) el número de presiones en la palanca activa e inactiva realizadas por los animales durante la sesión de autoadministración de 2 h en ausencia de tratamiento. Los datos se expresan como media \pm EEM ($n=7-10$). El análisis estadístico se realizó empleando análisis de efectos mixtos seguido del test *post-hoc* de Sidak. * $p<0.05$: vs. Veh

2.1.2 Mantenimiento

Una vez que los animales alcanzaron el criterio de estabilidad en el consumo de fentanilo, se procedió a evaluar el efecto del Ro 61-8048 sobre dicho consumo. Los animales se distribuyeron en los dos grupos experimentales de forma homogénea en base al consumo estable de fentanilo en términos de infusiones ($t_{(15)}=0.35$; $p=0.73$). No se observaron diferencias en cuanto a la búsqueda de fentanilo expresado por respuestas en la palanca activa ($U=22$; $p=0.35$) ni tampoco en respuestas sobre la palanca inactiva ($t_{(14)}=0.86$; $p=0.42$) (Fig. 35).

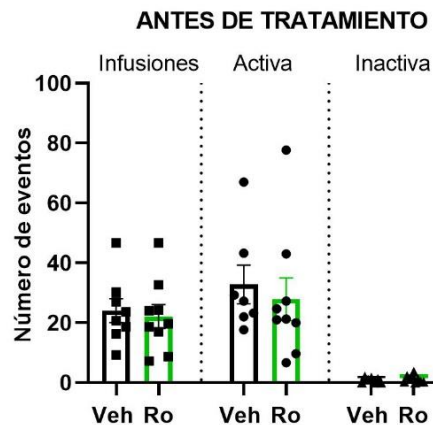


Figura 35 | Distribución de los animales en los grupos Veh y Ro 61-8048 tras cumplir el criterio de estabilidad en el consumo de fentanilo. Se muestran los valores medios para el número de infusiones de fentanilo obtenidas y presiones en palanca activa e inactiva en las tres sesiones previas al tratamiento con Ro 61-8048 cuando las ratas mostraron un consumo estable. Los resultados se muestran como la media \pm EEM ($n=7-9$). El análisis estadístico se realizó empleando el test t de Student para infusiones y presiones en la palanca inactiva, y el test de Mann-Whitney para presiones en la palanca activa.

En la sesión inmediatamente posterior, los animales fueron introducidos a las cámaras en condiciones idénticas, con acceso a fentanilo, y fueron pretratadas 30 min antes con Ro 61-8048 o su vehículo. El pretratamiento con Ro 61-8048 redujo el consumo de fentanilo en términos de número de infusiones ($U=3.5$; $p=0.0014$), la conducta de búsqueda asociada en términos de respuestas en la palanca activa ($U=2$; $p=0.0012$), pero no alteró el número de respuestas sobre la palanca inactiva ($U=18$; $p=0.47$) según el test no paramétrico de Mann-Whitney (Fig. 36).

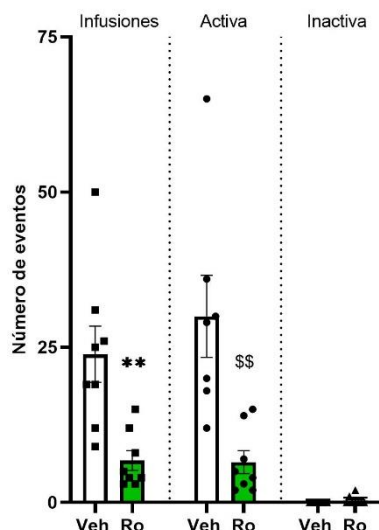


Figura 36 | Efecto del tratamiento con Ro 61-8048 sobre el mantenimiento de consumo de fentanilo. Se muestra el número de infusiones obtenidas y respuestas sobre la palanca activa e inactiva realizadas por los animales durante la sesión de autoadministración de 2 h. Los datos se expresan como media \pm EEM (n=6-8). El análisis estadístico se realizó empleando el test Mann-Whitney. **p<0.01: vs. Veh. \$\$ p<0.01: vs. Veh.

2.1.3 Extinción

Una vez los animales alcanzaron el criterio de estabilidad en el consumo de fentanilo en la fase de mantenimiento, la solución de fentanilo fue sustituida por solución salina fisiológica y el estímulo condicionado asociado a fentanilo fue omitido tras la pulsación de la palanca activa. Con estos cambios, se inició el periodo de extinción de la conducta de búsqueda de la droga. Durante este periodo se intervino diariamente tratando a los animales con Ro 61-8048 durante cinco días.

Los datos de respuesta sobre la palanca activa se analizaron mediante análisis de efectos mixtos, siendo estadísticamente significativos los factores principales de sesión de extinción ($F_{(2,20)}=23.63$; $p<0.0001$), tratamiento con Ro 61-8048 ($F_{(1,13)}=33.73$; $p<0.0001$) y la interacción entre ambos ($F_{(4,49)}=13.07$; $p<0.0001$). El tratamiento con Ro 61-8048 disminuyó el valor de respuestas sobre la palanca activa de forma estadísticamente significativa en la primera ($p=0.0101$), tercera ($p=0.013$) y cuarta sesión ($p=0.02$) de extinción según el test *post-hoc* de Sidak. En términos de respuestas sobre la palanca inactiva, el tratamiento con Ro 61-8048 generó una disminución estadísticamente significativa ($F_{(1,55)}=18.9$; $p<0.0001$). La sesión de extinción ($F_{(2,27)}=3.01$; $p=0.06$) y la interacción ($F_{(4,55)}=2.18$; $p<0.08$) no fueron factores estadísticamente significativos en el número de respuestas sobre la palanca inactiva (Fig. 37).

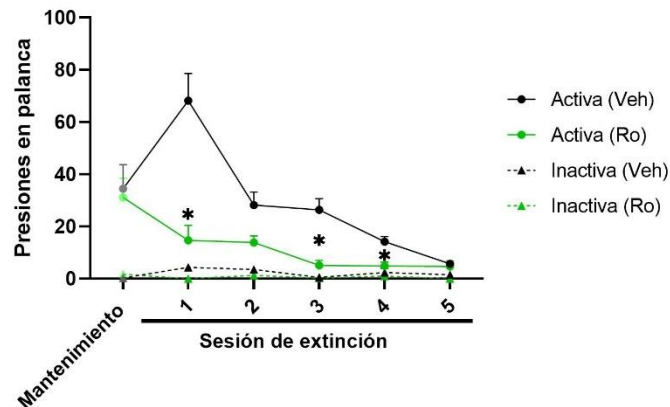


Figura 37 | Efecto del tratamiento con Ro 61-8048 sobre la extinción de la conducta de búsqueda de fentanilo. Se muestra el número de presiones sobre las palancas activa e inactiva realizadas por los animales en las cinco primeras sesiones de extinción bajo el efecto del pretratamiento diario con Ro 61-8048 y el valor promedio de los últimos tres días de mantenimiento previos al inicio de la extinción (mantenimiento). Los datos se expresan como media \pm EEM (n=6-9). El análisis estadístico se realizó empleando análisis de efectos mixtos seguido por la prueba *post-hoc* de Sidak. * $p < 0.05$: vs. Veh

Con el fin de evaluar un potencial efecto de Ro 61-8048 una vez cesó el tratamiento, el periodo de extinción se prolongó sin ningún tipo de tratamiento hasta que los animales cumplieron el criterio de estabilidad en extinción. No se observaron diferencias estadísticamente significativas en el número de sesiones de extinción requeridas para cumplir el criterio entre los animales de ambos grupos ($t_{(12)}=1.85$; $p=0.09$; Veh: 5.33 ± 0.21 ; Ro 61-8048: 5 ± 0 , datos expresados como media \pm EEM)

2.1.4 Reinstauración de la conducta de búsqueda

2.1.4.1 Inducida por fentanilo

La reexposición a una dosis no contingente de fentanilo en animales con una historia de dependencia al mismo puede ocasionar la reinstauración de la conducta de búsqueda de fentanilo al final de la fase de extinción, una vez ya se ha extinguido la conducta. Así, evaluamos el efecto del pretratamiento con Ro 61-8048 sobre la reinstauración de la conducta de búsqueda de fentanilo inducida por esta sustancia. La conducta mostrada de forma previa a la prueba de reinstauración, en las últimas sesiones de consumo de fentanilo y de extinción fue similar entre ambos grupos en ausencia de tratamiento, como se evidencia en la comparación de los valores de infusiones (Fig. 38A), y presiones sobre la palanca activa (Fig. 38B), durante las últimas tres y dos sesiones, respectivamente siendo el único factor estadísticamente significativo la fase de la conducta adictiva ($F_{(1,14)}=32.61$, $p<0.0001$) y no el tratamiento asignado ($F_{(1,14)}=0.39$, $p=0.54$) ni la interacción ($F_{(1,14)}=0.0004$, $p=0.98$).

ANTES DE TRATAMIENTO

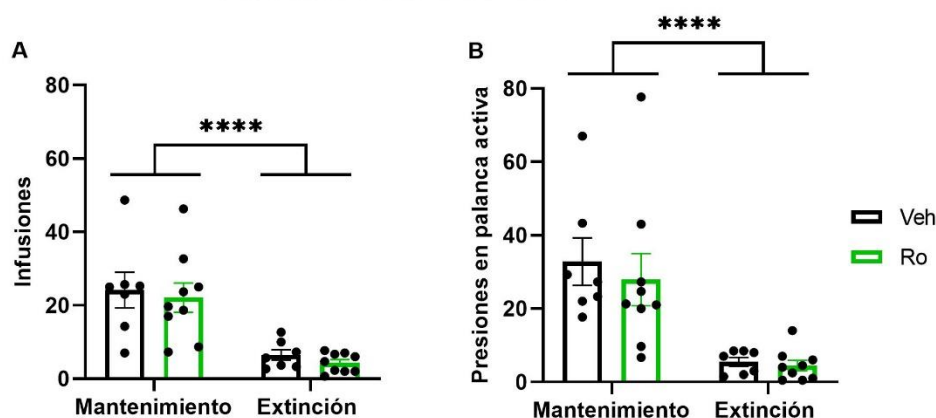


Figura 38 | Comportamiento al final de las fases de mantenimiento y extinción de los animales sometidos a la prueba de reinstauración inducida por fentanilo. Se muestran los valores medios de (A) infusiones de fentanilo (en mantenimiento) o salino (en extinción) obtenidas y de (B) presiones en la palanca activa realizadas en las tres o dos últimas sesiones de consumo de fentanilo (mantenimiento) o de extinción, en ausencia de tratamiento con Ro 61-804. Los resultados se muestran como la media \pm EEM (n=7-9). El análisis estadístico se realizó empleando ANOVA de dos vías de medidas repetidas. **** p<0.0001: Mantenimiento vs. Extinción.

Una vez que los animales extinguieron la conducta de búsqueda y cumplieron el criterio de estabilidad en extinción, se procedió a inducir la reinstauración de la conducta de búsqueda con una dosis no contingente de fentanilo vía s.c. Los animales que recibieron Ro 61-8048 no mostraron dicha reinstauración, como se evidencia por la diferencia estadísticamente significativa en el número de presiones de la palanca activa, en comparación con el grupo que recibió el vehículo ($t_{12}=4.6$; $p=0.0006$) (Fig. 39A)

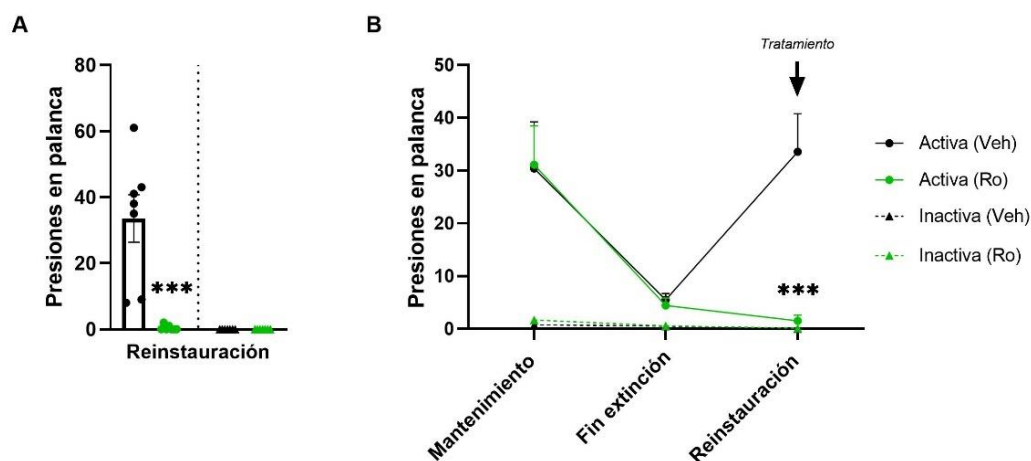


Figura 39 | Efecto del tratamiento con Ro 61-8048 sobre la reinstauración de la conducta de búsqueda de fentanilo inducida por el propio fentanilo. Se muestra (A) el número de presiones en la palanca activa e inactiva realizadas por los animales durante la prueba de reinstauración inducida por fentanilo durante 2 h. (B) Se muestra una gráfica resumen con el número medio de presiones en la palanca activa e inactiva para los últimos tres o dos días de mantenimiento y extinción respectivamente, y la sesión de reinstauración. Los datos de mantenimiento en esta figura difieren de los mostrados en la anterior (Fig. 38B), porque se permitió que los animales volvieran a cumplir el criterio de mantenimiento tras el tratamiento con Ro 61-8048 en mantenimiento, antes de iniciar la extinción. Los datos se expresan como media \pm EEM (n=7). El análisis estadístico se realizó empleando el test t de Student. ***p<0.001: vs. Veh.

2.1.4.2 Inducida por estímulo condicionado

Además de evaluar la reinstauración inducida por fentanilo, se examinó el efecto de Ro 61-8048 sobre la reinstauración de la conducta de búsqueda de fentanilo en animales expuestos al estímulo condicionado previamente asociado al fentanilo. En este experimento se emplearon como grupo control animales expuestos a autoadministración de solución salina.

En primer lugar, los animales fueron distribuidos en cuatro grupos experimentales de forma pseudoaleatoria y homogénea según el valor de respuestas sobre la palanca activa mostrado en las tres o dos últimas sesiones de las fases de consumo de fentanilo y de extinción, respectivamente. La realización de un ANOVA de dos vías de medidas repetidas nos confirmó que el reparto de los animales en los diferentes grupos fue homogéneo. En este análisis estadístico sobre los datos de presiones en la palanca activa, la autoadministración de fentanilo, la fase de la conducta adictiva y la interacción entre ambos factores fueron estadísticamente significativos ($F_{(3,20)}=10.56$; $p=0.0002$, $F_{(1,20)}=44.48$; $p<0.0001$, $F_{(3,20)}=11.18$; $p=0.0002$ respectivamente). Estos valores estadísticos junto con los mostrados provenientes del análisis *post-hoc* de Sidak nos permiten por un lado confirmar la adquisición de la conducta de autoadministración de fentanilo, dado que la conducta de búsqueda mostrada como respuestas sobre la palanca activa fue mayor en animales con acceso a fentanilo que aquellos que presionaron la palanca activa por salino (**** $p<0.0001$) y, por otro lado, indicó que los valores de presiones en la palanca activa al final de la extinción no difieren entre animales sometidos a autoadministración de fentanilo o salino. Además, en los animales que se autoadministraron fentanilo, los valores de presiones en la palanca activa al final de la extinción fueron significativamente menores a los mostrados en la fase de consumo (**** $p<0.0001$) (Fig. 40). Todo esto nos permitió confirmar la correcta adquisición y extinción de animales sometidos a autoadministración de fentanilo y, por lo tanto, validar la dependencia en los mismos.

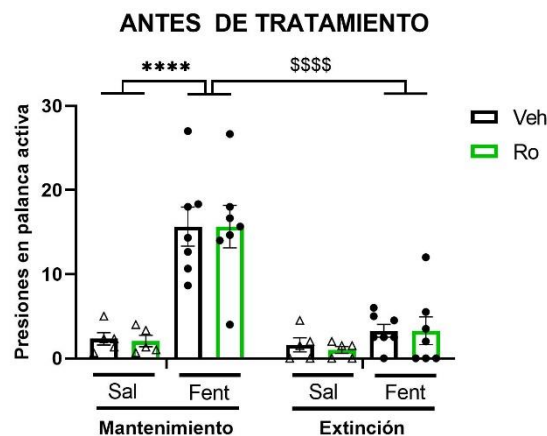


Figura 40 | Distribución de los animales sometidos a autoadministración de salino (Sal) o fentanilo (Fent) en los grupos a tratar con Ro 61-8048 o su vehículo (Veh). Se muestran los valores medios de presiones en la palanca activa obtenidos en las tres o dos últimas sesiones de consumo de fentanilo (mantenimiento) o extinción respectivamente, previas al tratamiento con Ro 61-8048. Los resultados se muestran como la media \pm EEM ($n=5-7$). El análisis estadístico se realizó empleando ANOVA de dos vías de medidas repetidas seguido del test *post-hoc* de Sidak. **** $p<0.0001$: Mantenimiento, Fent vs. Sal. \$\$\$\$ $p<0.0001$: Fentanilo, Mantenimiento vs. Extinción.

RESULTADOS

Una vez realizada la prueba de reinstauración, el análisis de las presiones en la palanca activa mediante ANOVA de dos vías mostró efectos estadísticamente significativos de la historia de autoadministración de fentanilo ($F_{(1,17)}=8.98$; $p=0.008$), el pretratamiento con Ro 61-8048 ($F_{(1,17)}=17.78$; $p=0.0006$) y la interacción entre ambos factores ($F_{(1,17)}=8.98$; $p=0.008$). La prueba *post-hoc* de Sidak reveló que los animales tratados con el vehículo de Ro 61-8048 mostraron una mayor respuesta al estímulo condicionado asociado a fentanilo que los que recibieron Ro 61-8048 ($p=0.0002$), lo que indica que este compuesto previno la reinstauración de la búsqueda de fentanilo producida por estímulo condicionado. Además, el grupo de animales que había autoadministrado fentanilo y recibió el vehículo de Ro 61-8048 en el experimento de reinstauración mostró una mayor conducta de búsqueda, medida como el número de respuestas sobre la palanca activa, en comparación con los grupos que habían autoadministrado salino y recibieron bien vehículo ($p=0.002$) o Ro 61-8048 ($p=0.0005$) durante la prueba de reinstauración (Fig. 41A).

El análisis del número de presiones en la palanca inactiva reveló diferencias estadísticamente significativas debidas a la interacción ($F_{(1,18)}=7.61$; $p=0.013$) entre la historia de autoadministración de fentanilo y el tratamiento con Ro 61-8048. Sin embargo, ninguno de los factores individuales mostró diferencias estadísticamente significativas por sí mismos ($F_{(1,18)}=3.91$; $p=0.06$ para ambos factores) (Fig. 41B).

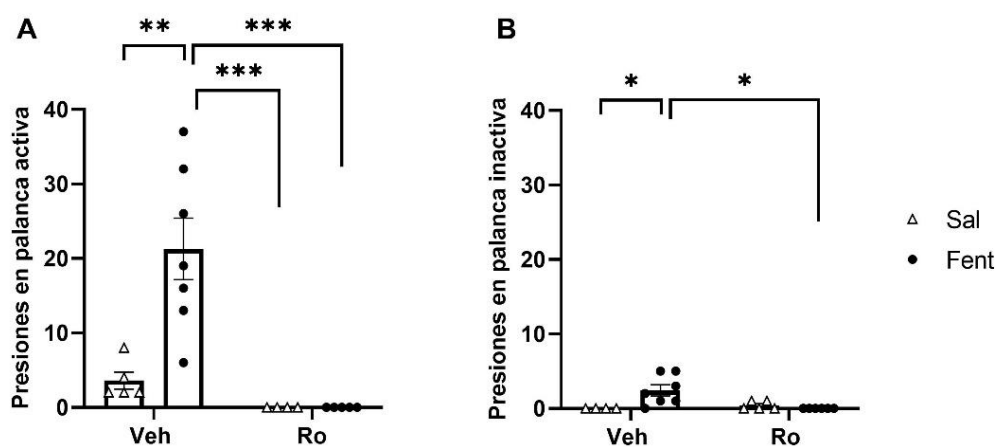


Figura 41 | Efecto del tratamiento con Ro 61-8048 sobre la reinstauración de la conducta de búsqueda de fentanilo (y salino) inducida por estímulo condicionado. Se muestra el número de presiones de la palanca activa (A) e inactiva (B) realizadas por los animales. Los datos se expresan como media \pm EEM ($n=4-7$). El análisis estadístico se realizó empleando ANOVA de dos vías seguido por el test *post-hoc* de Sidak. * $p<0.05$, ** $p<0.01$; *** $p<0.001$.

Los resultados conductuales descritos anteriormente provienen de un experimento cuyo principal objetivo era obtener plasma para cuantificar posibles diferencias en metabolitos de la KynP en diferentes fases de la conducta adictiva, además de para obtener secciones cerebrales fijadas para futuros experimentos. En otro estudio, se realizó también el protocolo de reinstauración de la conducta de búsqueda de fentanilo inducida por estímulo condicionado con la variante de que las sesiones de autoadministración fueron de 2 h y la duración de cada fase de la conducta adictiva no fue predefinida. En este diseño no se incluyeron grupos control de autoadministración de salino.

Los animales fueron sometidos al protocolo habitual de entrenamiento con comida y adquisición de autoadministración de fentanilo. Tras alcanzar el criterio de estabilidad en el consumo de fentanilo, se inició el protocolo de extinción hasta que se cumplió el criterio de estabilidad en esta fase. Posteriormente, los animales se sometieron a la prueba de reinstauración. Los animales fueron distribuidos en dos grupos para el tratamiento con Ro 61-8048 o su vehículo, teniendo en cuenta la conducta mostrada en las fases de consumo de fentanilo y extinción. No se observaron diferencias significativas entre los grupos en cuanto al número de respuestas en la palanca activa en las tres sesiones previas al inicio de la extinción ni en las dos últimas sesiones de la fase de extinción, siendo el único factor estadísticamente significativo la fase de la conducta adictiva según el análisis por ANOVA de dos vías de medidas repetidas (interacción: $F_{(1,16)}=0.007$; $p=0.93$, fase: $F_{(1,16)}=37.8$; $p<0.0001$, grupo: $F_{(1,16)}=0.02$; $p=0.88$) (Fig. 42).

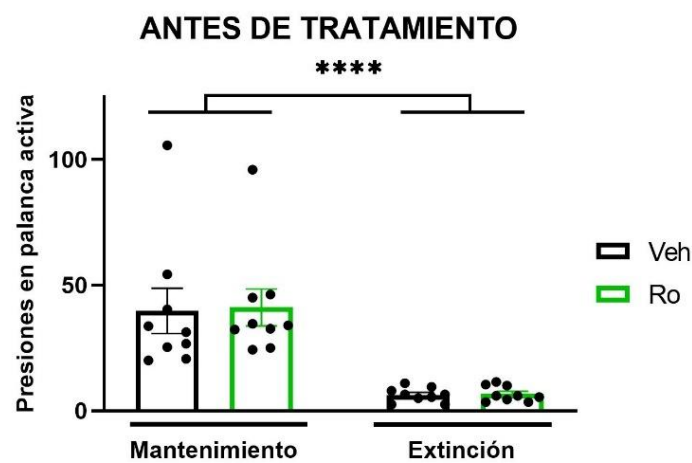


Figura 42 | Distribución de los animales sometidos a autoadministración de fentanilo en sesiones de 2 h en los grupos a tratar con Ro 61-8048 (Ro) o su vehículo (Veh). Se muestran los valores medios de presiones en la palanca activa obtenidos en las tres o dos últimas sesiones de mantenimiento o extinción, antes del tratamiento con Ro 61-8048. Los resultados se muestran como la media \pm EEM ($n=9$). El análisis estadístico se realizó empleando ANOVA de dos vías de medidas repetidas seguido por el test *post-hoc* de Sidak. **** $p<0.0001$ Mantenimiento vs. Extinción.

Cuando los animales se sometieron a la prueba de reinstauración observamos que el pretratamiento con Ro 61-8048 previno de forma estadísticamente significativa la reinstauración de la conducta de búsqueda de fentanilo expresada como número de respuestas sobre la palanca activa ($t_{(8)}=5.26$; $p=0.0008$, Welch's t-test), sin afectar a las respuestas sobre la palanca inactiva ($t_{(6)}=1.55$; $p=0.17$, Welch's t-test) (Fig. 43A).

RESULTADOS

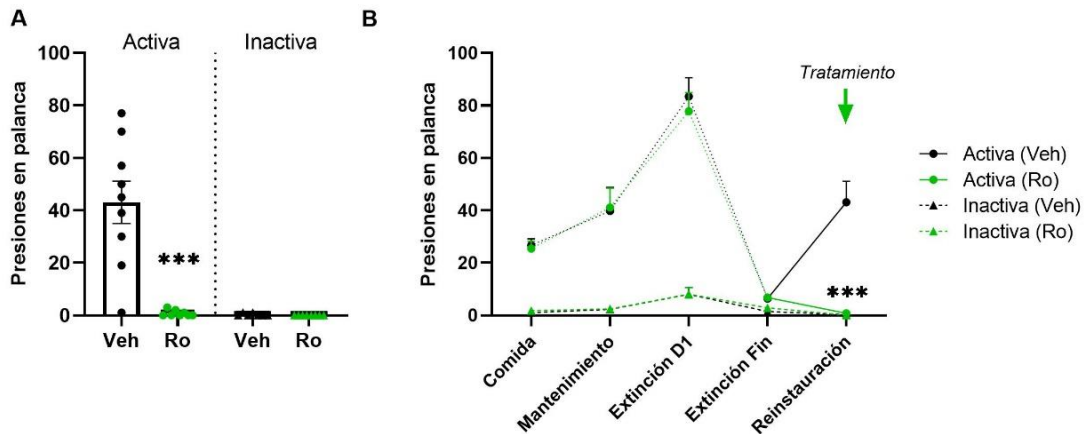


Figura 43 | Efecto del tratamiento con Ro 61-8048 sobre la reinstauración de la conducta de búsqueda de fentanilo inducida por estímulo condicionado en sesión de 2 h. Se muestra (A) el número de presiones de la palanca activa e inactiva en la prueba de reinstauración y (B) una gráfica resumen con el número medio de presiones en la palanca activa e inactiva para dos sesiones (comida, extinción fin), tres sesiones (mantenimiento) o una única sesión (Extinción D1, Reinstauración) en las diferentes fases. Solo se administró tratamiento en la prueba de reinstauración. Los datos se expresan como media \pm EEM ($n=7-9$). El análisis estadístico se realizó empleando el test de Student con corrección de Welch (Welch's t-test). ***: vs. Veh

2.2 Efecto de Ro 61-8048 sobre individuos expuestos a un paradigma de refuerzo de razón progresiva

Los animales fueron sometidos al protocolo de entrenamiento de conducta operante con comida y, posteriormente, a la adquisición de conducta de consumo de fentanilo hasta cumplir el criterio de estabilidad en la fase de mantenimiento. Una vez cumplido el criterio, los animales fueron expuestos al protocolo de refuerzo en razón progresiva (PR) hasta mostrar estabilidad en la última ratio alcanzada en la sesión (Fig. 44A). En base a este último parámetro y de forma homogénea ($t_{(18)}=0.09$; $p=0.92$), los animales fueron distribuidos en dos grupos para recibir, en la sesión inmediatamente posterior, vehículo o Ro 61-8048. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos en el número de presiones en la palanca activa ($t_{(18)}=0.18$; $p=0.86$) o inactiva ($t_{(18)}=1.16$; $p=0.26$) realizadas durante las tres sesiones de autoadministración bajo el paradigma de refuerzo en razón progresiva previas al tratamiento (Fig. 44B).

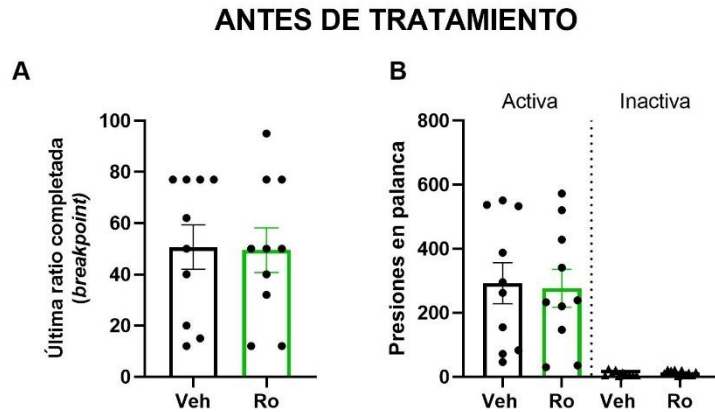


Figura 44 | Distribución de los animales y valores previos al tratamiento con Ro 61-8048 o su vehículo de los animales sometidos al paradigma de razón progresiva. Se muestra (A) la última ratio completada por cada animal que conllevó una infusión (conocido como *breakpoint*) en la sesión de autoadministración previa a la que se dio tratamiento con Ro 61-8048 y (B) el número medio de presiones en la palanca activa e inactiva en las tres sesiones previas al tratamiento. Los datos se expresan como media \pm EEM (n=10). El análisis estadístico se realizó empleando el test t de Student.

En la sesión inmediatamente posterior, el tratamiento con Ro 61-8048 no afectó a la conducta de los animales en ninguno de los parámetros medidos: última ratio completada para alcanzar una infusión o *breakpoint* ($t_{(9)}=0.7$; $p=0.5$), presiones en la palanca activa ($t_{(9)}=0.86$; $p=0.4$), inactiva ($t_{(9)}=1.22$; $p=0.25$) o duración de la sesión ($t_{(8)}=1.01$; $p=0.34$) (Fig. 45).

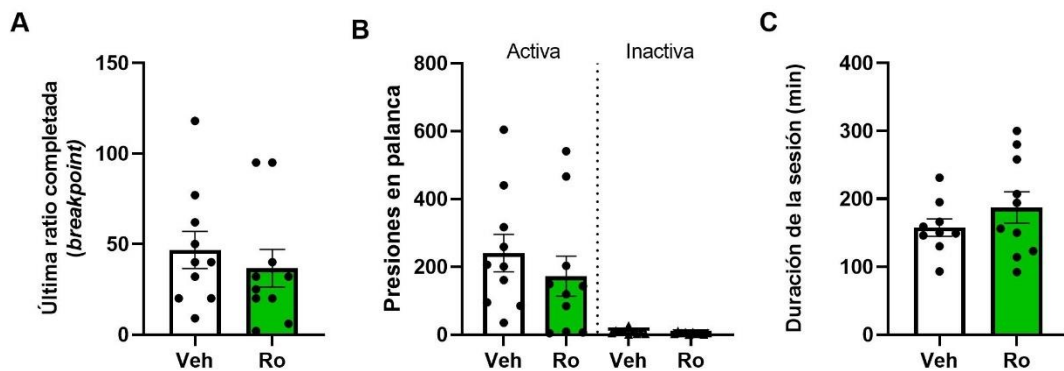


Figura 45 | Efecto del tratamiento con Ro 61-8048 sobre la autoadministración de fentanilo en el paradigma de refuerzo de razón progresiva. Se muestra (A) la última ratio completada por cada animal que conllevó una infusión (o *breakpoint*) en la sesión de autoadministración, (B) el número de presiones en la palanca activa e inactiva y (C) la duración de la sesión. Los datos se expresan como media \pm EEM (n=9-10). El análisis estadístico se realizó empleando el test t de Student.

2.3 Implicación de $\alpha 7nAChR$ sobre la modificación del consumo de fentanilo producida por Ro 61-8048

Para evaluar la implicación de los receptores $\alpha 7nACh$ sobre la disminución del consumo de fentanilo inducido por Ro 61-8048 se empleó el modulador alostérico positivo PNU-120596.

Una vez las ratas cumplieron el criterio de estabilidad en mantenimiento tras el previo entrenamiento de la conducta operante con comida y adquisición de la autoadministración de fentanilo, se sometió a los animales a tratamientos cruzados con una combinación de

RESULTADOS

Ro 61-8048, PNU-120596 o sus correspondientes vehículos. En primer lugar, los animales fueron distribuidos en base a su conducta de autoadministración de forma homogénea en cada uno de los cuatro grupos: PNU-120596 + Veh, PNU-120596 + Ro 61-8048, Veh+ Ro 61-8048, Veh + Veh. La conducta mostrada por los animales de forma previa a cada uno de los tratamientos no difirió en los distintos grupos en términos de número medio de infusiones obtenidas ($K=0.37$, $p=0.94$) o de respuestas en la palanca activa ($K=0.36$, $p=0.94$) o inactiva ($K=5.58$, $p=0.13$) en las tres sesiones previas al tratamiento (Fig. 46).

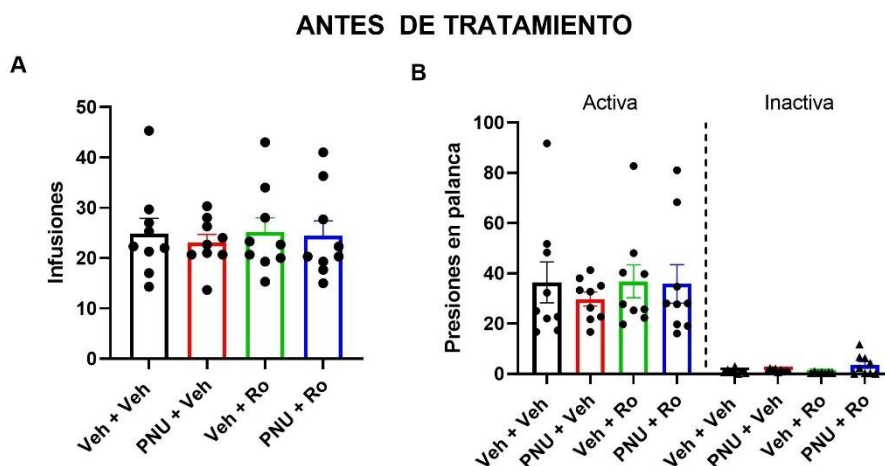


Figura 46 | Distribución y parámetros conductuales previos al tratamiento con PNU-120596 (8 mg/kg, i.p) y Ro 61-8048 (100 mg/kg, i.p.) de los animales sometidos a la prueba en el mantenimiento de la autoadministración de fentanilo. Se muestra (A) el número medio de infusiones y (B) de respuestas en palanca activa e inactiva durante las tres sesiones de autoadministración de fentanilo previas al tratamiento. Los datos se expresan como media \pm EEM ($n=7-9$). El análisis estadístico se realizó empleando el test de Kruskal-Wallis.

Tras el tratamiento de los animales, el análisis mediante ANOVA de dos vías mostró que el tratamiento con Ro 61-8048 fue el único factor estadísticamente significativo en términos del número de infusiones ($F_{(1,31)}=38.46$; $p<0.0001$) (Fig. 47A) y presiones en la palanca activa ($F_{(1,30)}=32.72$; $p<0.0001$) (Fig. 47B). La administración de PNU-120596 no afectó al número de infusiones ($F_{(1,31)}=1.2$; $p=0.28$) ni de presiones en la palanca activa ($F_{(1,30)}=0.0007$; $p=0.98$), como tampoco lo hizo la interacción entre ambos tratamientos (infusiones: $F_{(1,31)}=1.3$; $p=0.26$, activa: $F_{(1,30)}=0.08$; $p=0.78$). Ni Ro 61-8048 ($F_{(1,32)}=2.58$; $p=0.11$), ni PNU-120596 ($F_{(1,32)}=0.05$; $p=0.82$), así como tampoco la interacción entre ambos tratamientos ($F_{(1,32)}=0.05$; $p=0.82$) produjeron diferencias estadísticamente significativas en la pulsación de la palanca inactiva (Fig. 47B).

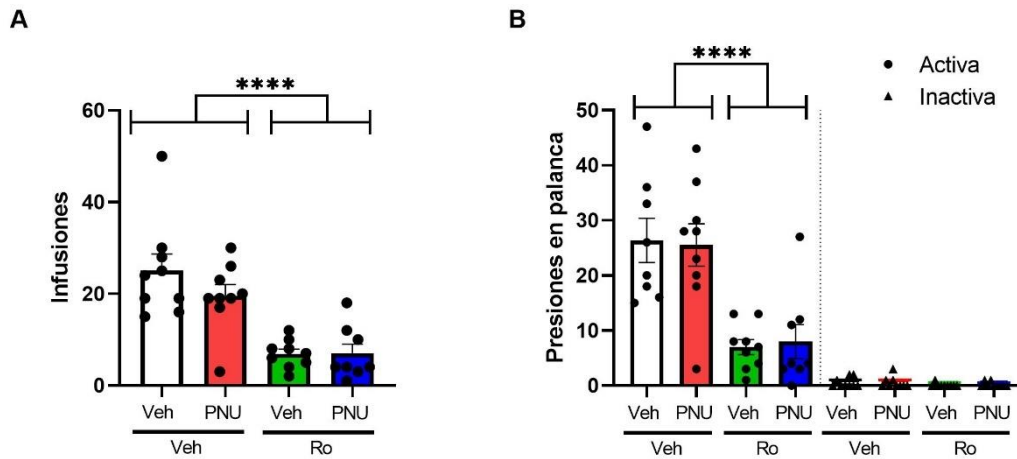


Figura 47 | Efecto del tratamiento con PNU-120596 en la disminución del consumo de fentanilo en mantenimiento inducido por Ro 61-8048. Se muestra (A) el número de infusiones obtenidas y (B) de presiones en la palanca activa e inactiva realizadas por los animales. Los datos se expresan como media \pm EEM (n=7-9). El análisis estadístico se realizó empleando ANOVA de dos vías. **** p<0.0001: Ro vs. Veh.

2.4 Implicación de NMDAR sobre la modificación del consumo de fentanilo producida por Ro 61-8048

Para evaluar la implicación de los receptores NMDA sobre la modificación del consumo de fentanilo producida por Ro 61-8048, se realizó un pretratamiento en los animales con el agonista competitivo en el sitio de glicina del receptor NMDA, D-Serina (800 mg/kg, i.p).

En este estudio se emplearon animales que habían desarrollado dependencia al fentanilo al haber cumplido previamente el criterio de estabilidad en el consumo de fentanilo durante la fase de mantenimiento. Los animales se distribuyeron de forma homogénea en dos grupos de tratamiento (Veh + Ro 61-8048 o D-Ser + Ro 61-8048) en base a su conducta previa, sin que existieran diferencias estadísticamente significativas en términos del número medio de infusiones obtenidas ($t_{(8)}=0.55$; $p=0.59$) o de presiones en la palanca activa ($t_{(8)}=0.71$; $p=0.5$) o inactiva ($t_{(8)}=0.35$; $p=0.73$) realizadas de media en las tres sesiones previas al tratamiento (Fig. 48).

ANTES DE TRATAMIENTO

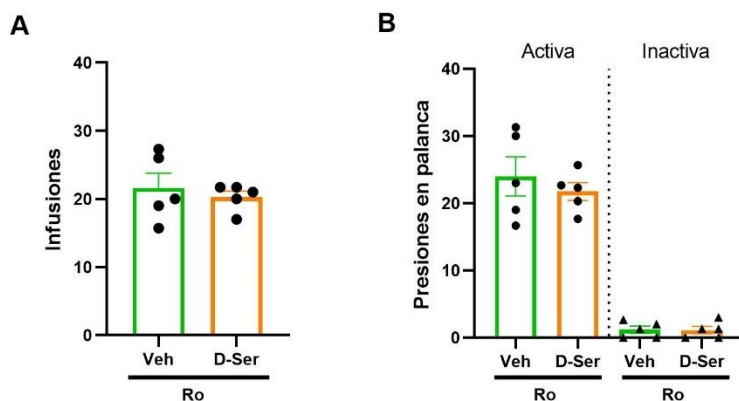


Figura 48 | Distribución de los animales y valores previos al tratamiento con D-Serina (D-Ser, 800 mg/kg, i.p) y Ro 61-8048 (Ro, 100 mg/kg, i.p) en la autoadministración de fentanilo. Se muestra (A) el número medio de infusiones obtenidas y (B) de presiones en la palanca activa e inactiva en las tres sesiones de autoadministración de fentanilo previas al tratamiento. Los datos se expresan como media \pm EEM (n=5).

El tratamiento con D-Serina no alteró la disminución en el consumo de fentanilo producida por Ro 61-8048, como se pudo observar en términos del número de infusiones obtenidas por los animales ($t_9=0.03$; $p=0.97$) (Fig. 49A). Asimismo, el número de presiones de la palanca activa ($t_9=0.11$; $p=0.91$) o inactiva ($t_4=1.61$; $p=0.18$) tampoco se vio afectado por el tratamiento con D-Ser (Fig. 49B).

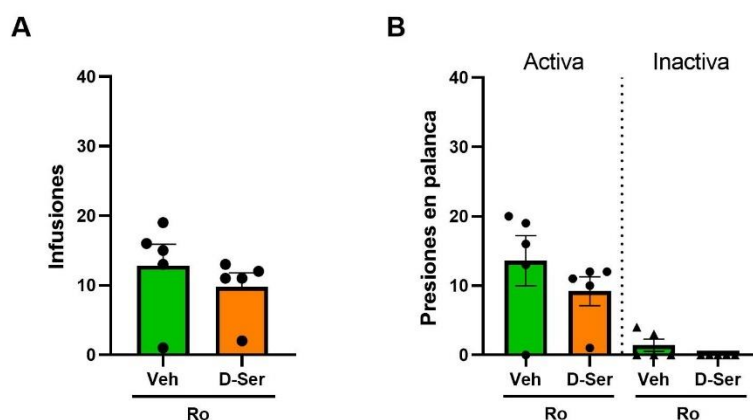


Figura 49 | Efecto del tratamiento con D-Serina sobre la disminución del consumo de fentanilo inducida por Ro 61-8048. Se muestra (A) el número de infusiones obtenidas y (B) de presiones en la palanca activa e inactiva realizadas por los animales. Los datos se expresan como media \pm EEM (n=5). El análisis estadístico se realizó empleando el test t de Student para infusiones y presiones en la palanca activa, y el Welch's t-test para la inactiva.

2.5 Efecto de Ro 61-8048 sobre la función locomotora

2.5.1 Efecto de Ro 61-8048 en la prueba de exploración en campo abierto

Para evaluar el efecto de Ro 61-8048 sobre la actividad locomotora espontánea y la conducta exploratoria asociada a ansiedad se emplearon ratas *naïve* a fentanilo. Estas ratas fueron aclimatadas durante tres sesiones de 30 min en un equipo de campo abierto, en tres días consecutivos, para analizar la distancia total recorrida y asignar de forma

homogénea a los animales a los grupos de tratamiento con Ro 61-8048 o su vehículo ($t_{(12)}=0.18$; $p=0.86$) (Fig. 50).

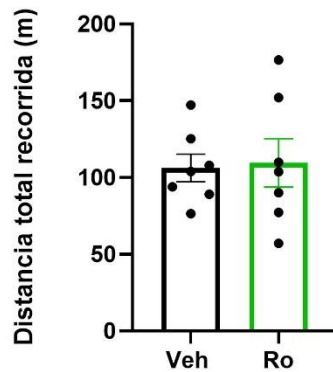


Figura 50 | Distribución de los animales y valores previos al tratamiento con Ro 61-8048 (100 mg/kg, i.p) en la prueba de campo abierto. Se muestra la distancia total media recorrida durante las tres sesiones de aclimatación a la prueba. Los datos se expresan como media \pm EEM ($n=7$). El análisis estadístico se realizó empleando el test t de Student.

Treinta minutos antes del inicio de la siguiente sesión, los animales fueron tratados con Ro 61-8048 o su vehículo y se sometieron a la prueba de campo abierto. El tratamiento con Ro 61-8048 produjo una disminución estadísticamente significativa de la distancia total recorrida ($t_{(12)}=5.22$; $p=0.0002$) y del tiempo de estancia en el área central del equipo ($t_{(12)}=3.32$; $p=0.006$), y un incremento del tiempo de estancia en el área periférica del equipo ($t_{(12)}=3.23$; $p=0.006$) (Fig. 51).

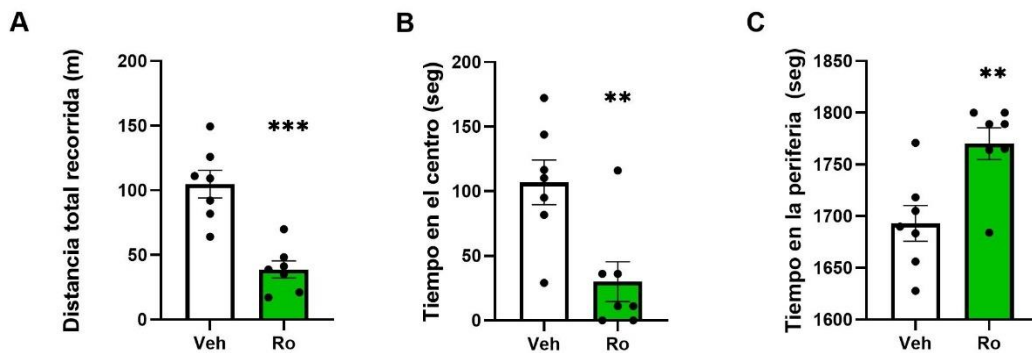


Figura 51 | Efecto del tratamiento con Ro 61-8048 (100 mg/kg, i.p) en la actividad locomotora espontánea y conducta exploratoria indicativa de ansiedad en la prueba de campo abierto. Se muestra (A) la distancia total recorrida y (B) el tiempo de estancia en el área central y (C) periférica del equipo. Los datos se expresan como media \pm EEM ($n=7$). El análisis estadístico se realizó empleando el test t de Student. ** $p<0.01$, *** $p<0.001$: vs. Veh.

2.5.2 Efecto de Ro 61-8048 en la prueba de *Rotarod*

Evaluamos el efecto de Ro 61-8048 sobre el comportamiento motor motivado, la fatiga y el equilibrio en el mismo grupo de animales empleados en la prueba de campo abierto usando la prueba de *Rotarod*.

En primer lugar, los animales fueron entrenados en el dispositivo hasta mostrar cierta estabilidad en la habilidad para permanecer en el rodillo móvil. Con los valores medios de los datos de latencia de caída obtenidos en las últimas cuatro sesiones de entrenamiento ($t_{(12)}=0.15$; $p=0.88$) (Fig. 52A) y teniendo en cuenta que el peso del animal puede jugar

RESULTADOS

un papel relevante en esta prueba ($t_{(12)}=0.17$; $p=0.87$) (Fig. 52B), los animales fueron distribuidos en grupos homogéneos para el tratamiento con Ro 61-8048 o su vehículo.

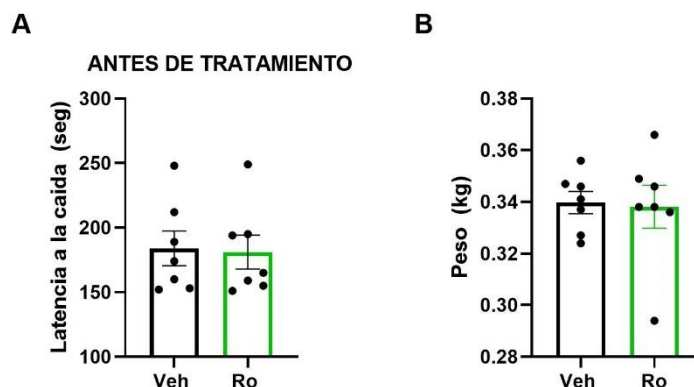


Figura 52 | Distribución de los animales y valores previos al tratamiento con Ro 61-8048 (100 mg/kg, i.p) en la prueba de *Rotarod*. Se muestra la latencia de caída media en las últimas cuatro sesiones de entrenamiento. Los datos se expresan como media \pm EEM (n= 7).

El día del tratamiento con Ro 61-8048 (100 mg/kg, i.p) los animales fueron sometidos a tres ensayos en el rodillo móvil 30 min después de la administración del compuesto, con un intervalo de 15 min entre ensayos tal como se realizó en las sesiones de entrenamiento. El valor promedio de la latencia a la caída en estos tres ensayos no se vio afectado por el tratamiento con Ro 61-8048 ($t_{(12)}=0.89$; $p=0.39$) (Fig. 53).

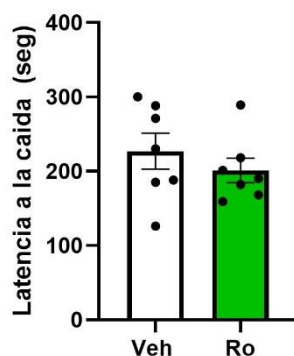


Figura 53 | Efecto del tratamiento con Ro 61-8048 (100 mg/kg, i.p) en la prueba de *Rotarod*. Se muestra la latencia a la caída de los animales. Los datos se expresan como media \pm EEM (n=7). El análisis estadístico se realizó empleando el test t de Student.

2.6 Efecto de Ro 61-8048 en la conducta adictiva inducida por fentanilo en animales sometidos al modelo de dolor neuropático *spared nerve injury* (SNI)

Con el objetivo de determinar si la conducta adictiva inducida por consumo de fentanilo, así como el efecto de Ro 61-8048 sobre dicha conducta difieren en animales que experimentan dolor, analizamos las distintas fases de la conducta adictiva y el efecto Ro 61-8048 en animales sometidos al modelo de dolor neuropático *spared nerve injury* (SNI). Además de evaluar la conducta operante para obtener o buscar fentanilo, se estudió la alodinia mecánica generada por el modelo SNI.

Previo a la fase de adquisición, los animales fueron sometidos al protocolo de entrenamiento con comida y fueron distribuidos de forma pseudoaleatoria y homogénea

en los dos grupos SNI y *sham* en base a su conducta durante el entrenamiento con comida y a los valores basales (antes de la cirugía SNI) del test de los filamentos de Von Frey para medir alodinia mecánica. No se observaron diferencias significativas antes de la cirugía de inducción de dolor neuropático en la ingesta de pellets ($U=0.66$; $p=0.66$) (Fig. 54A) o las respuestas en la palanca activa ($U=240$; $p=0.96$) o inactiva ($t_{(37)}=1.93$; $p=0.06$) durante el entrenamiento con comida (Fig. 54B). Tampoco se observaron diferencias en el umbral de respuesta en el test de Von Frey en la pata izquierda ($t_{(42)}=0.09$; $p=0.93$) o derecha ($t_{(42)}=0.11$; $p=0.91$) (Fig. 54C). Tras la cirugía, se confirmó la validez del modelo al producir alodinia mecánica evidenciada por una disminución estadísticamente significativa en el umbral de la pata izquierda, sin cambios en la pata derecha (Fig. 54D).

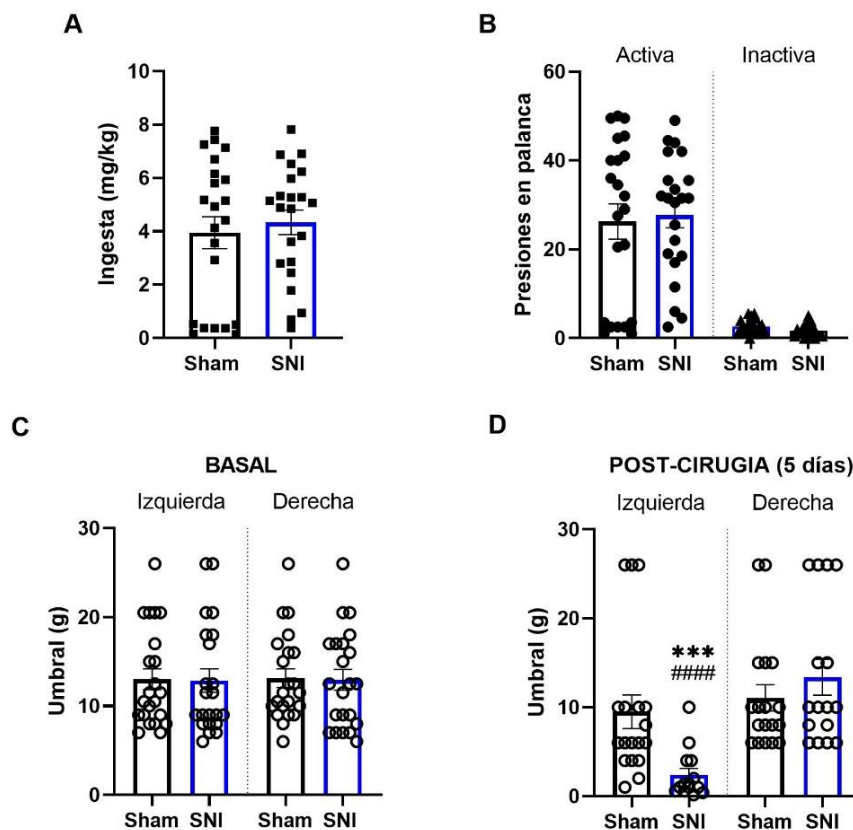


Figura 54 | Distribución de los animales y valores previos a la cirugía SNI o simulada (*Sham*) y efecto alodínico del modelo SNI. Se muestra (A) la ingesta media de pellets, (B) el número medio de presiones en palanca activa e inactiva en las dos últimas sesiones de entrenamiento con comida y (C) el umbral obtenido en el test de Von Frey antes de la intervención quirúrgica y (D) cinco días después. Los datos se expresan como media \pm EEM ($n=14-22$). El análisis estadístico se realizó empleando el test t de Student (palanca inactiva, umbral) o de Mann-Whitney (ingesta, palanca activa). *** $p<0.001$: vs. SNI-pata derecha. ##### $p<0.0001$: vs. *Sham*-pata izquierda.

2.6.1 Adquisición

Se evaluaron el número de infusiones de fentanilo, así como las respuestas en las palancas activa e inactiva, durante las diez primeros días de autoadministración en los animales sometidos a dolor neuropático y en sus controles *sham*.

No se encontraron diferencias significativas en la adquisición de autoadministración de fentanilo entre las ratas SNI y los controles *sham* en términos de infusiones obtenidas ($F_{(1,33)}=0.45$; $p=0.5$) (Fig. 55A) ni en el número de respuestas sobre la palanca activa

RESULTADOS

($F_{(1,33)}=1.07$; $p=0.31$) (Fig. 55B). Sin embargo, en el número de respuestas en la palanca inactiva, el procedimiento SNI generó diferencias estadísticamente significativas en comparación con el grupo *sham* ($F_{(1,33)}=5.73$; $p=0.022$), así como la sesión ($F_{(4,144)}=2.44$; $p=0.044$) y la interacción entre ambos factores ($F_{(9,296)}=2.91$; $p=0.026$). En el análisis de las respuestas en la palanca activa, la sesión de autoadministración fue estadísticamente significativa como factor principal ($F_{(2,50)}=4.93$; $p=0.018$) al igual que la interacción entre los factores ($F_{(9,297)}=1.93$; $p=0.048$). En términos de infusiones, además de la falta de efecto inducida por el modelo SNI ya mencionada, la sesión de adquisición ($F_{(1,48)}=22.79$; $p=0.064$) no resultó significativa, pero sí lo fue la interacción entre los factores SNI y sesión de adquisición ($F_{(9,297)}=3.154$; $p=0.0012$).

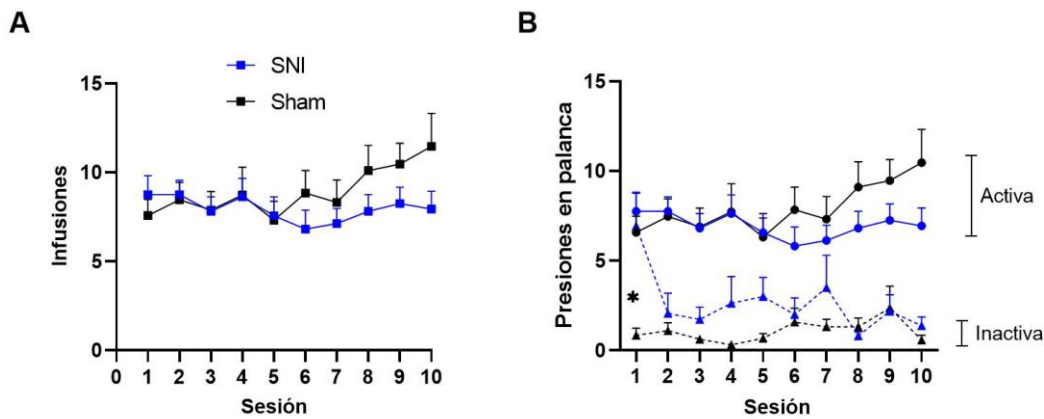


Figura 55 | Adquisición de la conducta de obtención de fentanilo por animales SNI y *sham*. Se muestra (A) el número de infusiones y (B) el número de presiones en la palanca activa e inactiva durante las diez primeras sesiones de autoadministración de fentanilo. Los datos se expresan como media \pm EEM ($n=14-19$). El análisis estadístico se realizó empleando ANOVA de dos vías (Infusiones, palanca activa) o análisis de efectos mixtos (palanca inactiva) seguidos del test *post-hoc* de Sidak. * $p<0.05$: vs. SNI.

2.6.2 Mantenimiento

Antes de evaluar el efecto de Ro 61-8048 en la fase de mantenimiento de la conducta adictiva en animales sometidos al modelo de dolor neuropático, los animales SNI y *sham* fueron distribuidos de manera homogénea en grupos que se destinarían al tratamiento futuro con Ro 61-8048 o su vehículo. No se encontraron diferencias significativas entre ninguno de los cuatro grupos en términos del promedio de infusiones ($F_{(3,30)}=1.07$; $p=0.38$), presiones en la palanca activa ($F_{(3,30)}=0.87$; $p=0.47$) o inactiva ($F_{(3,30)}=1.26$; $p=0.3$) en las tres sesiones inmediatamente previas a la sesión de tratamiento con Ro 61-8048 (Fig. 56).

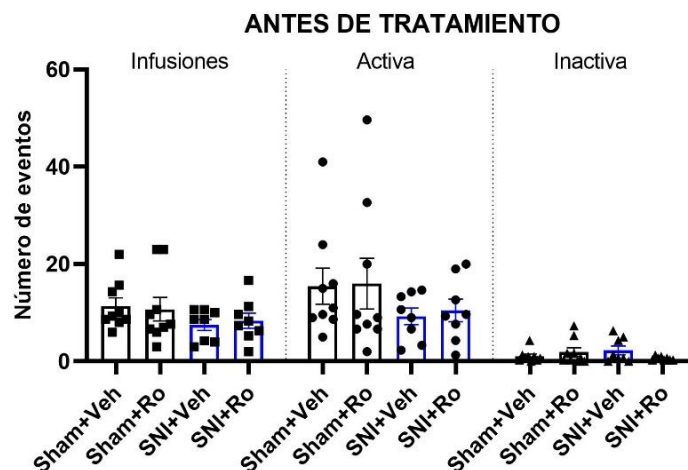


Figura 56 | Distribución de los animales sometidos al modelo de dolor neuropático SNI previo al tratamiento con Ro 61-8048 en fase de mantenimiento. Se muestra el número promedio de infusiones y presiones en la palanca activa e inactiva en las tres sesiones previas al tratamiento con Ro 61-8048. Los datos se expresan como media \pm EEM (n=8-9). El análisis estadístico se realizó empleando ANOVA de una vía.

En la sesión con tratamiento de Ro 61-8048, el inhibidor de KMO provocó una disminución significativa en el número de infusiones obtenidas ($F_{(1,30)}=29.02$; $p<0.0001$), así como el modelo SNI ($F_{(1,30)}=4.28$; $p=0.03$). No se observó una interacción estadísticamente significativa entre ambos factores principales en el ANOVA de dos vías ($F_{(1,30)}=0.003$; $p=0.096$) (Fig. 57).

En cuanto a las respuestas en la palanca activa, solo el factor del tratamiento con Ro 61-8048 mostró un efecto estadísticamente significativo ($F_{(1,30)}=29.02$; $p<0.0001$). El modelo de dolor neuropático SNI no tuvo un efecto significativo ($F_{(1,28)}=1.58$; $p=0.22$), y la interacción entre el tratamiento con Ro 61-8048 y el modelo SNI tampoco fue significativa ($F_{(1,28)}=0.016$; $p=0.92$) (Fig. 57).

Las respuestas en la palanca inactiva durante la sesión no fueron afectadas significativamente por el tratamiento con Ro 61-8048 ($F_{(1,28)}=2.21$; $p=0.14$), el modelo SNI ($F_{(1,28)}=2.21$; $p=0.15$), ni por la interacción entre ambos factores ($F_{(1,28)}=2.21$; $p=0.15$) (Fig. 57).

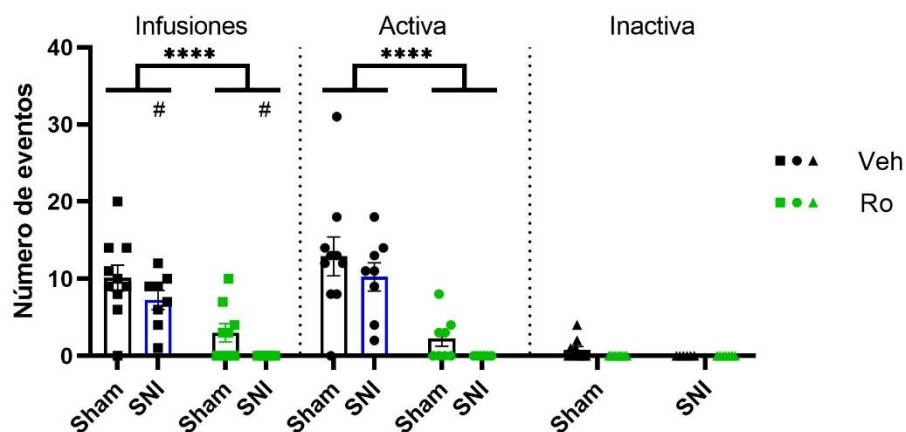


Figura 57 | Efecto del tratamiento con Ro 61-8048 en el mantenimiento de consumo de fentanilo en animales sometidos al modelo de dolor neuropático SNI. Se muestra el número de infusiones obtenidas y de presiones en la palanca activa e inactiva realizadas por los animales durante la sesión de autoadministración de 1 h. Los datos se expresan como media ± EEM (n=6-10). El análisis estadístico se realizó empleando ANOVA de dos vías. ****p<0.0001: Ro vs. Veh. # p<0.05: SNI vs. Sham

2.6.3 Extinción

Se analizó la extinción de la conducta de búsqueda de fentanilo en las ratas sometidas al modelo de dolor neuropático para determinar si existían diferencias en comparación con las ratas sham. El único factor principal que mostró un efecto estadísticamente significativo en el análisis de efectos mixtos fue la sesión de extinción, tanto en términos de respuestas en la palanca activa ($F_{(3,73)}=52.27$; $p<0.0001$) como en la palanca inactiva ($F_{(4,104)}=9.71$; $p<0.0001$). El dolor neuropático provocado por la intervención SNI y la interacción entre el modelo SNI y la sesión de extinción no produjeron alteraciones significativas en la extinción de la conducta de búsqueda de fentanilo, ni en las respuestas sobre la palanca activa (SNI: $F_{(1,30)}=0.029$; $p<0.86$, interacción: $F_{(9,263)}=0.28$; $p=0.98$) ni en la palancas inactiva (SNI: $F_{(1,30)}=0.45$; $p=0.51$; interacción: $F_{(9,253)}=1.1$; $p=0.36$) (Fig. 58).

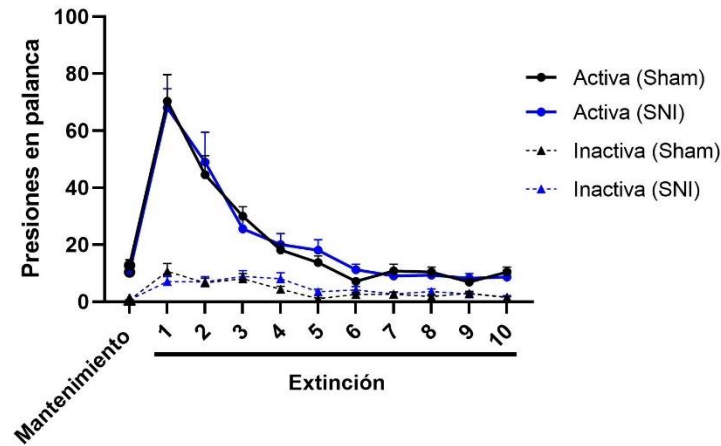


Figura 58 | Efecto del modelo de dolor neuropático SNI sobre la extinción de la conducta de búsqueda de fentanilo. Se muestra el número de presiones en la palanca activa e inactiva realizadas por los animales en las diez sesiones de extinción y el valor promedio de las últimas tres sesiones de consumo de fentanilo previos al inicio de la extinción (mantenimiento). Los datos se expresan como media ± EEM (n=13-17). El análisis estadístico se realizó empleando análisis de efectos mixtos.

2.6.4 Reinstauración inducida por estímulo condicionado

Se llevo a cabo el protocolo de reinstauración inducida por estímulo condicionado en animales sometidos al modelo de dolor neuropático para evaluar el efecto de Ro 61-8048 en este contexto.

El análisis mediante ANOVA de dos vías mostró que el tratamiento con Ro 61-8048 fue el único factor principal que mostró una diferencia estadísticamente significativa, tanto en términos de respuestas en la palanca activa ($F_{(1,26)}=44.11$; $p<0.0001$) como en la inactiva ($F_{(1,26)}=10.49$; $p=0.003$). La intervención para inducir dolor neuropático mediante el modelo SNI y la interacción entre este modelo y el tratamiento con Ro 61-8048 no provocaron alteraciones significativas en el número de respuestas en la palanca activa (SNI: $F_{(1,26)}=1.11$; $p=0.3$; interacción: $F_{(1,26)}=1.02$; $p=0.32$) ni en la inactiva (SNI: $F_{(1,26)}=0.033$; $p=0.86$; interacción: $F_{(1,26)}=0.032$; $p=0.86$) (Fig. 59).

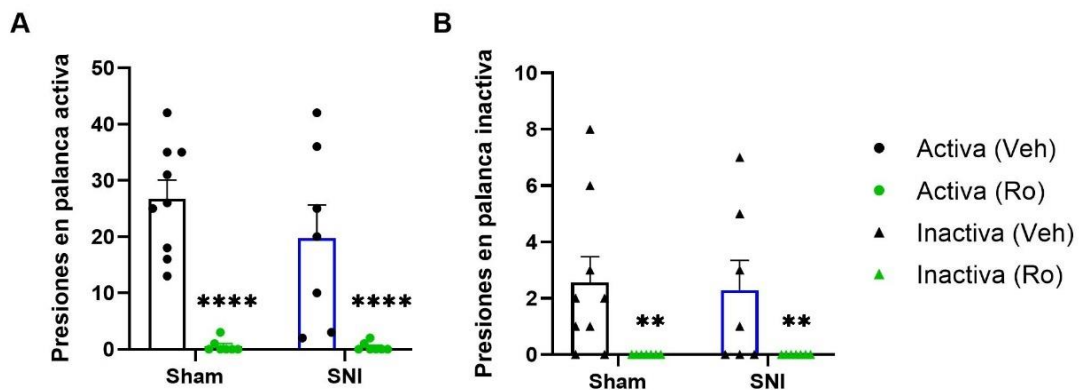


Figura 59 | Efecto del tratamiento con Ro 61-8048 sobre la reinstauración de la conducta de búsqueda de fentanilo inducida por estímulo condicionado en animales sometidos al modelo de dolor neuropático SNI. Se muestra el número de presiones en la (A) palanca activa e (B) inactiva en la prueba de reinstauración. Los datos se expresan como media ± EEM (n=7-9). El análisis estadístico se realizó empleando ANOVA de dos vías. **** $p<0.0001$, ** $p<0.01$ vs. Veh.

2.6.5 Reinstauración inducida por fentanilo

Tras la prueba de reinstauración inducida por estímulo condicionado, los animales fueron sometidos a una fase adicional de extinción (reextinción) de la conducta de búsqueda durante diez sesiones, seguida de una segunda reinstauración, esta vez inducida por una dosis no contingente de fentanilo de 15 µg/kg s.c.

El análisis de efectos mixtos de las respuestas en la palanca activa durante las diez sesiones de reextinción no mostró diferencias significativas respecto a los factores analizados: el modelo de dolor neuropático (SNI: $F_{(1,30)}=1.32$; $p=0.26$), las sesiones de reextinción ($F_{(3,95)}=1.91$; $p=0.13$), ni la interacción entre estos factores ($F_{(9,262)}=0.75$; $p=0.67$). Por su parte, las sesiones de reextinción sí mostraron un efecto significativo en el análisis de las respuestas en la palanca inactiva ($F_{(5,112)}=2.55$; $p=0.036$). La interacción entre las sesiones y el modelo SNI ($F_{(9,217)}=1.82$; $p=0.066$), así como el modelo SNI por sí mismo ($F_{(1,27)}=1.21$; $p=0.28$) no generaron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a las respuestas en la palanca inactiva. Además, el análisis con el test t de Student no mostró diferencias estadísticamente significativas entre el promedio de respuestas de cada grupo en la palanca activa ($t_{(30)}=1.06$; $p=0.3$) y en la palanca inactiva ($t_{(30)}=0.98$; $p=0.34$) durante las dos últimas sesiones de reextinción (Fig. 60).

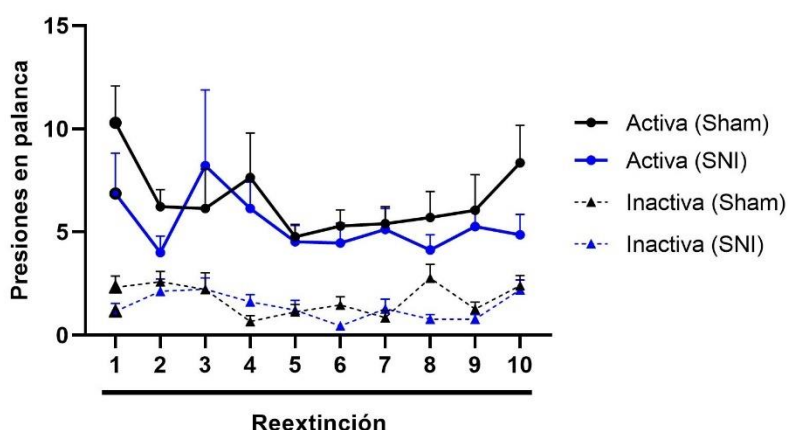


Figura 60 | Efecto del tratamiento previo con Ro 61-8048 sobre la reextinción de la conducta de búsqueda de fentanilo en animales sometidos al modelo de dolor neuropático SNI. Se muestra el número de presiones en la palanca activa e inactiva realizadas por los animales en las diez sesiones de reextinción sin ser expuestos a ningún tratamiento. Los datos se expresan como media ± EEM (n=13-17). El análisis estadístico se realizó empleando análisis de efectos mixtos.

En la sesión posterior a la última sesión de reextinción, los animales recibieron un pretratamiento con Ro 61-8048 (100 mg/kg i.p, 30 min antes de la sesión) y se les administró fentanilo (15 µg/kg s.c.) inmediatamente antes del inicio de la prueba de reinstauración.

Ninguno de los factores mostró un efecto estadísticamente significativo en la prueba de reinstauración respecto a las respuestas en la palanca activa: Ro 61-8048 ($F_{(1,26)}=3.96$; $p=0.057$), SNI ($F_{(1,26)}=2.64$; $p=0.12$) o la interacción de ambos ($F_{(1,26)}=3.18$; $p=0.09$).

En cuanto a las respuestas en la palanca inactiva, el tratamiento con Ro 61-8048 sí provocó una disminución significativa en este parámetro conductual ($F_{(1,25)}=7.7$; $p=0.0103$). Por otro lado, el dolor neuropático inducido por el modelo SNI no mostró un

efecto significativo ($F_{(1,25)}=0.53$; $p=0.47$), y la interacción entre Ro 61-8048 y el modelo SNI tampoco tuvo un impacto significativo ($F_{(1,25)}=0.53$; $p=0.47$).

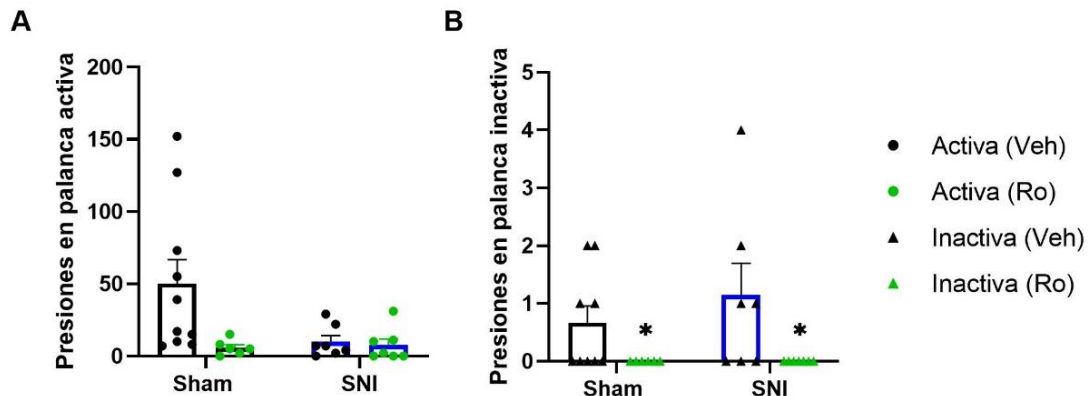


Figura 61 | Efecto del tratamiento con Ro 61-8048 en la reinstauración de la conducta de búsqueda de fentanilo inducida por fentanilo en animales sometidos al modelo de dolor neuropático SNI. Se muestra el número de presiones en (A) la palanca activa e (B) inactiva en la prueba de reinstauración. Los datos se expresan como media \pm EEM ($n=6-10$). El análisis estadístico se realizó empleando ANOVA de dos vías. * $p<0.05$: vs. Veh.

2.7 Efecto de Ro 61-8048 y la autoadministración de fentanilo sobre la alodinia inducida por el modelo de dolor neuropático *spared nerve injury*

Se llevaron a cabo múltiples mediciones de alodinia mecánica mediante el test de Von Frey a lo largo del experimento con el objetivo de:

- Evaluar el efecto del fentanilo: se midió la alodinia mecánica antes y después de la sesión de autoadministración de fentanilo para determinar su impacto en la sensibilidad mecánica. Esto se llevó a cabo en la primera sesión de adquisición.
- Analizar el efecto de Ro 61-8048 en ausencia y presencia de fentanilo: se evaluó cómo el tratamiento con Ro 61-8048 afectaba la alodinia mecánica en condiciones de reinstauración inducida por estímulo condicionado (sin fentanilo) y durante la fase de mantenimiento (con fentanilo).
- Determinar la duración del efecto de la alodinia mecánica inducida por el modelo SNI.

Catorce días después de la intervención con el modelo SNI, se introdujo a los animales en las cámaras de autoadministración por primera vez. Durante este período, se evaluó la alodinia mecánica utilizando el test de Von Frey antes y después de la sesión de autoadministración para determinar el efecto del fentanilo sobre la sensibilidad mecánica en animales que habían sido sometidos al modelo de dolor neuropático. En la pata izquierda, que estaba afectada por el modelo de dolor SNI, se observaron efectos estadísticamente significativos tanto del modelo de dolor ($F_{(1,61)}=130.9$; $p<0.0001$) como del fentanilo administrado durante la sesión de autoadministración ($F_{(1,61)}=5.479$; $p=0.023$). Sin embargo, la interacción entre ambos factores no resultó significativa en el ANOVA de dos vías ($F_{(1,61)}=0.003$; $p=0.96$). En la pata derecha, solo la sesión de autoadministración de fentanilo mostró un efecto estadísticamente significativo ($F_{(1,64)}=6.36$; $p=0.014$). El modelo SNI no alteró el umbral de dolor en la pata derecha

RESULTADOS

($F_{(1,64)}=3.45$; $p=0.067$) y la interacción entre la autoadministración de fentanilo y la intervención SNI tampoco resultó significativa ($F_{(1,64)}=2.7$; $p=0.11$) (Fig. 62).

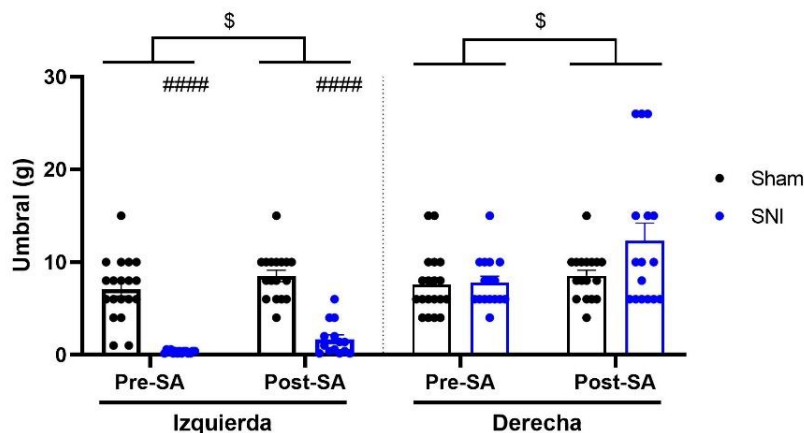


Figura 62 | Efecto de la autoadministración de fentanilo sobre la alodinia mecánica inducida por el modelo SNI en la primera sesión de autoadministración. Se muestra el umbral nociceptivo en la pata izquierda (intervenida con SNI) y la pata derecha antes (Pre-SA) y después (Post-SA) de la sesión de autoadministración. Los datos se expresan como media \pm EEM ($n=14-19$). El análisis estadístico se realizó empleando análisis de efectos mixtos. \$ $p<0.05$: Post-SA vs. Pre-SA. #### $p<0.0001$: vs. Sham.

Las siguientes medidas de umbral nociceptivo se realizaron el día 24 después de la intervención SNI, junto con el tratamiento con Ro 61-8048 durante la fase de mantenimiento.

Para el análisis de los datos se empleó un análisis de efectos mixtos, considerando tres factores: la sesión de autoadministración de fentanilo (Pre-SA, Post-SA), la intervención SNI y el tratamiento con Ro 61-8048. Solo el modelo de dolor SNI ($F_{(1,27)}=57.76$; $p<0.0001$) y la autoadministración de fentanilo ($F_{(1,26)}=11$; $p=0.027$) tuvieron un efecto estadísticamente significativo sobre el umbral nociceptivo en la pata izquierda (Fig. 63A). Los otros factores y sus interacciones no fueron significativos: Ro 61-8048 ($F_{(1,27)}=0.012$; $p=0.91$), autoadministración de fentanilo x SNI ($F_{(1,26)}=1.92$; $p=0.17$), autoadministración de fentanilo x Ro 61-8048 ($F_{(1,26)}=0.08$; $p=0.77$), SNI x Ro 61-8048 ($F_{(1,26)}=2.18$; $p=0.15$), ni la interacción tripartita entre autoadministración de fentanilo x SNI x Ro 61-8048 ($F_{(1,26)}=3.13$; $p=0.089$).

En cuanto a la pata no intervenida (derecha), ninguno de los factores o interacciones afectaron el umbral nociceptivo (Fig. 63B) (autoadministración de fentanilo: $F_{(1,27)}=3.07$; $p=0.091$, SNI: $F_{(1,28)}=3.67$; $p=0.065$, Ro 61-8048: $F_{(1,27)}=2.4$; $p=0.13$, autoadministración de fentanilo x SNI: $F_{(1,27)}=3.14$; $p=0.088$, autoadministración de fentanilo x Ro 61-8048: $F_{(1,27)}=0.23$; $p=0.64$, SNI x Ro 61-8048: $F_{(1,28)}=0.15$; $p=0.7$, autoadministración de fentanilo x SNI x Ro 61-8048: $F_{(1,27)}=2.73$; $p=0.11$).

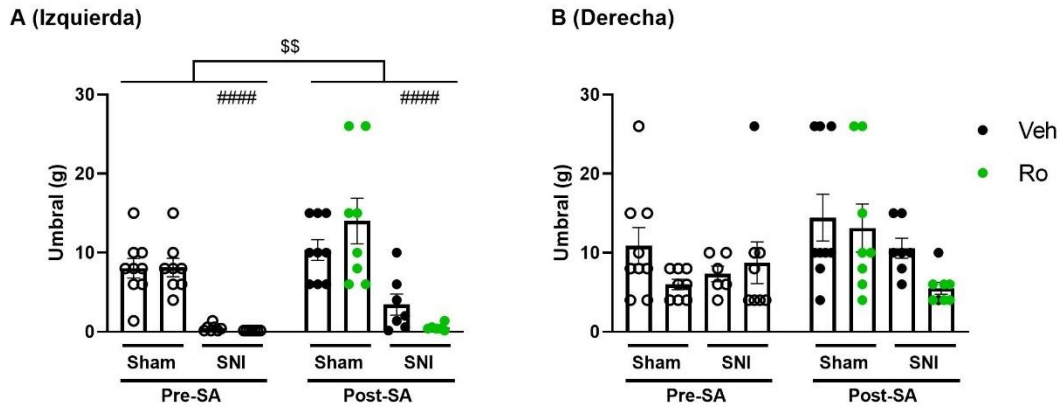


Figura 63 | Efecto de la autoadministración de fentanilo y el tratamiento con Ro 61-8048 sobre la alodinia mecánica inducida por el modelo SNI en fase de mantenimiento. Se muestra el umbral nociceptivo en (A) la pata izquierda (intervenida con SNI) y (B) la pata derecha, antes (Pre-SA) y después (Post-SA) de la sesión de autoadministración. Los datos se expresan como media \pm EEM (n=6-9). El análisis estadístico se realizó empleando de efectos mixtos. \$\$ $p < 0.01$: Post-SA vs. Pre-SA. #### $p < 0.0001$: vs. Sham.

Finalmente, se evaluó el umbral nociceptivo en el contexto de la reinstauración inducida por estímulo condicionado, en paralelo con el tratamiento con Ro 61-8048. Aunque en este experimento los animales no se autoadministraron fentanilo, se incluyeron como factores en el análisis la intervención SNI, el tratamiento con Ro 61-8048 y la sesión de autoadministración con salino (Pre-SA, Post-SA), considerando el posible impacto que podría tener el *craving* en este test. En la evaluación del umbral nociceptivo en la pata izquierda (Fig. 64A), se encontraron efectos estadísticamente significativos para los siguientes factores y sus interacciones: el modelo SNI ($F_{(1,28)}=80.31$; $p < 0.0001$), la interacción entre el tratamiento con Ro 61-8048 y la sesión de autoadministración de salino ($F_{(1,27)}=5.55$; $p=0.026$) y la interacción tripartita entre los factores SNI, Ro 61-8048 y sesión de autoadministración de salino ($F_{(1,27)}=4.72$; $p=0.0038$). Por otro lado, los siguientes factores y sus interacciones no mostraron efectos estadísticamente significativos: la sesión de autoadministración de salino ($F_{(1,27)}=2.62$; $p=0.12$), el tratamiento con Ro 61-8048 ($F_{(1,28)}=0.03$; $p=0.86$), la interacción de la sesión de autoadministración con el modelo SNI ($F_{(1,27)}=1.77$; $p=0.19$) ni la del modelo SNI con el tratamiento con Ro 61-8048 ($F_{(1,28)}=0.001$; $p=0.97$).

En la evaluación del umbral nociceptivo en la pata derecha (Fig. 64B), el análisis de ANOVA de tres vías reveló que el único factor significativo fue el tratamiento con Ro 61-8048 ($F_{(1,28)}=4.44$; $p=0.046$). Ninguno de los otros factores ni sus interacciones mostró efectos estadísticamente significativos: la intervención SNI ($F_{(1,28)}=0.36$; $p=0.55$), la sesión de autoadministración de salino ($F_{(1,28)}=3.73$; $p=0.064$), entre la sesión de autoadministración de salino y Ro 61-8048 ($F_{(1,28)}=1$; $p=0.32$), entre la intervención SNI y Ro 61-8048 ($F_{(1,28)}=0.47$; $p=0.49$) y la interacción tripartita entre la intervención SNI, la sesión de autoadministración de salino y el tratamiento con Ro 61-8048 ($F_{(1,28)}=0.066$; $p=0.8$).

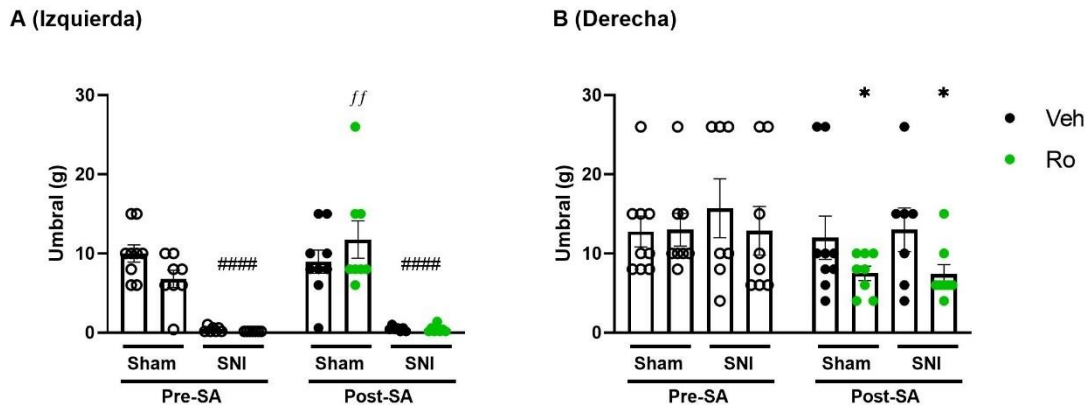


Figura 64 | Efecto de la autoadministración de salino y el tratamiento con Ro 61-8048 sobre la alodinia mecánica inducida por el modelo SNI en la prueba de reinstauración inducida por estímulo condicionado. Se muestra (A) el umbral nociceptivo en la pata izquierda (intervenida con SNI) y (B) la pata derecha antes (Pre-SA) y después (Post-SA) de la sesión de autoadministración de salino. Los datos se expresan como media \pm EEM (n=7-9). El análisis estadístico se realizó empleando análisis de efectos mixtos para la pata izquierda seguido por el test *post-hoc* de Sidak y ANOVA de tres vías para la pata derecha. (A) *ff* $p < 0.01$: vs. Sham+Ro-Pre-SA. #### $p < 0.0001$: SNI vs Sham. (B) * $p < 0.05$: vs. Veh.

2.8 Efecto de Ro 61-8048 en la autoadministración de reforzantes naturales

2.8.1 Sacarosa

Los animales fueron expuestos a un protocolo de autoadministración oral de sacarosa con el objetivo de evaluar el efecto de Ro 61-8048 en las fases de mantenimiento y reinstauración inducida por estímulo condicionado.

Inicialmente, los animales fueron entrenados para la conducta operante utilizando pellets de comida, lo que produjo un consumo estable de sacarosa durante la fase de adquisición.

Una vez establecida la conducta de autoadministración de sacarosa, se administró Ro 61-8048 o su vehículo durante la fase de mantenimiento. Posteriormente, tras alcanzar nuevamente el criterio de estabilidad en el consumo de sacarosa durante la fase de mantenimiento, se administró el tratamiento alternativo a cada animal.

La conducta de autoadministración de sacarosa antes del tratamiento con Ro 61-8048 durante la fase de mantenimiento no mostró diferencias significativas entre los grupos, que fueron asignados de forma homogénea y pseudoaleatoria. Los valores promedios en las tres sesiones previas al tratamiento no presentaron diferencias significativas en cuanto a la cantidad de pellets obtenidos ($t_{(16)}=1.56$; $p=0.14$) o el número de presiones en la palanca activa ($t_{(16)}=1.68$; $p=0.11$) o inactiva ($t_{(16)}=0.71$; $p=0.49$) entre los grupos asignados a recibir Ro 61-8048 o su vehículo (Fig. 65A). El tratamiento con Ro 61-8048 resultó en una reducción significativa del consumo de pellets de sacarosa ($t_{(16)}=4.27$; $p=0.0006$) y del número de presiones en la palanca activa ($t_{(16)}=3.88$; $p=0.013$), sin afectar a las respuestas en la palanca inactiva ($t_{(15)}=0.93$; $p=0.36$) (Fig. 65B).

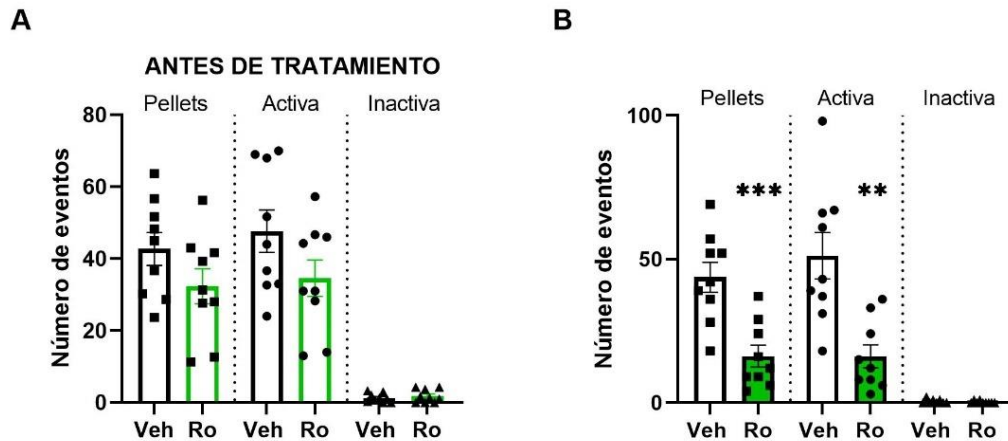


Figura 65 | (A) Distribución de los animales en los grupos Veh y Ro 61-8048 tras cumplir el criterio de estabilidad y (B) efecto del tratamiento con Ro 61-8048 sobre el mantenimiento de la autoadministración de sacarosa. (A) Se muestran los valores medios para el número de pellets de sacarosa obtenidos, presiones en la palanca activa e inactiva durante las tres sesiones previas al tratamiento con Ro 61-8048 en los cuales las ratas mostraron un consumo estable, conforme al criterio de estabilidad. Los resultados se muestran como la media \pm EEM (n=8-9). El análisis estadístico se realizó empleando el test t de Student. (B): ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$: vs. Veh.

Tras completar el test de mantenimiento, se inició el protocolo de extinción hasta alcanzar el criterio de estabilidad. Se llevó a cabo la prueba de reinstauración inducida por estímulo condicionado y se administró de forma previa al inicio de la prueba el tratamiento con Ro 61-8048 o su vehículo, para posteriormente reextinguir la conducta de búsqueda hasta cumplir nuevamente el criterio de extinción. En la siguiente sesión se administró el tratamiento no recibido anteriormente. Los datos correspondientes a los promedios de respuestas sobre la palanca activa ($t_{(16)}=0$; $p > 0.99$) e inactiva ($t_{(16)}=0.21$; $p=0.84$) durante las dos últimas sesiones de extinción para cada animal, no mostraron diferencias significativas entre los dos grupos (Fig. 66).

El tratamiento con Ro 61-8048 tuvo un efecto significativo en el número de presiones sobre la palanca activa ($t_{(16)}=2.33$; $p=0.033$) durante la prueba de reinstauración inducida por estímulo condicionado, mientras que no se observaron cambios significativos en las presiones sobre la palanca inactiva, que permaneció constante en ambos grupos (Fig. 66).

Al comparar los valores de extinción y reinstauración dentro de los grupos tratados con vehículo o Ro 61-8048, se encontró un aumento estadísticamente significativo en las respuestas sobre la palanca activa en el grupo tratado con vehículo ($t_{(16)}=3.62$; $p=0.0023$), mientras que el grupo tratado con Ro 61-8048 no mostró un aumento significativo ($t_{(15)}=0.74$; $p=0.46$) (Fig. 66).

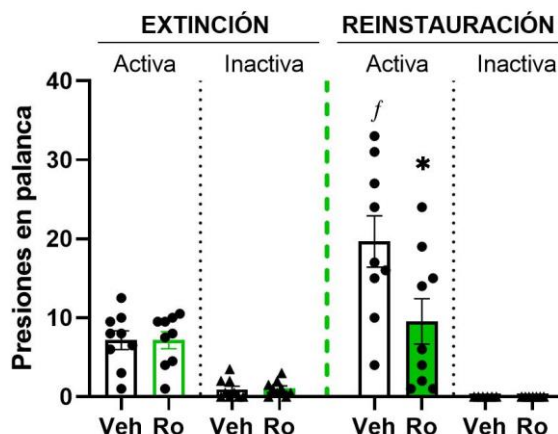


Figura 66 | Efecto del tratamiento con Ro 61-8048 sobre la reinstauración de la conducta de búsqueda de sacarosa inducida por estímulo condicionado. Se muestra el número medio de presiones en la palanca activa e inactiva durante las dos últimas sesiones de extinción y en la prueba de reinstauración. Solo se administró Ro 61-8048 (100 mg/kg i.p) en la prueba de reinstauración. Los datos se expresan como media ± EEM (n=8-9). El análisis estadístico se realizó empleando el test t de Student. *f* $p < 0.05$: vs. Extinción-activa (Veh). * $p < 0.05$: vs. Reinstauración-activa (Veh).

2.8.2 Comida

Se evaluó el efecto de Ro 61-8048 sobre la reinstauración de la conducta de búsqueda de comida inducida por estímulo condicionado.

Los animales fueron entrenados en la tarea de conducta operante utilizando comida como reforzador y, posteriormente, sometidos a un régimen de autoadministración de pellets de comida asociada a estímulo condicionado a lo largo de treinta y seis sesiones. Durante la fase de mantenimiento, no se alcanzó el criterio de estabilidad en el consumo de pellets de comida. Al final de la fase de extinción, no se encontraron diferencias significativas en la conducta de búsqueda de comida entre los grupos que posteriormente serían tratados con Ro 61-8048 o su vehículo (número de presiones en la palanca activa: $t_{(5)}=1.93$; $p=0.11$, palanca inactiva: $t_{(5)}=2.24$, $p=0.075$) (Fig. 67).

El tratamiento con Ro 61-8048 tuvo un efecto significativo en la prueba de reinstauración inducido por estímulo condicionado. Se observó una reducción notable en el número de presiones en la palanca activa en el grupo tratado con Ro 61-8048 en comparación con el grupo tratado con el vehículo ($t_{(5)}=10.75$; $p=0.0001$). Sin embargo, el tratamiento con Ro 61-8048 no tuvo un impacto significativo en el número de presiones de la palanca inactiva ($t_{(5)}=1.35$; $p=0.23$). Al comparar los promedios de las respuestas sobre la palanca activa durante las dos últimas sesiones de la fase de extinción con los valores obtenidos durante la reinstauración, se observó un aumento significativo en el grupo tratado con vehículo ($t_{(5)}=3.93$; $p=0.011$), mientras que no se apreció un efecto significativo en el grupo tratado con Ro 61-8048 ($t_{(5)}=0.49$; $p=0.64$) (Fig. 67).

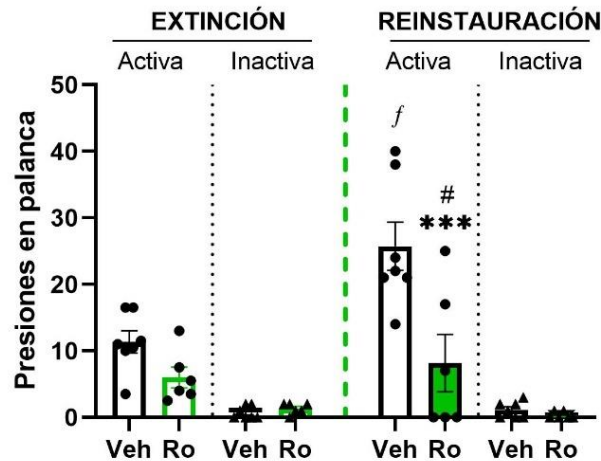


Figura 67 | Efecto del tratamiento con Ro 61-8048 sobre la reinstauración de la conducta de búsqueda de comida inducida por estímulo condicionado. Se muestra el número medio de presiones en la palanca activa e inactiva en las dos últimas sesiones de extinción y en la prueba de reinstauración. Solo se administró Ro 61-8048 (100 mg/kg i.p) en la prueba de reinstauración. Los datos se expresan como media \pm EEM (n=6). El análisis estadístico se realizó empleando el test t de Student. *f* $p < 0.05$: vs. Extinción-activa (Veh). # $p < 0.05$: vs. Extinción-activa (Ro). *** $p < 0.001$: vs. Reinstauración-activa (Veh).

2.9 Efecto de Ro 61-8048 en la aversión de lugar condicionada por naloxona en animales dependientes de fentanilo

Se llevó a cabo un experimento de aversión de lugar condicionado (*conditioned place aversion, CPA*) por naloxona en animales dependientes de fentanilo para evaluar la eficacia del tratamiento con Ro 61-8048 en la prevención su desarrollo.

Durante este experimento se evaluaron dos parámetros conductuales: el porcentaje de tiempo que ocupa el animal en el compartimento condicionado y el número de entradas al compartimento condicionado. El condicionamiento con naloxona redujo significativamente el tiempo que los animales estuvieron en el compartimento condicionado (ANOVA de dos vías, $F_{(1,26)}=7.42$; $p=0.011$), también en animales tratados con Ro 61-8048 ($F_{(1,26)}=0.16$; $p=0.69$). La interacción entre el tratamiento con Ro 61-8048 y el condicionamiento con naloxona tampoco fue estadísticamente significativa ($F_{(1,26)}=0.51$; $p=0.48$) (Fig. 68A).

De igual forma, el condicionamiento con naloxona redujo significativamente el número de entradas en el compartimento condicionado ($F_{(1,27)}=11.72$; $p=0.002$) y el tratamiento con Ro 61-8048 no tuvo un efecto significativo sobre el número de entradas ($F_{(1,27)}=0.0008$; $p=0.98$). La interacción entre el tratamiento con Ro 61-8048 y el condicionamiento con naloxona no resultó estadísticamente significativa ($F_{(1,27)}=0.55$; $p=0.47$) (Fig. 68B).

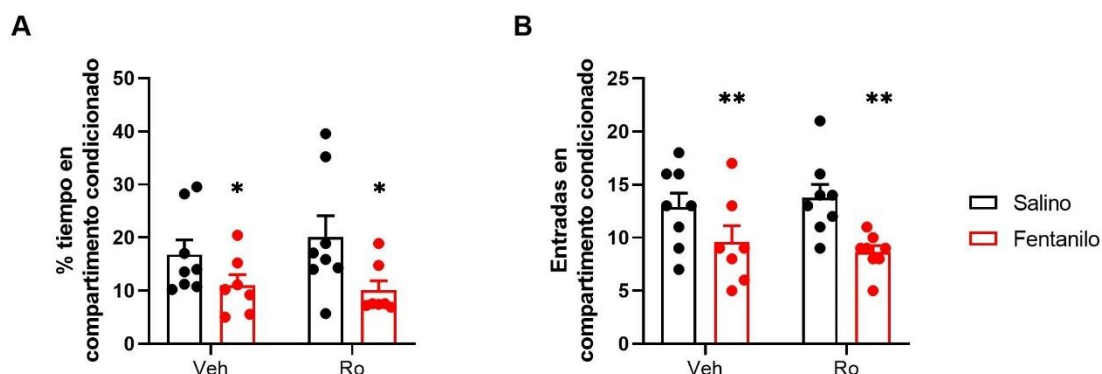


Figura 68 | Efecto del tratamiento con Ro 61-8048 sobre la expresión de la aversión condicionada de lugar inducida por naloxona en animales dependientes de fentanilo. Se muestra (A) el porcentaje de tiempo de estancia y (B) el número de entradas en el compartimento condicionado. Los datos se expresan como media \pm EEM (n=6-8). El análisis estadístico se realizó empleando ANOVA de dos vías. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$: vs. salino.

3. Caracterización de las alteraciones moleculares inducidas por la autoadministración de fentanilo y el tratamiento con Ro 61-8048

3.1 Efecto de Ro 61-8048 sobre la expresión de proteínas implicadas en neurotransmisión glutamatergica y quinasas en el *nucleus accumbens* de animales sometidos a reinstauración inducida por fentanilo

3.1.1 GluN2A y GluN2B

El receptor NMDA, altamente expresado en cerebro, desempeña un papel crucial en los procesos neuronales de potenciación y depresión a largo plazo. La composición del receptor en cuanto a sus subunidades genera variaciones en las características estructurales y funcionales del receptor. Este fue el motivo por el que se analizó la expresión de las subunidades del receptor GluN2A y GluN2B.

En el análisis de la expresión de la subunidad GluN2A en homogenados totales de *nucleus accumbens* (NAcc) obtenidos de ratas sometidas a reinstauración inducida por una dosis no contingente de fentanilo, no se observó un efecto significativo del tratamiento con Ro 61-8048 ($t_{(12)}=0.38$; $p=0.71$) (Fig. 69A). De manera similar, la expresión de la subunidad GluN2B tampoco mostró alteraciones significativas en respuesta a Ro 61-8048 ($t_{(12)}=0.33$; $p=0.75$) (Fig. 69B).

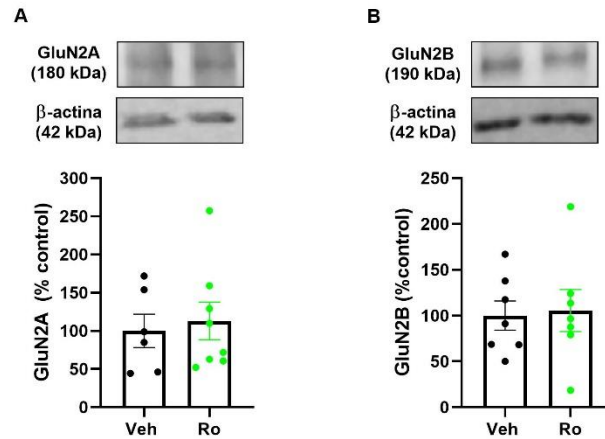


Figura 69 | Efecto del tratamiento con Ro 61-8048 (100 mg/kg, i.p) sobre la expresión de (A) GluN2A y (B) GluN2B en homogenado total de NAcc de ratas sometidas a reinstauración inducida por una dosis no contingente de fentanilo. Se muestra la expresión de GluN2A y GluN2B 2.5 h tras el tratamiento con Ro 61-8048. Los datos se expresan como media ± EEM (n=6-8). El análisis estadístico se realizó empleando el test t de Student.

3.1.2 EAAT2

El transportador astrocítico de glutamato EAAT2 tiene una función primordial en la recaptación del glutamato desde la hendidura sináptica, lo cual es fundamental para la regulación de la neurotransmisión glutamatérgica y los procesos relacionados con el *craving* y la adicción (Roberts-Wolfe & Kalivas, 2015).

El pretratamiento con Ro 61-8048 no produjo modificaciones significativas en los niveles de expresión de EAAT2 ($t_{(14)}=0.14$; $p=0.89$) (Fig. 70).

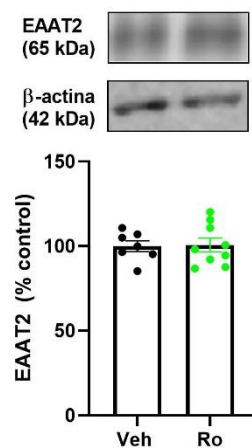


Figura 70 | Efecto del tratamiento con Ro 61-8048 (100 mg/kg, i.p) en la expresión de EAAT2 en homogenado total de NAcc de ratas sometidas a reinstauración inducida por una dosis no contingente de fentanilo. Se muestra la expresión de EAAT 2.5 h tras el tratamiento con Ro 61-8048. Los datos se expresan como media ± EEM (n=7-9). El análisis estadístico se realizó empleando el test t de Student.

RESULTADOS

3.1.3 Akt

Se investigó la expresión de la quinasa Akt, tanto en su forma fosforilada en Ser473 como en su forma total, en homogenados totales del NAcc debido a su implicación en la regulación de procesos neuronales asociados con la reinstauración de la conducta de búsqueda y el *craving* (G. Li et al., 2023; Zhu et al., 2021).

El análisis de la expresión de Akt en su forma fosforilada en el residuo Ser473 ($t_{(13)}=0.49$; $p=0.63$), en su forma total ($t_{(13)}=0.24$; $p=0.81$), y el cociente entre ambas formas ($t_{(14)}=1.43$; $p=0.18$) en homogenados totales no mostró alteraciones significativas como resultado del tratamiento con Ro 61-8048 en el contexto de la reinstauración de la conducta de búsqueda inducida por una dosis no contingente de fentanilo (Fig. 71).

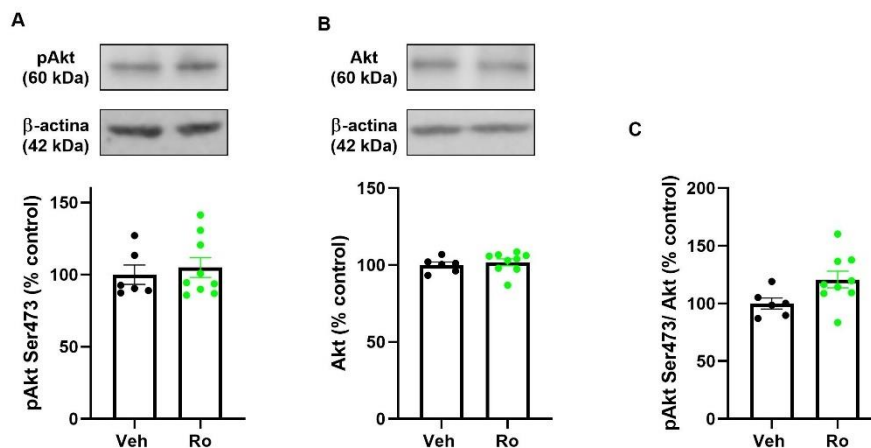


Figura 71 | Efecto del tratamiento con Ro 61-8048 (100 mg/kg, i.p) en la expresión de (A) Akt fosforilada (Ser 473), (B) Akt total y (C) la ratio entre ambas en homogenado total de NAcc de ratas sometidas a reinstauración inducida por una dosis no contingente de fentanilo. Se muestra la expresión proteica 2.5 h tras el tratamiento con Ro 61-8048. Los datos se expresan como media \pm EEM ($n=6-9$). El análisis estadístico se realizó empleando el test t de Student.

3.1.4 Erk 1/2

Se investigó la expresión de la quinasa Erk 1/2, tanto en su forma fosforilada en Thr202/Tyr204 como en su forma total, en homogenados de NAcc, dada su implicación en la regulación de procesos relacionados con la reinstauración de la conducta de búsqueda y el *craving* (A. Sun et al., 2015).

El análisis reveló que la expresión de Erk 1/2 en su forma fosforilada ($t_{(13)}=1.19$; $p=0.26$), proteína total ($t_{(13)}=0.57$; $p=0.58$) y el cociente entre ambas ($t_{(13)}=0.58$; $p=0.57$) no mostró alteraciones significativas debido al tratamiento con Ro 61-8048 en el contexto de la reinstauración de la conducta de búsqueda inducida por una dosis no contingente de fentanilo (Fig. 72).

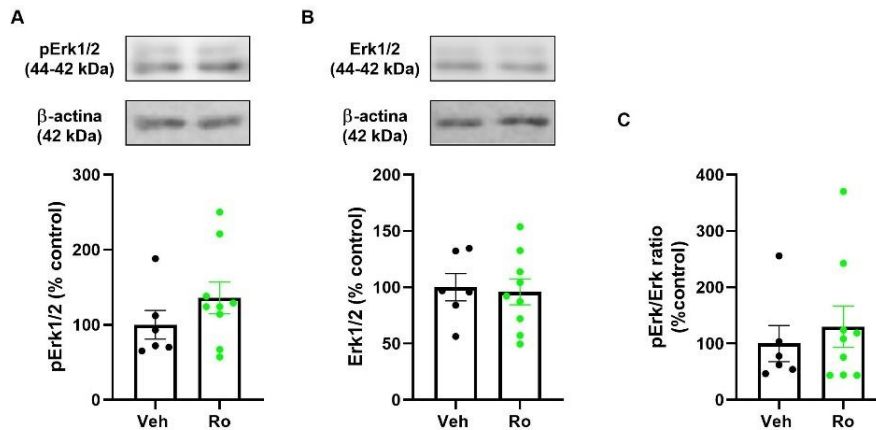


Figura 72 | Efecto del tratamiento con Ro 61-8048 (100 mg/kg, i.p) sobre la expresión de (A) Erk 1/2 fosforilada (Thr202/Tyr204), (B) Erk1/2 total y (C) el cociente entre ambas en homogenado total de NAcc de ratas sometidas a reinstauración inducida por una dosis no contingente de fentanilo. Se muestra la expresión proteica 2.5 h tras el tratamiento con Ro 61-8048. Los datos se expresan como media ± EEM (n=6-9). El análisis estadístico se realizó empleando el test t de Student.

3.2 Efecto de Ro 61-8048 y fentanilo sobre los metabolitos de la vía de la kinurenina (KynP) en plasma y NAcc

Para evaluar el efecto global de Ro 61-8048 sobre la KynP (KynP), se realizó un análisis exhaustivo de las concentraciones de metabolitos relevantes en plasma y en el NAcc. Esta evaluación fue realizada en colaboración con el grupo de la Dra. Sophie Erhardt del Departamento de Farmacología y Fisiología del *Karolinska Institutet*. Se utilizó la técnica de cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (UPLC-MS/MS) para cuantificar los niveles de los siguientes compuestos: TRP (triptófano), KYN (kinurenina), KYNA (ácido kinurénico), 3-HK (3-hidroxikinurenina), 3-HAA (ácido 3-hidroxiantranílico), QA (ácido quinolínico), PA (ácido picolínico) y NAA (nicotinamida).

3.2.1 Efecto de Ro 61-8048 sobre los metabolitos de la KynP en plasma y NAcc animales sometidos a reinstauración de la conducta adictiva

Para evaluar el impacto de Ro 61-8048 sobre la KynP en el contexto de reinstauración de la conducta adictiva inducida por fentanilo se utilizaron muestras procedentes de los animales que recibieron tratamiento con Ro 61-8048 durante la fase de reinstauración de la conducta de búsqueda de fentanilo, ya sea inducida por la droga o el estímulo condicionado. No se incluyeron en el estudio los animales que autoadministraron salino o sacarosa ni aquellos que experimentaron dolor neuropático durante la autoadministración de fentanilo. Todos los animales incluidos en los resultados presentaron consumo de fentanilo, extinguieron la conducta de búsqueda y experimentaron reinstauración de esta conducta, que fue posteriormente prevenida por el tratamiento con Ro 61-8048.

El tratamiento con Ro 61-8048 produjo en plasma un aumento de la concentración de KYN ($t_{(35)}=35.11$; $p<0.0001$), KYNA ($U=0$; $p<0.0001$) y 3-HK ($t_{(62)}=8.16$; $p<0.0001$); y una disminución de la concentración de TRP ($t_{(48)}=12.63$; $p<0.0001$), 3-HAA ($U=70.5$; $p<0.0001$) y QUIN ($U=39$; $p<0.0001$). La administración del inhibidor de KMO en el contexto de reinstauración de la conducta de búsqueda de fentanilo no alteró los niveles de PA ($U=502$; $p=0.74$) ni NAA ($t_{(52)}=0.94$; $p=0.35$) (Fig. 73).

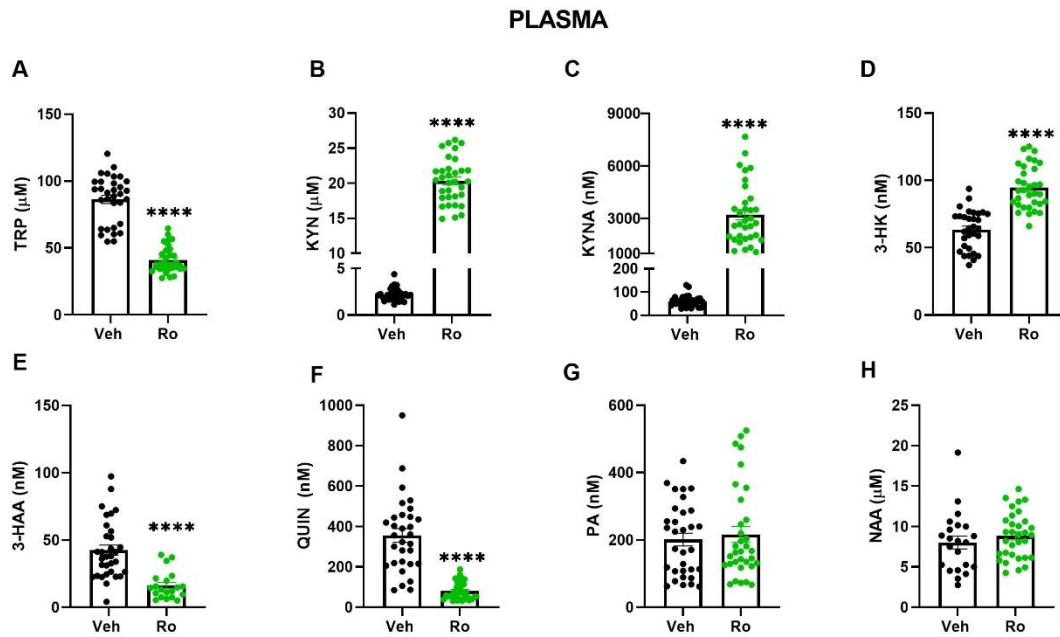


Figura 73 | Efecto del tratamiento con Ro 61-8048 (100 mg/kg, i.p) sobre las concentraciones en plasma de metabolitos de la KynP en animales tras la prueba de reinstauración. Se muestran las concentraciones de (A) TRP, (B) KYN, (C) KYNA, (D) 3-HK, (E) 3-HAA, (F) QUIN, (G) PA y (H) NAA. Las determinaciones se llevaron a cabo sobre muestras obtenidas inmediatamente después de la sesión de reinstauración, 2.5 h tras la administración de Ro 61-8048. Los resultados se muestran como la media \pm EEM (n= 31-33). Se dieron problemas en la cuantificación de 3-HAA en animales tratados con Ro 61-8048, para este metabolito el tamaño muestral es de 19-33. El análisis estadístico se llevó a cabo empleando la prueba t de Student (3-HK, NAA), t de Student con corrección de Welch (TRP, KYN) o Mann-Whitney (KYNA, 3-HAA, QUIN, PA). **** $p < 0.0001$: vs. Veh.

En el NAcc, el tratamiento con Ro 61-8048 produjo un aumento de la concentración de KYN (U=0; p<0.0001), KYNA (U=0; p<0.0001) y 3-HK (t_{48} =4.85; p<0.0001) y una disminución de la concentración de QUIN (t_{29} =3.3; p=0.0026). El tratamiento no alteró la concentración de TRP (t_{48} =0.36; p<0.0001), 3-HAA (t_{44} =1.62; p=0.11) ni PA (t_{47} =1.64; p=0.11) (Fig. 74)

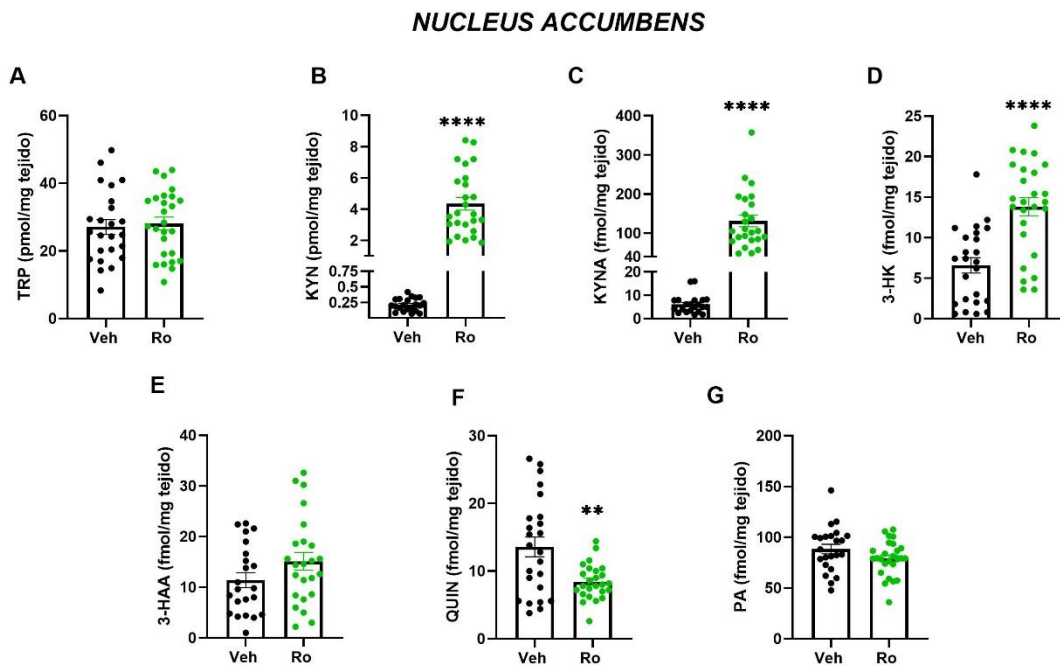


Figura 74 | Efecto del tratamiento con Ro 61-8048 (100 mg/kg, i.p) sobre las concentraciones en NAcc de metabolitos de la KynP en animales tras la prueba de reinstauración. Se muestran las concentraciones de (A) TRP, (B) KYN, (C) KYNA, (D) 3-HK, (E) 3-HAA, (F) QUIN y (G) PA. Las determinaciones se llevaron a cabo inmediatamente después de la sesión de reinstauración, 2.5h tras la administración de Ro 61-8048. Los resultados se muestran como la media \pm EEM (n=21-26). El análisis estadístico se llevó a cabo empleando la prueba t de Student (TRP, 3-HK, 3-HAA, PA), t de Student con corrección de Welch (QUIN) o Mann-Whitney (KYN, KYNA). **p<0.01, ****p<0.0001: vs. Veh.

3.2.2 Efecto de fentanilo y Ro 61-8048 sobre los metabolitos de la KynP en plasma de animales en fase de reinstauración inducida por estímulo condicionado

Para examinar posibles alteraciones en los metabolitos de la KynP inducidas por la historia de consumo de fentanilo, se compararon animales con una historia de autoadministración de fentanilo con animales control, que siguieron el mismo procedimiento hasta la prueba de reinstauración inducida por estímulo condicionado, pero siendo sometidos a autoadministración de salino. Ambos grupos de animales fueron tratados con Ro 61-8048 o su vehículo de forma previa a la sesión en la que se estudió la reinstauración inducida por estímulo condicionado.

En este análisis, se destacarán los efectos en los metabolitos donde la historia de consumo de fentanilo o su interacción con el tratamiento con Ro 61-8048 fueron factores principales según el ANOVA de dos vías. Los descriptivos estadísticos y significancia del ANOVA de dos vías relativo a los efectos inducidos por Ro 61-8048 y la interacción de este y la autoadministración de fentanilo se muestran en la Tabla 3, y por lo tanto no se incluirán en el texto en este y sucesivos apartados donde se emplee este análisis.

3.2.3 Comparación del efecto de fentanilo y Ro 61-8048 sobre los metabolitos de la KynP en plasma de animales en fase inicial de extinción y reinstauración inducida por estímulo condicionado

Se analizaron los niveles en plasma de animales sacrificados en la primera sesión de extinción y en la prueba de reinstauración inducida por estímulo condicionado.

Los animales que fueron sometidos a autoadministración de fentanilo mostraron un aumento de la conducta de búsqueda que fue inhibida con el pretratamiento con Ro 61-8048 en la primera sesión de extinción (Fig. 76A). Dado que los efectos inducidos por la administración de Ro 61-8048 ya han sido detalladamente descritos en un apartado anterior y se replican casi en su totalidad en los resultados actuales, en esta sección solo se abordarán en profundidad las diferencias estadísticamente significativas relacionadas con la fase de la conducta adictiva y los hallazgos que no replican los resultados previamente descritos. Los resultados del análisis estadístico se presentan en la siguiente tabla (Fig. 76B).

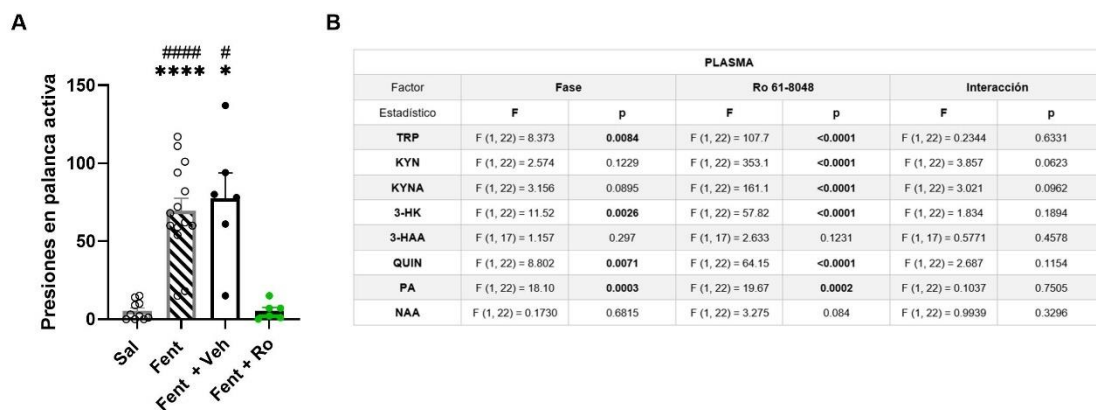


Figura 76 | (A) Comportamiento mostrado en la primera sesión de extinción y (B) tabla de resultados del ANOVA de dos vías relativa al efecto de la fase de la conducta adictiva, la administración de Ro 61-8048 y la interacción entre ambos factores sobre las concentraciones de metabolitos de la KynP en plasma. Se muestra (A) el número de presiones en la palanca activa mostradas en la primera sesión de extinción por los animales que fueron sometidos a autoadministración de salino (Sal) y fentanilo (Fent). Un subgrupo de los animales que autoadministraron fentanilo fue tratado en la primera sesión de extinción con Ro (Fent + Ro) o su vehículo (Fent + Veh) y sacrificados 2.5 h tras la administración de Ro 61-8048 (100 mg/kg i.p.). El análisis estadístico se hizo por ANOVA de una vía con corrección de Welch seguido del test de comparaciones múltiples T2 de Tamhane. # $p < 0.05$, ##### $p < 0.0001$ vs. Sal. * $p < 0.05$, **** $p < 0.0001$: vs. Fent + Ro. (B) Se muestra el descriptivo estadístico F y el valor de significancia estadística p para el análisis mediante ANOVA de dos vías del efecto de la fase de la conducta adictiva y el tratamiento con Ro 61-8048 sobre metabolitos de la KynP en plasma.

En relación con las concentraciones de metabolitos en plasma en animales sacrificados en el primer día de la fase de extinción, el análisis mediante ANOVA de dos vías reveló que los animales sacrificados tras la prueba de reinstauración presentaron concentraciones significativamente superiores de TRP, QUIN y PA (Fig. 81A, F, G), mientras que los niveles de 3-HK estaban disminuidos (Fig. 77D).

El tratamiento con Ro 61-8048 provocó una reducción significativa de los niveles de TRP, QUIN (Fig. 81A, F), mientras que causó un aumento de KYN, KYNA, 3-HK y PA (Fig. 77B, C, D y G). La interacción entre la fase en la que se sacrificó a los animales y

RESULTADOS

el tratamiento con Ro 61-8048 no mostró efectos significativos en ninguno de los metabolitos (Fig. 77B).

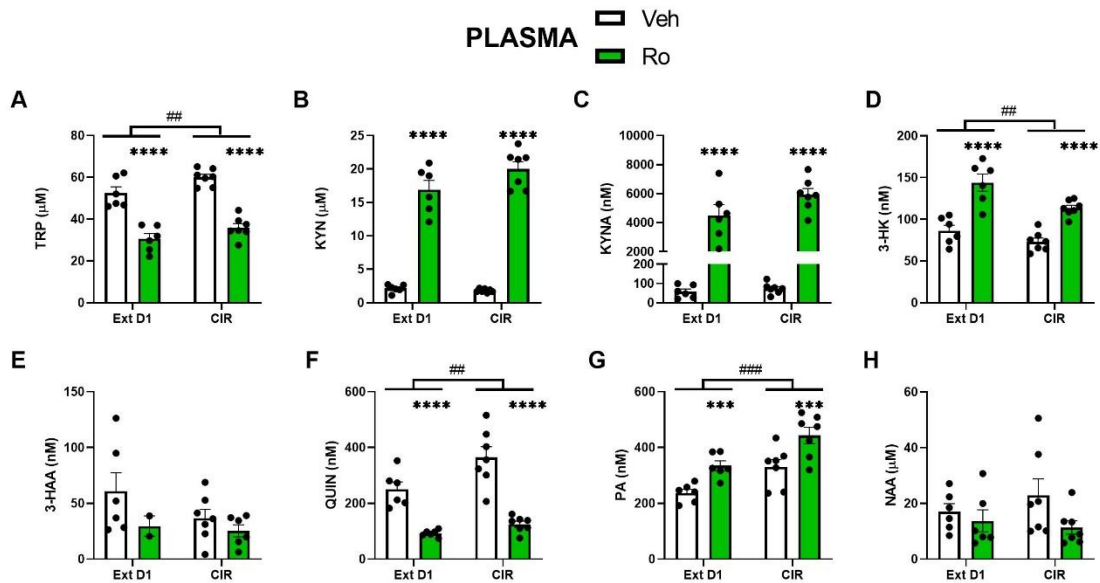


Figura 77 | Efecto de la fase de conducta adictiva inducida por fentanilo y/o el tratamiento con Ro 61-8048 (100 mg/kg, i.p) sobre las concentraciones en plasma de metabolitos de la KynP. Se muestran las concentraciones de (A) TRP, (B) KYN, (C) KYNA, (D) 3-HK, (E) 3-HAA, (F) QUIN, (G) PA y (H) NAA. Las determinaciones se llevaron a cabo sobre muestras recogidas tras la primera sesión de extinción (Ext D1) o de reinstauración inducida por estímulo condicionado (CIR), 2.5h tras la administración de Ro 61-8048. Los resultados se muestran como la media \pm EEM (n= 6-7). Se dieron problemas en la cuantificación de 3-HAA para animales tratados con Ro 61-8048, para este metabolito el tamaño muestral es de 2-7. El análisis estadístico se llevó a cabo empleando ANOVA de dos vías. **** $p < 0.0001$: vs. Veh. ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$: Ext D1 vs. CIR.

3.2.4 Comparación del efecto de fentanilo y Ro 61-8048 sobre los metabolitos de la KynP en plasma y NAcc de animales sometidos al modelo de dolor neuropático SNI

Se analizaron las concentraciones en plasma y NAcc de los metabolitos de la KynP en animales sometidos al modelo de dolor neuropático SNI y sacrificados tras la prueba de reinstauración.

Dado que los efectos generados por Ro 61-8048 han sido descritos en secciones anteriores, en este apartado se destacarán solo los efectos significativos en los que el modelo de dolor neuropático desempeñó un papel relevante. A pesar de esto, los resultados del ANOVA de dos vías analizando el papel de los factores de Ro 61-8048, el modelo SNI y la interacción entre ambos en los niveles de metabolitos de la KynP se muestra en la Tabla 4.

PLASMA						
Factor	SNI		Ro 61-8048		Interacción	
Estadístico	F	p	F	p	F	p
TRP	F (1, 28) = 0.1468	0.7046	F (1, 28) = 133.4	<0.0001	F (1, 28) = 0.7706	0.3875
KYN	F (1, 27) = 1.660	0.2085	F (1, 27) = 261.6	<0.0001	F (1, 27) = 2.755	0.1085
KYNA	F (1, 28) = 11.90	0.0018	F (1, 28) = 192.2	<0.0001	F (1, 28) = 12.49	0.0014
3-HK	F (1, 28) = 7.622	0.0101	F (1, 28) = 41.59	<0.0001	F (1, 28) = 6.897	0.0138
3-HAA	F (1, 24) = 1.844	0.1872	F (1, 24) = 28.82	<0.0001	F (1, 24) = 1.392	0.2496
QUIN	F (1, 28) = 1.561	0.2218	F (1, 28) = 47.76	<0.0001	F (1, 28) = 1.510	0.2294
PA	F (1, 28) = 0.2469	0.6231	F (1, 28) = 17.51	0.0003	F (1, 28) = 1.402	0.2464
NAA	F (1, 27) = 0.0611	0.8066	F (1, 27) = 0.8943	0.3527	F (1, 27) = 4.471	0.0439

NUCLEUS ACCUMBENS						
Factor	SNI		Ro 61-8048		Interacción	
Estadístico	F	p	F	p	F	p
TRP	F (1, 26) = 0.009	0.925	F (1, 26) = 3.548	0.0709	F (1, 26) = 2.434	0.1308
KYN	F (1, 23) = 8.962	0.0065	F (1, 23) = 111.4	<0.0001	F (1, 23) = 9.145	0.006
KYNA	F (1, 23) = 5.027	0.0349	F (1, 23) = 20.51	0.0002	F (1, 23) = 4.769	0.0394
3-HK	F (1, 26) = 0.9256	0.3449	F (1, 26) = 27.00	<0.0001	F (1, 26) = 0.5474	0.466
3-HAA	F (1, 17) = 14.34	0.0015	F (1, 17) = 0.0375	0.8487	F (1, 17) = 0.0006	0.9799
QUIN	F (1, 26) = 0.3334	0.5687	F (1, 26) = 31.32	<0.0001	F (1, 26) = 3.161	0.0871
PA	F (1, 25) = 1.346	0.2569	F (1, 25) = 5.340	0.0294	F (1, 25) = 1.010e-5	0.9975

Tabla 4 | Tabla de resultados del ANOVA de dos vías relativo al efecto del modelo SNI, la administración de Ro 61-8048 y la interacción entre ambos factores sobre las concentraciones de metabolitos de la KynP en plasma y NAcc. Se muestra el descriptivo estadístico F y el valor de significancia estadística p.

El análisis mediante ANOVA de dos vías reveló que, tanto el modelo de dolor neuropático SNI, como la administración de Ro 61-8048, así como la interacción entre ambos factores, afectaron significativamente los niveles plasmáticos de KYNA y 3-HK (Fig. 78C, D).

Tanto el modelo SNI como la administración de Ro 61-8048 produjeron un aumento significativo de los niveles plasmáticos de KYNA. La interacción entre el modelo SNI y Ro 61-8048 también fue significativa, siendo el efecto de Ro 61-8048 más pronunciado en los animales sometidos al modelo de dolor SNI según el test *post-hoc* de Tukey (Fig. 78C).

En cuanto a 3-HK, también tanto el modelo SNI como Ro 61-8048 produce un aumento de sus niveles plasmáticos (Fig. 78D).

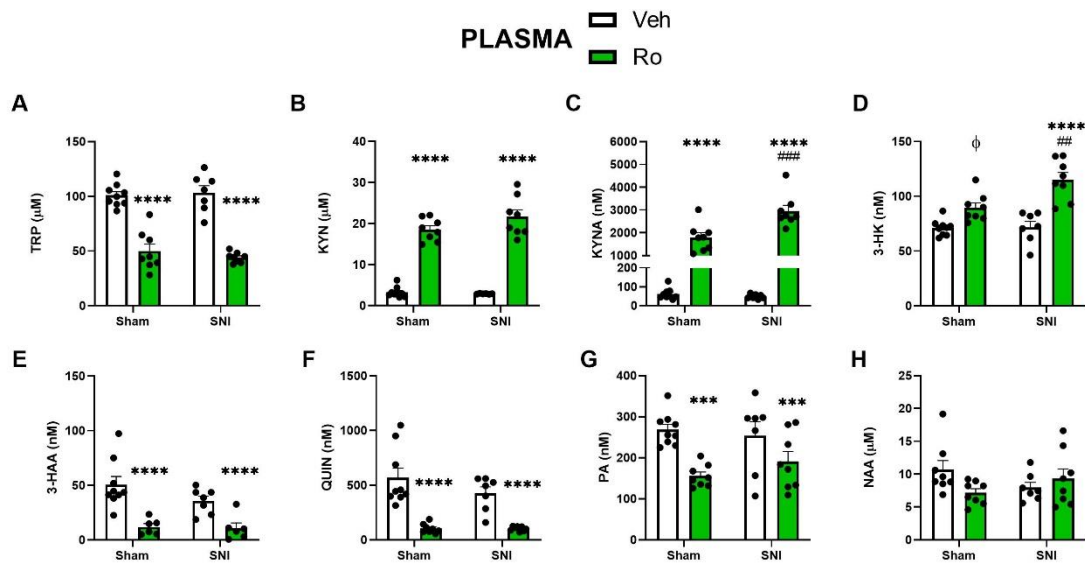


Figura 78 | Efecto del modelo de dolor neuropático SNI y/o el tratamiento con Ro 61-8048 (100 mg/kg, i.p) sobre las concentraciones en plasma de metabolitos de la KynP. Se muestran las concentraciones de (A) TRP, (B) KYN, (C) KYNA, (D) 3-HK, (E) 3-HAA, (F) QUIN, (G) PA y (H) NAA. Las determinaciones se llevaron a cabo sobre muestras recogidas tras el final de la prueba de reinstauración inducida por fentanilo, 2.5h tras la administración de Ro 61-8048. Los resultados se muestran como la media ± EEM (n=6-9). El análisis estadístico se llevó a cabo empleando ANOVA de dos vías seguido del test *post-hoc* de Tukey. * p<0.05, ** p<0.001, **** p<0.0001: vs. Veh. ## p<0.01, ### p<0.001: vs. Sham + Ro. Φ p<0.05: vs. Sham + Veh

A nivel central, el análisis realizado sobre los niveles de KYN y KYNA en el NAcc muestra que, tanto el modelo de dolor neuropático SNI, como el tratamiento con Ro 61-8048 y la interacción entre ambos factores tuvieron efectos significativos. Específicamente, tanto el modelo SNI como Ro 61-8048 aumentaron significativamente los niveles de KYN y KYNA. Asimismo, para estos metabolitos, la interacción entre el modelo SNI y el tratamiento también fue significativa. El test *post-hoc* de Tukey muestra que el aumento producido por Ro 61-8048 es más pronunciado en los animales sometidos al modelo SNI (Fig. 79B, C).

En cuanto a los niveles de 3-HAA en NAcc, estos fueron significativamente más bajos en los animales sometidos al modelo SNI. Sin embargo, ni el tratamiento con Ro 61-8048 ni la interacción entre ambos mostraron efectos significativos sobre este metabolito (Fig. 79E).

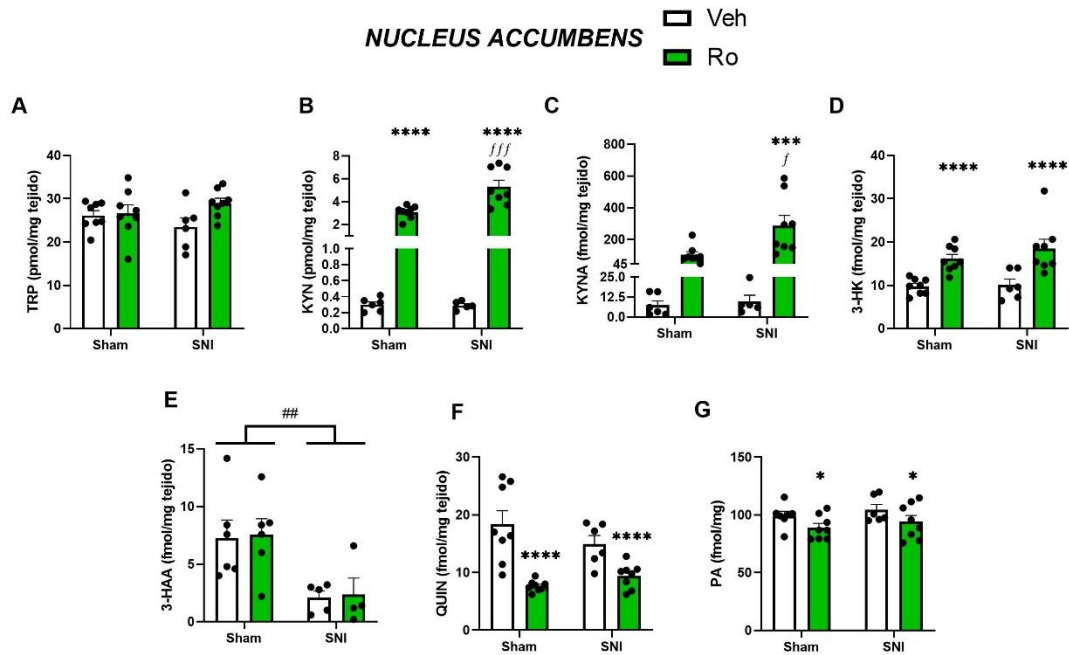


Figura 79 | Efecto del modelo de dolor neuropático SNI y/o el tratamiento con Ro 61-8048 (100 mg/kg, i.p) sobre las concentraciones en Nacc de metabolitos de la vía de kinurenina. Se muestran las concentraciones de (A) TRP, (B) KYN, (C) KYNA, (D) 3-HK, (E) 3-HAA, (F) QUIN y (G) PA. Las determinaciones se llevaron a cabo inmediatamente después de la prueba de reinstauración inducida por fentanilo, 2.5 h tras la administración de Ro 61-8048. Los resultados se muestran como la media \pm EEM (n=6-8). Se dieron problemas en la cuantificación de picos de 3-HAA, para este metabolito el tamaño muestral es de 4-8. El análisis estadístico se llevó a cabo empleando ANOVA de dos vías seguido del test *post-hoc* de Tukey. * p<0.05, ***p<0.001, **** p<0.0001: vs. Veh. ## p<0.01: SNI vs. Sham. f p 0.05, *fff* p<0.001: vs. Sham+Ro.

DISCUSIÓN

Según los últimos datos disponibles en la literatura, el fentanilo, que se ha convertido en el principal fármaco responsable de la crisis por sobredosis de opioides en Estados Unidos, ha intensificado y exacerbado esta crisis de salud pública, previamente impulsada por el uso lícito e ilícito de otros opioides (Centers for Disease Control and Prevention, 2022; Ciccarone, 2019; Volkow & Blanco, 2023). Mas allá de su potencial de abuso, el fentanilo es altamente eficaz y se utiliza frecuentemente como analgésico y anestésico (Y. Han et al., 2019). De hecho, el uso de opioides es frecuente en el tratamiento del dolor neuropático (Dowell et al., 2016, 2023) a pesar de su incierta eficacia (Cooper et al., 2017; Derry et al., 2016; Mcnicol et al., 2013) y de ser considerados un tratamiento de tercera línea (Finnerup et al., 2015). Por otro lado, la vía de la kinurenina (KynP), la principal ruta catabólica del triptófano (TRP), se ha relacionado con numerosas patologías, especialmente a nivel del SNC (Schwarcz et al., 2012), incluyendo el abuso y la dependencia de drogas (Morales-Puerto et al., 2021), y el dolor neuropático (Ciapała et al., 2021; Maganin et al., 2022). En los últimos años, la intervención sobre la KynP se ha propuesto como una diana terapéutica novedosa para la modulación de la conducta de consumo y búsqueda de diferentes drogas de abuso, como el etanol, los cannabinoides, la cocaína o la nicotina (Morales-Puerto et al., 2021).

El objetivo de la presente Tesis Doctoral ha sido profundizar en la todavía apenas explorada relación entre la dependencia a los opioides y la KynP. Se ha investigado el efecto de la inhibición de KMO en un modelo preclínico de trastorno por consumo de opioides (TCO) consistente en la autoadministración operante intravenosa de fentanilo. Esta metodología presenta una gran validez de constructo y predictiva (O'Connor et al., 2011; Panlilio & Goldberg, 2007) y se considera el método *gold standard* para evaluar el potencial de abuso de agentes reforzantes (Slosky et al., 2022). Nuestros datos demuestran que la inhibición de KMO reduce el consumo y la búsqueda de fentanilo en todas las fases de la conducta adictiva, tanto en animales sanos como en aquellos sometidos a un modelo de dolor neuropático.

Establecimiento del modelo de autoadministración de fentanilo y tratamiento con Ro 61-8048

El primer estudio realizado permitió determinar que una dosis de 3.2 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{infusión}$ de fentanilo es óptima para la autoadministración intravenosa operante en los sujetos experimentales. Inicialmente, se implementaron diversas estrategias para incentivar la adquisición de la conducta operante, como la administración de una dosis no contingente de fentanilo (*priming*) al inicio de cada sesión, la restricción alimentaria o la colocación de comida húmeda sobre la palanca. Sin embargo, estas estrategias no fueron efectivas para promover la adquisición de la conducta operante con las dosis de 0.32, 1 o 10 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{infusión}$, mientras que sí lo fueron con la dosis de 3.2 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{infusión}$. El uso de esta dosis de fentanilo no solo facilitó una adquisición eficaz de la conducta operante conforme al criterio de estabilidad establecido, sino que también produjo un comportamiento relativamente estable y reproducible entre diferentes experimentos en las fases posteriores de mantenimiento, extinción y reinstauración. Estos resultados son coherentes con la literatura científica, que indica que las dosis de fentanilo eficaces en el paradigma de la autoadministración se encuentran en el rango de 2.5 a 3.2 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{infusión}$

(Ezeomah et al., 2020; Ren & Lotfipour, 2022; Townsend et al., 2021; Urbanik et al., 2022). Una vez que los animales lograron una autoadministración estable de fentanilo, se procedió a determinar si la inhibición de KMO, como se había observado en otros modelos preclínicos de trastorno por consumo de sustancias (TCS), reducía el consumo de fentanilo. Para ello se evaluó el efecto de la administración intraperitoneal (i.p.) de Ro 61-8048 30 min o 1 h antes del inicio de la sesión de autoadministración, en dosis de 50 o 100 mg/kg. Los resultados mostraron que la dosis de 100 mg/kg redujo el consumo de fentanilo en aproximadamente un 50%, independientemente del intervalo de tiempo de administración de Ro 61-8048 antes de la sesión y del régimen de administración (ya fuera en días alternos o consecutivos). En contraste, la dosis de 50 mg/kg no produjo una disminución significativa en el consumo. El empleo de 100 mg/kg es coherente con referencias publicadas en modelos preclínicos de TCS (Giménez-Gómez et al., 2018; Justinova et al., 2013; Secci et al., 2017), donde la administración de esta dosis de Ro 61-8048 también redujo de manera similar el consumo de etanol, del cannabinoide sintético WIN 55,212-2 o de nicotina. Sin embargo, en otros estudios, dosis más bajas, entre 40 y 50 mg/kg, han mostrado ser eficaces en la reducción de conductas adictivas inducidas por etanol o cocaína (Gil de Biedma-Elduayen et al., 2022; Vengeliene et al., 2016).

El protocolo de entrenamiento con comida facilita y uniformiza la posterior conducta de obtención de fentanilo

Un experimento piloto reveló un comportamiento errático, además de una gran variabilidad tanto cuantitativa como cualitativa, entre los animales en la adquisición espontánea de la conducta de autoadministración de fentanilo. Teniendo en cuenta el uso de criterios de estabilidad individuales para evaluar el consumo y la extinción, esta variabilidad interindividual complicaría la metodología necesaria para estudiar el efecto de Ro 61-8084 sobre las diferentes fases de la conducta adictiva inducida por fentanilo. La variabilidad interindividual en la conducta operante sería particularmente problemática durante la fase de adquisición y posiblemente generaría resultados menos consistentes y más susceptibles a la dispersión en el número de sesiones necesarias para lograr la conducta operante. Esto ocurriría independientemente de los efectos reforzantes del fentanilo, lo que sugiere que las diferencias individuales en la respuesta al fármaco podrían introducir un mayor grado de incertidumbre en los resultados experimentales. Para intentar controlar y reducir la variabilidad interindividual en la conducta operante, y posiblemente reducir el tiempo que los animales requerían para adquirir la conducta de autoadministración de fentanilo, se desarrolló un protocolo de entrenamiento con comida. El objetivo de este protocolo fue, por lo tanto, minimizar la influencia de la variabilidad individual durante la fase de adquisición de la conducta operante, evitando que esta opacara el efecto de Ro 61-8048 en dicha fase. Los datos sugieren que el protocolo es efectivo para entrenar a los animales en la gestión de la conducta operante. Esto se evidencia en su comportamiento coherente con las condiciones experimentales: los animales mostraron un mayor nivel de búsqueda y consumo de alimento durante la restricción alimentaria y una disminución de estos comportamientos cuando volvieron a disponer de comida *ad libitum*. Los resultados mostraron que el protocolo de entrenamiento con comida logró reducir aproximadamente un 45% el número de sesiones necesarias para que los animales alcanzaran el criterio de estabilidad en el consumo de

fentanilo. Por último, este protocolo no presentó efectos adversos significativos sobre el bienestar de los animales, ya que la pérdida de peso inducida fue inferior al 10% en comparación con el peso inicial, el cual se recuperó antes del inicio de la fase de autoadministración de fentanilo.

Ro 61-8048 es efectivo para modular la conducta adictiva inducida por fentanilo en sus diferentes etapas

La administración del **inhibidor de KMO** durante las siete primeras sesiones de consumo de fentanilo, **en la fase de adquisición, afectó tanto al consumo (medido como el número de infusiones obtenidas) como a la conducta de búsqueda de fentanilo (determinada por el número de veces que el animal presionó la palanca activa)**. Sin embargo, este efecto fue relativamente modesto, ya que solo se observó durante la segunda y tercera sesión de adquisición, sin influir en el número total de sesiones necesarias para alcanzar el criterio de estabilidad en el consumo de fentanilo. Una hipótesis que podría explicar el curso de los efectos observados sugiere que la exposición continuada a Ro 61-8048 hubiera producido cambios en receptores implicados en la neurotransmisión glutamatérgica. Ante las recurrentes y pronunciadas elevaciones de los niveles de KYNA inducidas por Ro 61-8048, se podría haber producido una regulación al alza de la expresión o funcionalidad de receptores glutamatérgicos, lo cual podría justificar la pérdida del efecto a partir de la cuarta sesión de adquisición. De esta forma, entre las sesiones 4 y 7, la disminución de la neurotransmisión glutamatérgica inducida por Ro 61-8048, con su correspondiente efecto sobre la dopaminérgica (Morales-Puerto et al., 2021), quedaría compensada por estos posibles cambios. Esta hipótesis es coherente también con el efecto rebote en la conducta de búsqueda evidenciado en la primera sesión de adquisición en la que los animales no recibieron el inhibidor de KMO (sesión 8). En esta sesión, al no estar presente el inhibidor de KMO y, por tanto, no elevarse los niveles de KYNA, no se contrarrestaría la liberación de dopamina en el sistema mesocorticolímbico inducida por fentanilo (Morales-Puerto et al., 2021; Secci et al., 2019), y además, la neurotransmisión glutamatérgica estaría potenciada por el aumento en el nivel de expresión o funcionalidad de receptores glutamatérgicos. Estos cambios se irían revirtiendo gradualmente a lo largo de las sesiones, lo que podría explicar la convergencia en la conducta observada entre los grupos vehículo y Ro 61-8048 a partir de la sesión 9. Además, cabe mencionar que este efecto rebote podría estar relacionado con una conducta operante más compulsiva, dado que cursa con un aumento en las pulsaciones de la palanca activa en periodos en los que estas no generan una infusión de fentanilo. Cabe mencionar que esta hipótesis podría ser válida en la fase de adquisición, pero no en mantenimiento u otras fases, dada la complejidad de los sustratos neurobiológicos implicados (Koob & Volkow, 2016).

Ro 61-8048 reduce en aproximadamente un 60% el consumo de fentanilo durante la fase de mantenimiento. Este efecto del inhibidor de KMO, administrado a una dosis de 100 mg/kg i.p, es altamente consistente, ya que se ha replicado en diferentes experimentos y con distintos grupos de animales, tanto mediante una única administración como a través de dosis repetidas en días alternos o consecutivos. La magnitud del efecto de Ro 61-8048 en la reducción del consumo de fentanilo es comparable con los resultados

observados en otros estudios preclínicos sobre el consumo de etanol (Gil de Biedma-Elduayen et al., 2022; Giménez-Gómez et al., 2018) y un cannabinoide sintético (Justinova et al., 2013), donde se han registrado disminuciones cuantitativamente similares en el consumo de estas sustancias.

La inhibición de KMO facilitó la extinción de la conducta de búsqueda de fentanilo, ya que redujo significativamente el número de respuestas sobre la palanca activa en la primera y tercera sesión de extinción. El efecto de Ro 61-8048 en la primera sesión de extinción fue particularmente robusto, mostrando una disminución superior al 75% en la conducta de búsqueda, que ha sido reproducida en dos experimentos independientes. Además, los animales sometidos a autoadministración de salino no exhibieron la conducta de búsqueda, lo que refuerza la validez aparente del paradigma de autoadministración y su valor predictivo (O'Connor et al., 2011; Panlilio & Goldberg, 2007). Este efecto tan marcado sugiere que Ro 61-8048 ejerce un potente efecto sobre el *craving*. Sin embargo, no parece que el inhibidor de la KMO potencie el aprendizaje de la extinción de la conducta de la búsqueda, ya que el número de sesiones necesarias para alcanzar el criterio de estabilidad en la extinción no varió entre los grupos. Se ha propuesto que la facilitación de la extinción de la conducta de búsqueda se puede lograr con compuestos que aumentan la neurotransmisión glutamatérgica. Entre estos compuestos se incluyen agonistas parciales de NMDAR, moduladores alostéricos positivos del receptor metabotrópico de glutamato mGlu5, inhibidores del transportador de glicina GlyT1, o moduladores alostéricos positivos del receptor AMPA (Cleva et al., 2010). En este contexto, sería coherente esperar que la administración de un compuesto como Ro 61-8048, que incrementa drásticamente los niveles de KYNA, un modulador alostérico negativo del receptor nicotínico de acetilcolina $\alpha 7$ ($\alpha 7$ nAChR) y por lo tanto reduce la liberación de glutamato inducida por drogas de abuso (Secci et al., 2019), no solo no facilite la extinción, sino que incluso pudiera dificultarla. Afortunadamente, en las condiciones experimentales utilizadas este efecto no se observó, lo que sugiere que el impacto de Ro 61-8048 en la extinción no fue perjudicial.

La modulación de la KynP mediante Ro 61-8048 ha demostrado ser efectiva en la prevención de la **reinstauración** de la conducta de búsqueda de varias drogas de abuso, incluyendo cannabinoides, alcohol, cocaína y etanol en distintos modelos animales (rata, ratón y mono ardilla) (Justinova et al., 2013; Secci et al., 2017; Vengeliene et al., 2016). En nuestro modelo de autoadministración intravenosa operante de fentanilo, la inhibición de la KMO mediante la administración de Ro 61-8048 (100 mg/kg, i.p) previno completamente la reinstauración de la conducta de búsqueda de fentanilo inducida por una dosis no contingente de la droga o por la presentación del estímulo condicionado asociado a fentanilo. Además, en el experimento realizado con animales sometidos a autoadministración de salino pudimos corroborar que Ro 61-8048 solo previene la reinstauración de búsqueda de fentanilo inducida por estímulo condicionado en animales dependientes, pero no en los controles salinos, constatando una vez más la validez del modelo experimental en esta fase de la conducta adictiva. Estos resultados, al igual que los observados durante la fase de extinción, indican que la inhibición de KMO ejerce un efecto beneficioso prominente sobre el *craving* reactivo, ya sea desencadenado por la propia droga o por los estímulos asociados a la misma. Este hallazgo sugiere que la modulación de la KynP podría ser una estrategia eficaz para reducir la vulnerabilidad a la recaída en individuos con dependencia a fentanilo.

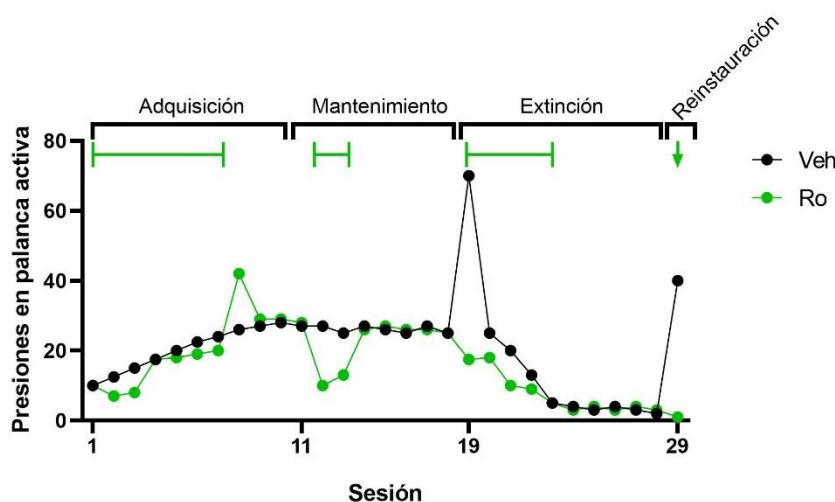


Figura 80 | Resumen del efecto de Ro 61-8048 (100 mg/kg i.p.) sobre las diferentes etapas de la conducta adictiva inducida por la autoadministración intravenosa operante de fentanilo. La inhibición de KMO afecta a la adquisición, mantenimiento, extinción y reinstauración de la conducta de búsqueda inducida por estímulo condicionado o por la droga. Los datos mostrados provienen de una compilación de diferentes datos obtenidos en el presente trabajo.

Ro 61-8048 incrementa los niveles de KYN y KYNA, y reduce los de QUIN en plasma y *nucleus accumbens*

Röver y colaboradores fueron los primeros en describir la síntesis de Ro 61-8048 y caracterizar su potente efecto inhibitor sobre la enzima kinurenina monooxigenasa (KMO) en ratas, en un estudio publicado en 1997 bajo el marco de su trabajo en Hoffman-La Roche (Röver et al., 1997). En este trabajo, los autores demostraron que la administración vía oral de una dosis de 21 o 42 mg/kg producía un aumento dosis-dependiente de los niveles de KYNA en el microdializado del hipocampo de ratas. Este hallazgo fue clave para comprender los efectos neuroquímicos del inhibidor de KMO, particularmente su capacidad para desviar el metabolismo de la kinurenina (KYN) hacia la producción de ácido kinurénico (KYNA), un antagonista del receptor NMDA, y reducir los niveles del ácido quinolínico (QUIN), un metabolito neurotóxico asociado con la activación de este receptor.

Con la administración de Ro 61-8048 a una dosis de 42 mg/kg, los niveles de KYNA permanecen elevados durante más de 6 h, alcanzando un valor máximo a las 4 h post-administración, con concentraciones que superan más de 7.5 veces los niveles basales. Por otro lado, la dosis de 21 mg/kg parece inhibir parcialmente la actividad de KMO, generando un aumento de aproximadamente 4 veces en los niveles de KYNA. A pesar de los avances en la metodología para cuantificar los metabolitos de la KynP y el papel neuroactivo relevante de muchos de estos compuestos, la caracterización de los efectos de Ro 61-8048 no ha progresado significativamente desde la publicación original de Röver y colaboradores. Las referencias bibliográficas que han influido en el campo neurocientífico respecto al uso de Ro 61-8048 para la modulación de la conducta adictiva se han basado, directa o indirectamente, en los hallazgos de este grupo, que describieron como el efecto inhibitor de KMO provoca un desvío del metabolismo de la KynP hacia producción de KYNA y acumulación de KYN. Tras esta publicación, quizá la aportación

más importante ha sido la demostración, mediante estudios de microdiálisis, de que la administración de Ro 61-8048 aumenta los niveles de KYNA en el *nucleus accumbens* (NAcc) y VTA de ratas, áreas que desempeñan un papel fundamental en el sistema de recompensa (Koob & Volkow, 2016). El aumento de los niveles de KYNA por acción de Ro 61-8048, o la administración de KYNA exógena en NAcc, genera una disminución de la liberación de dopamina (DA) inducida por THC o por el cannabinoide sintético WIN 55,2121-2, observada a través de microdiálisis en las mismas áreas cerebrales (Justinova et al., 2013). Este efecto sugiere que la modulación de la KynP, particularmente a través del aumento de KYNA, podría tener implicaciones relevantes en la regulación de la neurotransmisión dopaminérgica y, por ende, en la conducta relacionada con la recompensa y la adicción. Este efecto de Ro 61-8048 en la reducción de liberación de dopamina inducida por cannabinoides se ha replicado en el contexto de otras drogas de abuso, como nicotina (Secci et al., 2017) y etanol (Giménez-Gómez et al., 2018). Estos hallazgos son fundamentales y tienen un valor incalculable en la investigación de la neurobiología de la adicción, ya que destacan la influencia de la KynP en la regulación de la neurotransmisión dopaminérgica en respuesta a diferentes sustancias adictivas. Sin embargo, estos descubrimientos también podrían justificar el enfoque de estudios posteriores que se limitan a analizar únicamente los niveles de KYN y/o KYNA en plasma o en regiones del cerebro límbico (Gil de Biedma-Elduayen et al., 2022; Giménez-Gómez et al., 2018; Vengeliene et al., 2016). Este enfoque, aunque valioso, omite el análisis de otros metabolitos de la KynP que también podrían desempeñar roles neuroactivos significativos. La investigación de estos metabolitos podría proporcionar una comprensión más completa de los mecanismos subyacentes en la adicción y sus implicaciones terapéuticas.

Como se observa en la Tabla 5, en ninguno de los estudios que implican la modulación KynP por Ro 61-8048 para modular la conducta adictiva inducida por diferentes drogas se han analizado las concentraciones de metabolitos de la KynP distintos de KYN o KYNA, los cuales, como hemos descrito en la introducción, desempeñan un papel relevante en numerosos procesos fisiopatológicos. Esta observación nos llevó a considerar que el estudio de los metabolitos de la KynP en plasma y NAcc de los diferentes animales utilizados en esta Tesis Doctoral podría proporcionar información valiosa para el campo neurocientífico. Al ampliar el análisis a otros metabolitos de la KynP, podríamos obtener una comprensión más completa de los mecanismos subyacentes en la modulación de la conducta adictiva y sus implicaciones terapéuticas. Para llevar a cabo este estudio, establecimos una colaboración con el grupo de la Dra. Erdhardt en el *Karolinska Institutet*, el cual cuenta con un método innovador para la determinación simultánea de múltiples metabolitos de la KynP mediante UPLC-MS/MS en diferentes tejidos (Schwieler et al., 2020; Trepici et al., 2020, 2021). Los resultados obtenidos a partir de esta colaboración son altamente robustos gracias a la metodología empleada, que incluye el uso de estándares internos y controles de calidad. Esto ha permitido obtener medidas con una sensibilidad y precisión excepcionales en cada una de las tandas de análisis de las muestras. La utilización de esta metodología nos ha proporcionado la oportunidad de caracterizar en profundidad el efecto de Ro 61-8048 sobre los metabolitos de la KynP.

ESTUDIO	ESPECIE	DROGA / MODELO	ESTRATEGIA	METODOLOGÍA	CONSECUENCIAS BIOQUÍMICAS	CONSECUENCIAS FUNCIONALES
Esta tesis doctoral	Rata	Fentanilo	Ro 61-8048 (100 mg/kg, i.p)	UPLC – MS / MS	Plasma: : ↑ KYN, KYNA, 3-HK. ↓ TRP, 3-HAA, QUIN. ≈ : PA, NAA. NAcc: ↑ KYN, KYNA, 3-HK. ↓ QUIN. ≈ : TRP, 3-HAA, PA	↓ consumo y reinstauración de la conducta de búsqueda de fentanilo
Justinova et al., 2013	Rata, mono ardilla	WIN 55,212-2, THC	Ro 61-8048 (100 mg/kg, i.p)	HPLC - EQ	↓ de liberación de DA inducida por cannabinoides en VTA y NAcc	↓ consumo y reinstauración de la conducta de búsqueda de cannabinoides
Vengeliene et al., 2016	Rata	Etanol, cocaína	Ro 61-8048 (40 mg/kg, i.p.)	ELISA	Plasma: ↑ KYN	↓ de la reinstauración de la conducta de búsqueda de etanol y cocaína
Secci et al., 2017	Rata, mono ardilla	Nicotina	Ro 61-8048 (100 mg/kg, i.p.)	HPLC - EQ	↓ de liberación de DA inducida por nicotina en NAcc	↓ consumo y reinstauración de la conducta de búsqueda de nicotina
Giménez-Gómez et al., 2018	Ratón	Etanol (DID)	Ro 61-8048 (100 mg/kg, i.p.)	HPLC - UV / FM / EQ	↓ de la liberación de DA inducida por etanol en NAcc Cerebro límbico y plasma: ↑ KYN y KYNA	↓ del consumo y preferencia por etanol
Gil de Biedma et al., 2022	Ratón	Etanol (CIE)	Ro 61-8048 (50 mg/kg, i.p.)	HPLC - UV	Plasma, cerebro límbico: ↑ KYN	↓ del consumo y preferencia por etanol
Sundaram et al., 2020	Ratón	Encefalitis autoinmune	Ro 61-8048 (100 mg/kg, i.p., 1/día, 7 días)	UPLC, GC / MS	Plasma, cerebro, médula espinal: ↑ KYNA/QUIN. ≈ : KYN/TRP, PIC/QUIN	↓ de la severidad de los síntomas
Mole et al., 2016	Ratón, rata	AP-MODS	GSK 180	UPLC- MS / MS	Plasma: ↑ KYN y KYNA. ↓ TRP y 3-HK.	Protección a nivel de pulmón, hígado y riñón
Giorgini et al., 2013	Ratón	-	KO para KMO	HPLC - EQ, HPLC - FM, GC / MS	Plasma: ↑ KYN, KYNA y AA. ↓ 3-HK y QUIN. Cerebro: ↑ KYN, KYNA y AA. ↓ TRP, 3-HK y QUIN	-
Erhardt et al., 2017	Ratón	Esquizofrenia	KO para KMO	HPLC - EQ / FM	↓ 3-HK. ↑ KYNA	Ansiedad, alteraciones en memoria.
Bondulich et al., 2021	Ratón	Enfermedad de Huntington	KO para KMO	UPLC – MS / MS	Cerebro: ↑ KYN, AA, y KYNA. ↓ 3-HK y QUIN	Ausencia de mejora en indicadores primarios de la enfermedad.

Tabla 5 | Efecto de la inhibición de KMO. Se muestran diferentes estudios que han investigado la inhibición de KMO mediante estrategias genéticas o farmacológicas. Para cada estudio se incluye la especie animal empleada, la patología o droga de abuso bajo investigación, la metodología empleada para determinar los metabolitos de la KynP, los resultados de la inhibición sobre estos metabolitos y las consecuencias bioquímicas y funcionales de la intervención. DA: dopamina, DID: drinking in the dark, CIE: *chronic intermittent ethanol*, AP-MODS: pancreatitis aguda- síndrome de disfunción multiorgánica. UPLC- MS/MS: cromatografía líquida de ultra-alto rendimiento acoplada a espectrometría de masas en tándem. HPLC-EQ/FM/UV: cromatografía líquida de alto rendimiento acoplada a detección electroquímica, fluorimétrica o ultravioleta. GC/MS: cromatografía de gases – espectrometría de masas. ↑: aumento. ↓: disminución. ≈: inalterado.

Con el fin de obtener grupos con un tamaño muestral elevado y, por lo tanto, mayor poder estadístico, las muestras de plasma y NAcc provenientes de animales sacrificados tras la prueba de reinstauración de la conducta de búsqueda inducida por estímulo condicionado o fentanilo se agruparon según su tratamiento con el inhibidor de KMO o su correspondiente vehículo. **El plasma de animales tratados con Ro 61-8048 (100 mg/kg i.p., 2.5h antes de la obtención de la muestra) presentó una disminución de la concentración plasmática de TRP (-2.15x vs. Veh), ácido 3-hidroxiantranílico (3-HAA, -2.6x) y QUIN (-1.6x), y un aumento de los niveles de KYN (+9x), KYNA (+53x) y 3-hidroxicinurena (3-HK, +2.1x). Las concentraciones plasmáticas del ácido picolínico (PA) y nicotinamida (NAA) no se vieron alteradas por el inhibidor de KMO.** Los efectos observados sobre los metabolitos más estudiados en la literatura científica son coherentes, dado que la inhibición de KMO, ya sea mediante herramientas farmacológicas o genéticas, cursa con un aumento de la concentración plasmática de KYN, KYNA y una disminución de QUIN (Gil de Biedma-Elduayen et al., 2022; Giménez-Gómez et al., 2018; Giorgini et al., 2013; Higgins et al., 2024; Mole et al., 2016; Sundaram et al., 2020). No obstante, hemos observado efectos que contrastan con los hallazgos previos de la literatura. En primer lugar, la elevación de 3-HK en plasma es inesperada, ya que Ro 61-8048 inhibe la enzima KMO y, por lo tanto, debería provocar

una disminución de su producto. Además, hemos podido observar una disminución de los niveles de TRP plasmáticos, que solo ha sido descrito previamente con otro inhibidor de KMO, GSK180. Este efecto de GSK180 se atribuye a un desplazamiento del TRP en las proteínas plasmáticas, permitiendo que el TRP libre acceda rápidamente a tejidos. Es plausible que un mecanismo similar esté contribuyendo a la disminución de TRP plasmático inducida por Ro 61-8048 (Mole et al., 2016). La depleción de TRP podría ser perjudicial, dado que ha mostrado afectar negativamente a procesos cognitivos como la memoria, la atención y las funciones ejecutivas en humanos (Mendelsohn et al., 2009). No obstante, la depleción es frecuentemente obtenida mediante intervenciones dietéticas y los efectos de esta suelen asociarse con la disminución de los niveles de 5-HT, no habiéndose dado estos factores en nuestro estudio. Así, teniendo en cuenta que Ro 61-8048 no altera la concentración de TRP en NAcc, y que tampoco afecta los niveles de 5-HT en plasma o en hipocampo de rata (datos no mostrados), el potencial del tratamiento para afectar a funciones cognitivas por este mecanismo es limitado. Hasta donde llega nuestro conocimiento, el efecto de la inhibición de KMO sobre el resto de los metabolitos descritos en la presente Tesis Doctoral, apenas ha sido descrito previamente.

Antes de describir los efectos de Ro 61-8048 sobre el NAcc, es importante recordar que, de todos los metabolitos implicados en la KynP, solamente TRP, KYN, y, en menor medida, 3-HK, atraviesan con facilidad la barrera hematoencefálica (BHE). Esto es relevante ya que más del 60% de la KYN presente en el cerebro proviene de la periferia (Fukui et al., 2007; Gál & Sherman, 1980; Kita et al., 2002). Además, se ha demostrado que el flujo de KYN hacia SNC es esencial para el efecto de Ro 61-8048 sobre el consumo de alcohol en el modelo de exposición crónica intermitente a etanol (CIE) (Gil de Biedma-Elduayen et al., 2022). Por lo tanto, la producción de KYNA por la kinurenina aminotransferasa (KAT) en el cerebro depende de la disponibilidad de su sustrato, es decir, de la KYN (T. W. Stone et al., 2024).

La administración de Ro 61-8048 provoca en NAcc un aumento significativo de los niveles de KYN (+20x vs. Veh), KYNA (+53x) y 3-HK (+2.1x), así como una disminución de QUIN (-1.6x), sin afectar a la concentración de TRP, 3-HAA o PA. Los hallazgos sobre la acumulación de KYN, el aumento de KYNA y la disminución de QUIN son consistentes con la literatura existente que documenta los efectos de la inhibición genética o farmacológica de la enzima KMO (Bondulich et al., 2021; Gil de Biedma-Elduayen et al., 2022; Giménez-Gómez et al., 2018; Giorgini et al., 2013; Higgins et al., 2024; Mole et al., 2016; Sundaram et al., 2020; Vengeliene et al., 2016; Zheng et al., 2019). Sin embargo, al igual que lo que ocurre en el plasma, se observa un efecto paradójico de aumento de 3-HK que contrasta con la evidencia disponible en diferentes áreas del SNC de roedores (Bondulich et al., 2021; Giorgini et al., 2013; Higgins et al., 2024; Zheng et al., 2019). Por otro lado, la administración de Ro 61-8048 no ocasiona una disminución del TRP en el NAcc, hecho que contrasta con los resultados descritos por Giorgini en estudios realizados en la corteza cerebral de ratones KO para KMO (Giorgini et al., 2013). Aunque tanto la inhibición de KMO, ya sea por mecanismos genéticos o farmacológicos, como la ubicación de dicha inhibición, ya sea a nivel central o periférico, tienen implicaciones diferentes, los resultados sugieren que la respuesta del NAcc a Ro 61-8048 puede diferir en varios aspectos de la respuesta observada en otras regiones del cerebro, lo que subraya la complejidad de la modulación de la KynP y su impacto en el comportamiento adictivo.

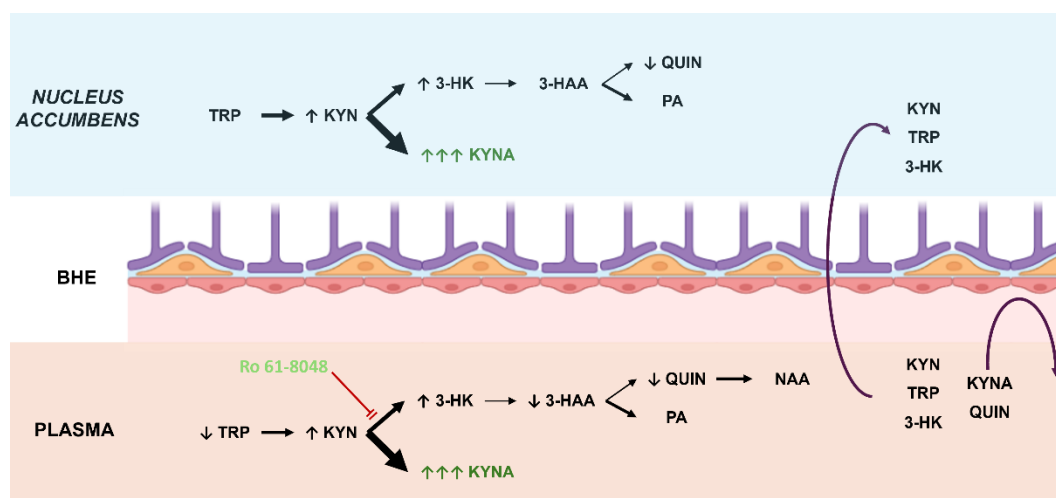


Figura 81 | Resumen de los efectos de Ro 61-8048 sobre los metabolitos de la KynP en plasma y NAcc. La inhibición a nivel periférico de KMO genera un aumento de la concentración de KYN, KYNA y, paradójicamente, de 3-HK, y una disminución de QUIN en el NAcc.

En resumen, la administración de Ro 61-8048 provoca en NAcc, un aumento de la concentración de KYNA, un metabolito generalmente asociado a efectos neuroprotectores, junto con una disminución de la concentración de QUIN, un metabolito con un marcado efecto neurotóxico. Paradójicamente, se observa también un aumento en los niveles de 3-HK, un metabolito que se produce a través de la actividad de KMO. Este aumento en los niveles de 3-HK podría plantear preocupaciones sobre un posible efecto neurotóxico, dado que este metabolito está asociado con la producción de radicales libres. No obstante, es plausible suponer que el significativo aumento de KYNA podría contrarrestar el potencial daño neurotóxico inducido por el incremento de 3-HK. Esto se debe a que KYNA tiene la capacidad de secuestrar radicales libres y proteger así las neuronas de los efectos dañinos que estos pueden causar (González Esquivel et al., 2017). En este contexto, el equilibrio entre KYNA y 3-HK en el NAcc podría ser crucial para entender la respuesta neuroprotectora frente a las condiciones neurotóxicas, lo que resalta la complejidad de la modulación de la vía de los metabolitos de la KynP en el contexto de la adicción y la neuroprotección.

Por último, una cuestión importante por discutir, que, hasta donde llega nuestro conocimiento, no se ha abordado en la literatura científica, es el hecho de que Ro 61-8048 aumente los niveles de KYNA en SNC, a pesar de que este compuesto no atraviesa la BHE (Zwilling et al., 2011) y, por lo tanto, no está inhibiendo la actividad de KMO a nivel central. De hecho, se están haciendo esfuerzos para sintetizar inhibidores de KMO que sí puedan atravesar la BHE, con el objetivo de tratar enfermedades neurodegenerativas (S. Zhang et al., 2021). La hipótesis más plausible para explicar el aumento de KYNA a nivel central radica en la dinámica de las enzimas implicadas, KAT y KMO. Cuando se administra Ro 61-8048, se produce un aumento de los niveles de KYN a nivel periférico, que puede atravesar la BHE y llegar al SNC (Fukui et al., 1991; Gál & Sherman, 1980). En el cerebro, la principal isoforma responsable de la producción de KYNA en roedores y humanos es KAT II, que presenta una alta afinidad por KYN. Esto implica que la disponibilidad del sustrato, en este caso KYN, es crucial para la formación de KYNA (T. W. Stone et al., 2024). Además, se ha demostrado que las KAT tienen una capacidad catalítica mayor que la de KMO, lo que significa que pueden seguir

transaminando KYN para producir KYNA incluso cuando KMO se satura a concentraciones relativamente bajas de KYN (aproximadamente 20 μM) (Bender & McCreanor, 1985; Kegel et al., 2014; Okuno et al., 1991). En esta situación, la saturación de KMO podría tener un efecto protector al limitar la formación del QUIN, un metabolito neurotóxico. Sin embargo, dado el aumento de KYN, la actividad de KAT podría continuar, lo que lleva a una acumulación adicional de KYNA en el SNC (A. A.-B. Badawy, 2017).

Ro 61-8048 es igualmente efectivo en la modulación de la conducta adictiva inducida por fentanilo en animales sometidos al modelo de dolor neuropático SNI

El modelo de dolor *spared nerve injury* (SNI) es un paradigma experimental ampliamente utilizado para el estudio del dolor neuropático. La denervación parcial del nervio ciático tiene como consecuencia la rápida aparición de hipersensibilidad mecánica y térmica en la región ipsilateral a la lesión. Estas alteraciones fisiológicas son robustas, reproducibles y persistentes, y no afectan a la extremidad contralateral a la lesión, lo que proporciona un control adecuado para las comparaciones. La similitud entre las alteraciones fisiológicas observadas en este modelo y las características clínicas de los síndromes de dolor neuropático, hacen que el mismo sea una herramienta valiosa para identificar mecanismos subyacentes implicados en el desarrollo del dolor neuropático y para evaluar la eficacia de potenciales tratamientos (Decosterd & Woolf, 2000). En nuestros experimentos, hemos reproducido de manera efectiva este modelo, observando que la pata contralateral no intervenida (derecha) generalmente no muestra alteraciones significativas, mientras que se mantiene una marcada alodinia mecánica en la pata izquierda a lo largo de toda la experimentación. Los estudios realizados nos han permitido evaluar de manera integral el impacto del modelo SNI en la autoadministración de fentanilo. Se ha investigado específicamente el efecto del tratamiento con Ro 61-8048 en el mantenimiento de la autoadministración fentanilo, así como en la reinstauración de la conducta de búsqueda inducida por estímulo condicionado y por una dosis no contingente de fentanilo en animales sometidos al modelo SNI. Adicionalmente, se ha llevado a cabo una evaluación del efecto de la autoadministración de fentanilo, Ro 61-8048 o la combinación de ambos sobre la alodinia mecánica asociada al modelo SNI, empleando el test de filamentos de Von Frey como método de medición.

En primer lugar, los resultados obtenidos en nuestro estudio muestran que **el modelo SNI no afecta significativamente al consumo o búsqueda de fentanilo en la adquisición de la conducta de autoadministración**. Sin embargo, se observó un sorprendente incremento inesperado en las respuestas en la palanca inactiva durante la primera sesión en los animales con SNI, un hallazgo que no tiene una explicación clara y que se normaliza en las sesiones subsiguientes. El comportamiento similar en relación con el consumo de fentanilo entre los animales SNI con respecto a los animales *sham* es consistente con estudios previos en los que no se encontraron diferencias significativas en el consumo de morfina en ratas sometidas al mismo modelo de dolor neuropático, lo que sugiere que el dolor neuropático *per se* no altera significativamente el desarrollo de la adquisición de la conducta operante para consumir opioides (Gutiérrez et al., 2021). En

cuanto a los efectos antinociceptivos, **la primera sesión de autoadministración de fentanilo ocasionó un aumento del umbral nociceptivo** medido mediante el test de Von Frey, tanto en los animales SNI como en los controles *sham*, lo que indica una disminución generalizada de la sensibilidad al dolor en ambas patas. No obstante, es importante resaltar que este efecto analgésico fue moderado y no afectó específicamente la alodinia mecánica en la pata afectada por la lesión (izquierda), ya que no se observaron diferencias significativas antes y después de la sesión de autoadministración de fentanilo en los animales SNI. Estos hallazgos sugieren que, aunque el fentanilo presenta propiedades antinociceptivas, su eficacia para aliviar la alodinia es limitada en las condiciones ensayadas. Estos resultados son parcialmente consistentes con los de Gutiérrez et al., 2021, en los que la autoadministración de morfina revertía parcialmente la alodinia mecánica, aunque en su estudio la morfina no modificaba el umbral nociceptivo en los animales control, a diferencia de lo que observamos con fentanilo. En conjunto, estos datos respaldan la evidencia previa que indica que los opioides, particularmente los agonistas totales del receptor μ -opioide (MOR), tienen una eficacia analgésica limitada en el contexto del dolor neuropático, lo que contribuye a que se consideren tratamientos de tercera línea en este tipo de dolor (Finnerup et al., 2015; Martínez-Navarro et al., 2019).

Tras diez sesiones de autoadministración se considera que los animales han alcanzado la fase de **mantenimiento**, en la cual se estabiliza el patrón de consumo de fentanilo. En esta fase, **la administración del inhibidor de KMO, Ro 61-8048, produce una marcada disminución tanto en el número de infusiones de fentanilo como en las respuestas en la palanca activa, lo que sugiere una reducción en la conducta de búsqueda y consumo de la droga. Los animales sometidos al modelo de dolor SNI muestran un consumo de fentanilo menor que los animales control**, aunque la magnitud del efecto es considerablemente menor que la disminución producida por Ro 61-8048. Existe además una **tendencia en esta fase hacia un efecto más pronunciado del inhibidor de KMO en los animales con SNI en comparación con los *sham*, tanto en el consumo de fentanilo como en la conducta de búsqueda de la droga**. Por un lado, podemos apreciar como el tratamiento con Ro 61-8048 reduce el consumo y la conducta de búsqueda de fentanilo de forma similar en animales sometidos a dolor neuropático con relación a animales *sham*. Por otro lado, el consumo de fentanilo mostrado en esta sesión es ligeramente inferior en animales con dolor neuropático, lo cual es acorde con la literatura científica, en la que se describe un consumo de opioides menor en animales con dolor neuropático. Martin et al. (2007) describieron que la autoadministración de opioides en animales con dolor neuropático solo se mantiene a dosis eficaces para revertir la hipersensibilidad mecánica y cursa con un patrón de consumo relacionado con la duración de reversión de la alodinia táctil. Además, describieron que los efectos reforzantes de los opioides se ven disminuidos en individuos con dolor neuropático en relación con los controles, particularmente con el uso de dosis de opioides ineficaces en la reversión de la hipersensibilidad inducida por la lesión (Martin et al., 2007). Como hemos visto anteriormente, el fentanilo exhibe un efecto analgésico modesto en animales sometidos al modelo de dolor neuropático SNI durante la primera sesión de autoadministración. Estos datos sugieren que el menor consumo de fentanilo en animales con dolor neuropático durante la fase de mantenimiento puede atribuirse al uso de una dosis insuficiente para revertir de manera significativa la alodinia mecánica. Al no obtener una

reversión adecuada del dolor, el fentanilo genera un menor efecto reforzante en estos animales, lo que concuerda con la literatura previa que indica que los opioides tienen menor eficacia analgésica y reforzante en el contexto del dolor neuropático cuando las dosis no son capaces de revertir la hipersensibilidad mecánica (Martin et al., 2007). A pesar de esto, este efecto del modelo SNI únicamente en mantenimiento es llamativo, y, teniendo en cuenta la ausencia de efecto en el consumo de fentanilo en la fase de adquisición, podría deberse al hecho de que solo se analiza la conducta mostrada en una única sesión.

En la sesión de **mantenimiento**, los resultados muestran que la **autoadministración de fentanilo influye en la alodinia mecánica inducida por el modelo SNI, mientras que el pretratamiento con Ro 61-8048 no parece tener un efecto directo sobre este parámetro**. Sin embargo, existe la posibilidad de un efecto sinérgico entre Ro 61-8048 y el fentanilo, lo que podría estar aumentando el umbral nociceptivo en los animales. Un hecho relevante es que, a pesar de que los animales tratados con vehículo consumieron un 80% más de fentanilo, no se observaron diferencias significativas en el umbral nociceptivo entre los grupos tratados con Ro 61-8048 y vehículo tras la sesión de autoadministración. Esto sugiere que el mantenimiento del umbral nociceptivo en los animales tratados con Ro 61-8048, a pesar de un menor consumo de fentanilo, puede estar vinculado a un posible efecto modulador del inhibidor de KMO sobre la eficacia analgésica del opioide. En particular, este fenómeno es evidente en los animales *sham*, en los que el umbral nociceptivo se mantuvo e incluso mostró una tendencia a aumentar, a pesar de haber consumido menos fentanilo cuando fueron tratados con Ro 61-8048. Esto sugiere un posible efecto potenciador del inhibidor de KMO sobre la acción antinociceptiva del fentanilo. En el caso de los animales SNI, donde el consumo de fentanilo fue nulo en el grupo tratado con Ro 61-8048, se observó una tendencia hacia una reducción del umbral nociceptivo en comparación con el grupo que recibió vehículo, justificable desde la perspectiva de la hipotética acción sinérgica de Ro 61-8048 y fentanilo. En ausencia de consumo de fentanilo, el potencial efecto sinérgico de Ro 61-8048 no puede presentarse. Si bien la hipótesis del efecto sinérgico de la autoadministración de fentanilo y Ro 61-8048 es plausible, puede que la ausencia de diferencia en el umbral nociceptivo, al menos en los animales SNI, este relacionado con la limitada eficacia analgésica de los opioides en el contexto de dolor neuropático (Martínez-Navarro et al., 2019).

El perfil del proceso de extinción de la conducta de búsqueda de fentanilo en los animales sometidos al modelo SNI es similar al de los animales *sham*, caracterizándose por una conducta de búsqueda en la primera sesión que se reduce progresivamente hasta alcanzar niveles muy bajos. Este patrón es coherente con la extinción típica observada en paradigmas de autoadministración. La persistencia de la conducta de búsqueda durante la extinción en modelos de dolor neuropático ha sido un foco de interés en estudios previos, como el de Gutierrez et al. (2021), quienes demostraron que ratas con la lesión SNI mantenían la conducta de búsqueda de morfina durante la fase de extinción, a diferencia de los animales control. Los autores argumentan que este comportamiento en los animales SNI está impulsado por un refuerzo negativo, es decir, la búsqueda del alivio del dolor neuropático, mientras que, en los animales control, el refuerzo positivo (euforia o placer) asociado a la morfina fue insuficiente para mantener la conducta de búsqueda en ausencia de la droga. En este estudio, el uso de una

dosis baja de morfina, en pocas sesiones de autoadministración (seis) y de corta duración (50 min), pudo haber contribuido a que los animales control no mantuvieran la conducta de búsqueda, ya que la motivación no era lo suficientemente fuerte como para superar los efectos de la extinción. Sin embargo, en los animales SNI, la presencia de dolor neuropático pudo haber generado una mayor motivación para obtener el opioide, debido al alivio que inicialmente proporcionaba, reflejando un refuerzo negativo condicionado por la ausencia de morfina. En contraste, nuestros resultados sugieren que, bajo las condiciones experimentales empleadas en esta tesis, el principal componente motivacional que subyace a la conducta de autoadministración en los animales SNI y control es el refuerzo positivo, más que el negativo, dado que ambos grupos mostraron perfiles de extinción similares, lo que indica que la búsqueda de fentanilo estaba más vinculada a su capacidad para generar efectos positivos inmediatos, y no tanto a la necesidad de aliviar el dolor en los animales SNI. Esto sugiere que el fentanilo, en las condiciones empleadas en este estudio en cuanto a dosis y sesiones, tiene un efecto reforzante positivo suficiente para motivar la conducta de autoadministración tanto en animales con dolor neuropático como en sus controles sin dolor.

Posteriormente, comprobamos que **únicamente la administración de Ro 61-8048 tiene un papel significativo en la prevención de la reinstauración de la conducta de búsqueda inducida por estímulo condicionado, sin que el dolor neuropático presente en los animales modifique este efecto.** Hasta donde llega nuestro conocimiento, no existen precedentes que aborden la reinstauración de la conducta de búsqueda de opioides en animales sometidos a un modelo de dolor neuropático. La similitud en los perfiles de reinstauración observados entre los animales SNI y los controles *sham* sugiere que las posibles diferencias en los estados motivacionales que subyacen a la conducta previa de autoadministración (refuerzo positivo en animales *sham* vs. refuerzo negativo en animales SNI) no afectan de forma diferenciada al *craving* reactivo en esta prueba (Gutierrez et al., 2021; Navratilova et al., 2012). Desde una perspectiva traslacional, estos hallazgos son particularmente relevantes, ya que sugieren que, independientemente de si el TCO tiene un origen iatrogénico o recreativo, el fenómeno de recaída a nivel funcional no se ve modificado por la presencia de dolor neuropático. Esto podría indicar que los procesos neurobiológicos y conductuales que subyacen al *craving* inducido por estímulo condicionado son similares entre pacientes con TCO, independientemente de su origen. Junto con esta sesión de autoadministración en la que se estudió la reinstauración, se valoró también el posible efecto antialodínico de Ro 61-8048 en animales sometidos al modelo SNI en el contexto de la prueba de reinstauración por estímulo condicionado. Tras el análisis de los valores del umbral nociceptivo antes y después de la sesión de autoadministración de salino y del tratamiento con el inhibidor de KMO, se observa que **la administración de Ro 61-8048 por sí mismo no presenta efecto antialodínico**, ya que no se encontraron diferencias significativas en el umbral nociceptivo en la pata afectada por la lesión tras la sesión y administración del tratamiento. Sin embargo, el tratamiento con **Ro 61-8048 produjo un efecto antinociceptivo en los animales *sham***, aunque estuvo **acompañado por un efecto anómalo de disminución del umbral nociceptivo en la pata no afectada**, lo que sugiere un efecto paradójico que requiere una mayor investigación para dilucidar su significado.

El efecto de Ro 61-8048 sobre la alodinia en el modelo de dolor neuropático, así como los efectos descritos en la fase de mantenimiento, contrastan con la evidencia preclínica

disponible. Aunque Laumet et al. (2017) reportaron que la administración repetida intracerebroventricular (i.c.v.) de Ro 61-8048 no afectó la alodinia en ratones con dolor neuropático inducido por el modelo SNI, otros estudios han mostrado efectos significativos cuando se emplean diferentes vías de administración o modelos. Por ejemplo, la administración intratecal (i.t.) aguda o repetida de Ro 61-8048 redujo la alodinia mecánica y la hiperalgesia térmica en ratas sometidas al modelo de constricción crónica del nervio ciático (CCI), y además potenció la eficacia analgésica de la morfina (Rojewska et al., 2016). Un estudio posterior del mismo grupo mostró que la inhibición repetida de KMO con UPF 648 redujo la hipersensibilidad inducida por el modelo CCI en ratas usando la misma metodología (Rojewska, Ciapała, et al., 2018). La especie animal no parece afectar estos efectos, dado que un estudio más reciente del mismo grupo realizado en ratones sometidos al modelo CCI replicó el efecto de la administración i.t. de UPF 648 descrito en el estudio previo. Además, mostró que la inhibición de KMO potencia el efecto analgésico de la administración i.t. de morfina y buprenorfina, pero no el de oxicodona. Empleando un diseño similar, tanto la administración i.t. como intravenosa (i.v.) de KYN redujeron la hipersensibilidad táctil y mecánica, y potenciaron la atenuación inducida por buprenorfina, morfina y oxicodona. De hecho, el pretratamiento i.t. con UPF 648 presentó un efecto sinérgico con la administración i.t. de KYN sobre la reducción de la hipersensibilidad mecánica y térmica (Ciapała et al., 2023). Cabe destacar que, en todos estos estudios, tanto la inhibición de KMO como la de IDO redujeron la hipersensibilidad mecánica y térmica (Ciapała et al., 2023; Rojewska, Ciapała, et al., 2018), sugiriendo que la modulación de la KynP tiene un efecto significativo sobre el dolor neuropático. Asimismo, la administración i.t. de KYNA o de sus precursores ha mostrado reducir la alodinia en distintos modelos de dolor neuropático en ratas y ratones (Pineda-Farias et al., 2013; Resta et al., 2016). En otro estudio, la administración i.t. de KYNA redujo la hipersensibilidad térmica y mecánica en ratones sometidos al modelo CCI (Resta et al., 2016). En conjunto, los resultados obtenidos en la presente Tesis Doctoral contrastan con la evidencia que respalda la efectividad de la modulación de la KynP en modelos preclínicos de dolor neuropático (Rojewska, Ciapała, et al., 2018). Todas las estrategias que han demostrado ser efectivas en la reducción del dolor neuropático empleadas en los estudios citados afectan directa o indirectamente (utilizando minociclina) a la KynP y favorecen la producción de KYNA. Este metabolito ejercería efectos analgésicos o antialodínicos a través de su acción antagonista en receptores NMDA y/o agonista en GPR35 (Hazrati et al., 2024; Rojewska et al., 2019). Sin embargo, en la presente Tesis Doctoral la marcada elevación de los niveles de KYN y KYNA a nivel periférico y central (NAcc) inducida por la administración de Ro 61-8048 no parece ser efectiva en la inducción de analgesia en animales con dolor neuropático, ni en la potenciación de la analgesia inducida por fentanilo. En los animales sin dolor neuropático, sin embargo, los efectos analgésicos de Ro 61-8048 son consistentes con los reportados tras la administración i.t. o i.p. de KYN (Heyliger et al., 1998; Kristensen et al., 1993). No obstante, no ha sido posible realizar una comparación directa con los estudios del grupo de Rojewska y colaboradores, ya que dichos estudios no incluyeron grupos control tratados con los distintos compuestos con potencial terapéutico (Ciapała et al., 2023; Rojewska, Ciapała, et al., 2018; Rojewska et al., 2016). Un factor diferencial clave en la mayoría de los estudios previos en relación con el nuestro es la vía de administración i.t., que podría tener un papel relevante, teniendo en cuenta que, por ejemplo, la vía de administración de los opioides es crucial para el alivio del

dolor neuropático. Se ha postulado que la baja eficacia analgésica de morfina en el dolor neuropático puede deberse a ausencia de receptores MOR funcionales en médula espinal tras la lesión. Esto explicaría por qué la administración i.c.v. de morfina produce efectos antialodínicos de forma dosis-dependiente, mientras que la administración i.t. ha mostrado ser, en general, ineficaz. De hecho, solo opioides con mayor eficacia intrínseca sobre MOR que la morfina, como endomorfina 1 o 2, han demostrado ser relativamente eficaces en el alivio de dolor neuropático cuando se administran por vía i.t. Otros autores sugieren que la baja potencia de la morfina administrada por vía sistémica o i.t. se debe a la pérdida de los componentes periféricos de la nocicepción, dado que el efecto de morfina se mantuvo con la administración i.c.v., disminuyó con la administración sistémica o i.t., y se perdió completamente con la administración local en el sitio de la lesión (Martínez-Navarro et al., 2019; Rashid et al., 2004). La falta de eficacia antialodínica de Ro 61-8048 observada en el presente estudio, al igual que en el de Laumet y colaboradores, podría deberse a que la administración de Ro 61-8048 por vía i.p. o i.c.v. no sea suficiente para afectar la transmisión nociceptiva a nivel de médula espinal (Laumet et al., 2017). Estos hallazgos sugieren la necesidad de explorar en las muestras de nuestros animales los niveles de metabolitos de la KynP, en particular KYN, KYNA y QUIN, así como la expresión de enzimas de la KynP, especialmente KMO, en medula espinal y ganglios de la raíz dorsal. Esto nos permitiría verificar la posible elevación de la concentración de KYNA en estas áreas e investigar en mayor profundidad los resultados observados, considerando el papel previamente descrito de los compuestos antagonistas de los receptores NMDA y agonistas GPR35 en estas áreas implicadas en la nocicepción, así como las alteraciones de la KynP a nivel de enzimas y metabolitos en estas áreas (Ciapała et al., 2023; Maganin et al., 2022; Resta et al., 2016; Rojewska, Ciapała, et al., 2018).

Después del proceso de reextinción, que fue similar en todos los animales, tanto en los sometidos al modelo SNI como en los controles, se procedió a realizar la prueba de **reinstauración de la conducta de búsqueda inducida por fentanilo**. A diferencia de experimentos previos donde se aplicó este protocolo, en los cuales se empleó una dosis de fentanilo 50 µg/kg s.c., en este caso se empleó una dosis de 15 µg/kg s.c. de fentanilo para inducir la reinstauración. El ajuste de la dosis no contingente de fentanilo, en comparación con experimentos anteriores de reinstauración inducida por la droga, se basó en la utilización de dicha dosis en la literatura científica (Malone et al., 2021), así como en la consideración de que una dosis mayor, y su consecuente efecto depresor, pudiera afectar significativamente los resultados al dificultar de forma notable la conducta operante durante la sesión de 1 h, a diferencia de lo ocurrido en las habituales sesiones de 2 h. Es importante señalar que, según nuestra experiencia, los efectos depresores de fentanilo a dosis relativamente altas suelen desaparecer entre 10 y 20 min tras la administración s.c. **La dosis no contingente de fentanilo empleada en este experimento no fue suficiente para inducir de manera robusta la reinstauración en los animales del grupo control (*sham*), y fue especialmente ineficaz en los animales con lesión SNI.** Al no observarse la conducta de reinstauración, **no fue posible evaluar el efecto de Ro 61-8048 sobre este comportamiento.** Un factor que podría haber influido en la ausencia de reinstauración de la conducta de búsqueda es el hecho de que los animales ya habían sido sometidos previamente a otra reinstauración, con su correspondiente extinción y reextinción. No obstante, la realización de pruebas sucesivas

de reinstauración tras periodos de reextinción es una práctica común en los estudios de autoadministración.

En resumen, los resultados obtenidos indican que la acción de Ro 61-8048 sobre la conducta adictiva inducida por fentanilo es igualmente efectiva en animales sometidos al modelo de dolor neuropático SNI y en animales control. La única diferencia observada en la conducta adictiva en animales con dolor neuropático SNI es una ligera reducción en el consumo de fentanilo durante la fase de mantenimiento. El modelo SNI produce de manera robusta, consistente y duradera la alodinia mecánica, como se demuestra mediante el test de filamentos de Von Frey. La autoadministración de fentanilo produce el esperado papel antinociceptivo, mientras que la administración de Ro 61-8048 parece producir analgesia únicamente en los animales del grupo control (*sham*). El pretratamiento con Ro 61-8048 en animales sometidos a autoadministración intravenosa operante podría tener un efecto sinérgico con fentanilo, pero se requieren estudios adicionales para confirmarlo. La literatura sugiere que la influencia del dolor en el consumo de opioides varía en función del opioide estudiado, la dosis, la vía de administración o una combinación de estos factores (Martin et al., 2007). Los resultados obtenidos concuerdan con la baja eficacia analgésica de los opioides y con la recomendación del uso de agonistas puros de MOR de alta eficacia como tercera línea de tratamiento para el dolor neuropático (Finnerup et al., 2015; Martínez-Navarro et al., 2019). No obstante, es importante considerar que los datos preclínicos no siempre correlacionan bien con la experiencia clínica en el tratamiento de dolor neuropático. Por ejemplo, algunos dolores neuropáticos severos se tratan con agonistas MOR sistémicos a pesar de las importantes RAMs asociadas al uso de opioides. Cabe destacar que muchos de los ensayos preclínicos para evaluar el dolor se basan en respuestas evocadas, lo que implica que miden los reflejos hiperreactivos asociados al dolor en lugar de la percepción del dolor en sí misma. Estos comportamientos reflejos no involucran la integración de la información nociceptiva a nivel central. Dado que la percepción consciente del dolor en humanos implica estructuras corticales, la falta de participación de la corteza en los ensayos que evidencian respuestas reflejas podría explicar la discrepancia de la eficacia de los tratamientos farmacológicos entre los estudios preclínicos y la práctica clínica. Además, la evaluación del dolor evocado no tiene en cuenta el impacto de los analgésicos sobre el dolor espontáneo, que es muy prevalente y relevante en pacientes con dolor neuropático. Finalmente, aunque los modelos de autoadministración pueden reflejar de manera más precisa el complejo procesamiento de la información nociceptiva en comparación con la administración no contingente de fármacos, también presenta desafíos metodológicos como se observó en esta Tesis Doctoral en relación con el efecto del inhibidor de KMO sobre la alodinia mecánica en ratas que no consumieron fentanilo.

La elevación de los niveles plasmáticos de QUIN o XA y la disminución de KYNA se han propuesto como biomarcadores de dolor crónico y dolor neuropático tanto en modelos animales como en humanos (Auyeung et al., 2023; Gunn et al., 2020; Laumet et al., 2017). En nuestros resultados, el modelo SNI afectó a la respuesta al tratamiento con Ro 61-8048, lo que se evidenció en un mayor aumento de KYNA y 3-HK en plasma de animales SNI tratados con el inhibidor de KMO, en comparación con los animales *sham* que recibieron el mismo tratamiento. En el NAcc, los animales sometidos al modelo SNI presentaron una menor concentración de 3-HAA que los animales *sham*, independientemente del tratamiento con Ro 61-8048. Además, el aumento de KYN y

KYNA inducido por Ro 61-8048 en NAcc fue más pronunciado en los animales SNI en comparación con los *sham*. No se encontraron diferencias adicionales a las previamente descritas que indiquen relevancia del modelo SNI en las concentraciones de metabolitos de la KynP en las muestras de plasma y NAcc analizadas. Aunque la literatura sobre los metabolitos de la KynP en el modelo SNI es escasa, nuestros hallazgos no replican los de Laumet y colaboradores, quienes observaron un aumento en la ratio QUIN/KYN en el hipocampo contralateral de ratones sometidos al modelo SNI. Las diferencias entre nuestro estudio y el de Laumet et al. podrían deberse a las distintas áreas cerebrales analizadas (hipocampo contralateral a la lesión vs. NAcc contralateral a la lesión) o a las diferencias entre especies animales. Por otra parte, el perfil de alteraciones en los metabolitos de la KynP producido por Ro 61-8048 en nuestro estudio replica en general los hallazgos obtenidos en animales sin dolor sometidos a la prueba de reinstauración. La única diferencia inesperada es la disminución de los niveles de PA en plasma, un efecto no observado en las muestras de animales sometidos a reinstauración inducida por estímulo condicionado o por fentanilo.

Mecanismo de acción de Ro 61-8048

El mecanismo propuesto mediante el cual la administración de Ro 61-8048 modula la conducta adictiva se basa en la reducción de la liberación de dopamina en el NAcc a partir de las proyecciones dopaminérgicas del VTA. Este efecto parece estar mediado principalmente por la acción del KYNA a través de dos mecanismos distintos. El primero, más estudiado, es la modulación alostérica negativa sobre los $\alpha 7$ nAChR (Albuquerque & Schwarcz, 2013; Hilmas et al., 2001). El segundo mecanismo es el antagonismo de KYNA sobre los receptores glutamatérgicos, especialmente en el sitio del coagonista glicina del NMDAR (Perkins & Stone, 1982; Schwarcz et al., 2012). En ambos casos, el resultado global es una disminución de la neurotransmisión glutamatérgica, lo que conduce a una reducción en la liberación de dopamina en el NAcc (Morales-Puerto et al., 2021).

Para evaluar la implicación de estos receptores en el efecto de Ro 61-8048 sobre la autoadministración de fentanilo, se evaluó el efecto del pretratamiento con el modulador alostérico positivo de $\alpha 7$ nAChR, PNU-120596, y el agonista del sitio de glicina del receptor NMDA, D-Serina (D-Ser). Se sabe que la inhibición de KMO aumenta la concentración de KYNA en NAcc. Dado que KYNA es un modulador alostérico negativo de $\alpha 7$ nAChR y un antagonista del sitio de glicina en el NMDAR, si la administración de PNU-120596 o D-Ser previniera la reducción de consumo de fentanilo producida por Ro 61-8048, podría confirmarse la participación de $\alpha 7$ nAChR o NMDAR en el efecto del inhibidor de KMO sobre el consumo de fentanilo.

El pretratamiento con PNU-120596 (8 mg/kg, i.p.) no afectó a la disminución del consumo de fentanilo inducida por Ro 61-8048 en la fase de mantenimiento. Por lo tanto, al menos en esta fase y bajo las condiciones experimentales empleadas en ratas sometidas a autoadministración intravenosa de fentanilo, **el efecto de Ro 61-8048 no parece estar mediado por $\alpha 7$ nAChRs**. Este resultado contrasta con los estudios previos descritos en la literatura científica, en los que la administración de PNU-120596 previno los efectos de Ro 61-8048 sobre otras drogas de abuso, como la reducción del consumo o la

reinstauración de la conducta de búsqueda inducida por etanol o cannabinoides en ratones, ratas o primates no humanos (Gil de Biedma-Elduayen et al., 2022; Giménez-Gómez et al., 2018; Justinova et al., 2013; Secci et al., 2017). De entre todos estos estudios citados, solo se emplearon ratas en los publicados por Justinova y Secci. En estos estudios, la dosis de PNU-120596 empleada fue de 1 mg/kg i.p. Aunque este grupo examinó el efecto de PNU-120596 sobre la disminución de la liberación de dopamina inducida por Ro 61-8048 tras la administración de THC, no investigó su impacto en la conducta de autoadministración de cannabinoides en ratas, sino en monos ardilla (Justinova et al., 2013). Por su parte, Secci y colaboradores demostraron que el pretratamiento con PNU-120596 previene el efecto de Ro 61-8048 sobre la disminución del consumo de THC y la reinstauración de la conducta de búsqueda de THC en monos ardilla (Secci et al., 2019). Interesantemente, en un estudio sobre autoadministración de nicotina en ratas, PNU-120596 no revirtió la reducción del consumo y la conducta de búsqueda inducida por Ro 61-8048, mientras que en monos ardilla sí lo hizo (Secci et al., 2017). La elección en nuestro estudio de una dosis alta de PNU-120596 se basó en los marcados incrementos en los niveles de KYNA inducidos por Ro 61-8048 y la falta de efecto de la dosis de 1 mg/kg en la reversión de los efectos de Ro 61-8048 en ratas sometidas a autoadministración de nicotina, descrito por Secci y colaboradores. La dosis elevada de PNU-120596 empleada en nuestros estudios no afecta la actividad locomotora en ratones (Freitas et al., 2013). Además, se ha descrito que dosis entre 1 y 8 mg/kg i.p. de PNU-120596 por sí mismo no influyen en el consumo de alcohol en modelos murinos de ingesta episódica de alcohol (DID) (Giménez-Gómez et al., 2019) o exposición crónica intermitente (CIE) (Gil de Biedma-Elduayen et al., 2022), ni tampoco en la conducta adictiva en fase de mantenimiento o reinstauración de autoadministración de THC o nicotina en ratas y primates (Justinova et al., 2013; Secci et al., 2017). En nuestro estudio, en la misma línea que los anteriormente expuestos, la administración de 8 mg/kg i.p de PNU-120596 no afecta por sí misma a la conducta de autoadministración de fentanilo. La variabilidad en la capacidad de PNU-120596 para prevenir los efectos de Ro 61-8048 se puede atribuir a diferencias entre las especies, ya que la concentración de KYNA es significativamente mayor en primates que en roedores. Además, la acción de KYNA sobre $\alpha 7$ nAChR está siendo recientemente objeto de debate por expertos. Algunos autores muy relevantes han señalado dificultades en la reproducibilidad de este efecto, argumentando que KYNA podría bloquear la neurotransmisión en sinapsis nicotínicas indirectamente, al interferir en la excitabilidad neuronal mediante el bloqueo de receptores glutamatérgicos, o al afectar la producción y liberación de acetilcolina (T. W. Stone, 2020; T. W. Stone et al., 2024). A pesar de esto, la evidencia acumulada apoya la interacción de KYNA con los $\alpha 7$ nAChR tanto *in vitro* como *in vivo* (Carpenedo et al., 2001; Morales-Puerto et al., 2021).

Habiendo descartado la participación de los $\alpha 7$ nAChR, evaluamos el efecto del pretratamiento con el agonista del sitio de glicina en el receptor NMDA, **D-Ser** (800 mg/kg, i.p.). Pudimos observar que **el pretratamiento con este compuesto no tuvo efecto sobre la disminución del consumo de fentanilo inducido por Ro 61-8048 durante la fase de mantenimiento**. Por lo tanto, bajo las condiciones experimentales empleadas, no podemos concluir que los NMDAR estén implicados en el efecto de Ro 61-8048 sobre la reducción del consumo de fentanilo. El uso de D-Ser ha mostrado ser efectivo en otros modelos de conducta adictiva, especialmente en relación con la cocaína.

Concretamente, D-Ser (100 mg/kg, i.p) favorece la consolidación del aprendizaje de extinción en un modelo de autoadministración de cocaína (Kelamangalath et al., 2009) y en el paradigma de preferencia de lugar condicionado, y, además, bloquea la sensibilización comportamental inducida por cocaína (Liu et al., 2016). Sin embargo, en nuestro estudio no se observó que tuviera efecto sobre la conducta de autoadministración de fentanilo, lo que sugiere que los mecanismos neurobiológicos subyacentes al efecto de Ro 61-8048 pueden diferir entre diferentes sustancias de abuso. Para tratar de antagonizar los posibles efectos de las concentraciones elevadísimas de KYNA producidas por Ro 61-8048, empleamos una dosis alta de D-Ser que ha sido empleada en otros estudios conductuales en ratas sin que afecte a la actividad locomotora (Bai et al., 2014; Malkesman et al., 2012). A pesar de que el mecanismo de acción de Ro 61-8048 mediado por NMDAR está mucho menos explorado en comparación con su acción por $\alpha 7$ nAChRs, nuestros resultados contrastan con estudios previos en los que la inhibición de NMDARs que contienen la subunidad GluN2B, mediante ifenprodilo, aminora la conducta adictiva inducida por opioides en modelos de autoadministración o preferencia de lugar condicionado (Ma et al., 2011; H. Shen et al., 2011). Asimismo, la memantina, un antagonista no competitivo de los NMDAR, ha mostrado eficacia en la reducción del consumo, el *craving* y el síndrome de abstinencia asociado al uso de opioides (Montemitro et al., 2021).

Habiendo descartado, al menos en las condiciones experimentales empleadas, la implicación de los receptores $\alpha 7$ nACh y NMDA en el efecto de Ro 61-8048 sobre el consumo de fentanilo, sería interesante constatar la ausencia del papel modulador de estos receptores con otros fármacos que intervengan sobre los mismos con un perfil farmacológico diferente. Teniendo en cuenta que KYNA puede actuar tanto sobre el sitio de glicina, como sobre el sitio de glutamato (Perkins & Stone, 1982; Schwarcz et al., 2012; T. W. Stone et al., 2024), sería pertinente evaluar si un agonista de NMDAR por sí mismo o en combinación con un agonista del sitio de glicina de NMDAR previene el efecto de Ro 61-8048 sobre el consumo de fentanilo. Con respecto a $\alpha 7$ nAChR, sería pertinente realizar ensayos con un agonista de estos receptores. Otro factor para considerar es que la droga de abuso y la fase de la conducta adictiva pueden influir en los resultados. Por ejemplo, Ro 61-8048 se ha mostrado eficaz para reducir la reinstauración de la conducta de búsqueda de cocaína en ratas (Vengeliene et al., 2016), pero no afecta a la autoadministración de cocaína en monos ardilla (Justinova et al., 2013; Secci et al., 2017), aunque sí reduce la reinstauración de la conducta de búsqueda de cocaína inducida por estímulo condicionado en estos últimos animales (Secci et al., 2017). Por esto, sería de interés desarrollar más experimentos para establecer la posible implicación de los $\alpha 7$ nAChR y NMDAR en una fase diferente a la de mantenimiento. Además, sería pertinente explorar en el futuro la posible participación de otros receptores que interactúan con KYNA. Entre estos se podrían considerar los receptores GPR35, AhR, AMPA y kainato. Aunque gran parte de la discusión sobre la inhibición de la neurotransmisión glutamatérgica se enfoca en los NMDAR, es crucial considerar que el bloqueo de los receptores AMPA y kainato por KYNA también podría desempeñar un papel significativo ya que estos receptores son fundamentales para mantener la excitabilidad neuronal basal que influye en la actividad de los NMDAR (T. W. Stone et al., 2024). Por último, un aspecto de especial interés sería analizar la liberación de dopamina y glutamato en áreas clave en el circuito de recompensa mesocorticolímbico, como PFC, VTA y NAcc. Esto

permitiría identificar con mayor precisión el mecanismo subyacente a la modulación de la conducta adictiva inducida por fentanilo por parte de Ro 61-8048, similar a lo realizado por Secci y colaboradores en sus estudios sobre THC (Secci et al., 2019) y en línea con los enfoques de Carpenedo o Zwilling (Carpenedo et al., 2001; Zwilling et al., 2011).

Perfil de seguridad preclínica de Ro 61-8048

Los experimentos realizados en la prueba de **campo abierto y en el Rotarod**, junto con la evaluación de la conducta operante inespecífica en el modelo de autoadministración mediante el análisis de las presiones en la **palanca inactiva**, nos permiten descartar que el **efecto de Ro 61-8048 se deba a factores no relacionados con su acción específica sobre la conducta adictiva, como alteraciones en la función motora, letargia o sedación**. Estos resultados proporcionan una visión preliminar del perfil de seguridad del inhibidor de la enzima KMO en ratas. Adicionalmente, el potencial traslacional de la acción de Ro 61-8048 sobre la conducta adictiva podría incrementarse si se demuestra que su acción es selectiva para las drogas de abuso, sin afectar a **reforzadores naturales** como la sacarosa o la comida. Esta selectividad sería un indicativo clave para el desarrollo de futuras terapias con un perfil de seguridad más favorable.

La administración de Ro 61-8048 provocó una disminución del 62% en la actividad locomotora, medida como la distancia total recorrida en la prueba de campo abierto.

En la literatura disponible, Ro 61-8048 a dosis entre 40 y 100 mg/kg (Gil de Biedma-Elduayen et al., 2022; Giménez-Gómez et al., 2018) no afecta a la actividad locomotora en ratas y ratones o lo hace de forma muy modesta (Vengeliene et al., 2016). Sin embargo, en hámsteres, reduce la actividad locomotora a dosis de 100 o 150 mg/kg, pero no inferiores (Richter & Hamann, 2003). Por otro lado, la administración de una dosis alta (200 mg/kg i.p.) de KYN ha mostrado no tener efecto sobre la actividad locomotora de ratas en la prueba de campo abierto (Vécsei & Beal, 1990). Sorprendentemente, hay estudios no relacionados con el análisis de los TCS en los que la inhibición de KMO ha mostrado efectos beneficiosos, como la restauración de la actividad locomotora en un modelo murino de endometriosis (Higgins et al., 2024). Además, en animales KO para la expresión de KMO en hepatocitos se ha observado un aumento de la actividad locomotora (Hayes et al., 2023). Estos datos sugieren que el efecto de la inhibición de KMO sobre la actividad motora es altamente variable, dependiendo del modelo animal, la estrategia seguida para la inhibición y las dosis utilizadas.

Teniendo en cuenta la disminución de la actividad locomotora observada, decidimos evaluar una posible afectación en la función motora mediante la prueba de *Rotarod*. Esta prueba es ampliamente utilizada para evaluar el aprendizaje y la coordinación motora, el equilibrio y la resistencia a la fatiga en roedores, pero también es útil para detectar letargia, sedación o alteraciones en la conducta motora motivada (Douton et al., 2022; Voigt et al., 2014). En nuestro estudio, la administración de **Ro 61-8048 (100 mg/kg i.p.) no afectó a la latencia de caída en la prueba de Rotarod, lo que indica que el tratamiento no comprometió la coordinación o el equilibrio de los animales**. Además, en el paradigma de refuerzo de razón progresiva, las ratas bajo la influencia de Ro 61-8048 realizaron numerosas presiones en la palanca activa para autoadministrarse fentanilo. Este comportamiento adicional refuerza la idea de que la reducción del

consumo o la búsqueda de fentanilo inducida por Ro 61-8048 no se debe a dificultades motoras, sedación, letargia o efectos inespecíficos sobre la conducta motora motivada. Estos resultados, en conjunto, sugieren que el efecto del inhibidor de KMO sobre la conducta adictiva es específico y no está relacionado con déficits en la función motora.

Justinova y colaboradores describieron que la administración i.p. de 100 mg/kg de Ro 61-8048 en ratas sometidas a la autoadministración de un cannabinoide sintético provocó una disminución en el número **de presiones sobre la palanca inactiva**. Sin embargo, en nuestros experimentos, la administración de Ro 61-8048 no alteró significativamente el número de pulsaciones de la palanca inactiva, salvo en los experimentos de reinstauración inducida por estímulo condicionado, en animales tanto con dolor neuropático como sin dolor. La diferencia observada en el grupo sin dolor podría deberse a un número anómalamente elevado de pulsaciones en la palanca inactiva antes del tratamiento en el grupo que recibió Ro 61-8048 y autoadministró fentanilo. No obstante, la magnitud de este efecto fue muy limitada en ambos experimentos. Incluso si esta disrupción inespecífica del comportamiento fuera significativa, su impacto sería pequeño en comparación con el efecto de Ro 61-8048 en la disminución del consumo o la búsqueda de fentanilo, como se refleja en la reducción de las presiones sobre la palanca activa. Además, el hecho de que Ro 61-8048 (30 mg/kg) reduzca el consumo de WIN 55,212-2 en ratas sin afectar significativamente a las respuestas sobre la palanca inactiva (Justinova et al., 2013) refuerza la idea de que el efecto del inhibidor de KMO en la conducta de autoadministración de fentanilo no es resultado de una disrupción inespecífica de la conducta operante. Estos hallazgos subrayan que la modulación del consumo o búsqueda de fentanilo inducida por Ro 61-8048 es un fenómeno específico relacionado con la conducta adictiva, y no con alteraciones motoras o comportamentales inespecíficas.

Los resultados obtenidos en la presente Tesis Doctoral con respecto al efecto de Ro 61-8048 sobre la autoadministración y consumo **de reforzantes naturales** contrastan notablemente con lo descrito previamente en la literatura científica. En estudios previos, la administración i.p. o intramuscular de 100 o 20 mg/kg de Ro 61-8048, respectivamente, no alteró el mantenimiento de la autoadministración de pellets de comida en ratas ni monos ardilla (Justinova et al., 2013). Asimismo, en experimentos realizados en nuestro propio laboratorio, la administración de 100 mg/kg de Ro 61-8048 i.p. no alteró el consumo voluntario de sacarosa o sacarina en un modelo de elección entre dos botellas en ratones (Giménez-Gómez et al., 2018). Sin embargo, en los experimentos realizados en esta Tesis, se observó que **Ro 61-8048 redujo el consumo de sacarosa y previno la reinstauración de búsqueda de pellets de sacarosa o comida inducida por estímulo condicionado**. Las variaciones en la respuesta a Ro 61-8048 podrían estar relacionadas con diferencias en la biología de los sistemas de recompensa entre especies o incluso entre cepas de ratas, lo que sugiere que la modulación de estos circuitos por KYNA podría tener un componente especie-específico o estar influenciada por factores genéticos que aún no han sido completamente elucidados. Sin embargo, parece bastante improbable que una diferencia tan marcada en la conducta se produzca por una diferencia así. El hecho de que el inhibidor de KMO prevenga la reinstauración de la conducta de búsqueda de sacarosa o comida inducida por estímulo condicionado en animales con disponibilidad ilimitada de comida sin afectar al peso de estos (datos no mostrados) puede verse desde otra perspectiva. Estos hechos nos sugieren que Ro 61-8048 tiene un efecto beneficioso sobre el *craving* reactivo a un estímulo condicionado asociado a los reforzantes naturales. Este

dato es relevante, ya que indica que la acción de Ro 61-8048 no está restringida exclusivamente a drogas de abuso, sino que también modula comportamientos relacionados con reforzadores naturales, como la comida. Desde una perspectiva mecanística, este resultado es coherente con lo que se sabe sobre los efectos de la inhibición de KMO en otros contextos. En primer lugar, el hecho de que Ro 61-8048 afecte al consumo y búsqueda de drogas de abuso ya ha sido bien documentado, como se ha observado con fentanilo en esta Tesis y con otras sustancias como cannabinoides, nicotina, cocaína o etanol en estudios previos. En segundo lugar, tanto las drogas de abuso como los reforzadores naturales activan vías dopaminérgicas mesolímbicas en regiones clave del circuito de recompensa, como el NAcc, donde generan una liberación de dopamina en respuesta a la ingesta o el consumo. Estos comportamientos, aunque asociados a diferentes tipos de reforzadores, comparten circuitos neuronales que regulan procesos críticos como la atribución de saliencia a incentivos, la motivación, el aprendizaje, el condicionamiento, el control inhibitorio y la regulación emocional. En este sentido, es plausible que la inhibición de la KMO, que lleva a un aumento de los niveles de KYNA y a la consecuente modulación de los receptores glutamatérgicos y nicotínicos, impacte de manera similar tanto en el *craving* por drogas como por comida. Además, los estudios sobre las redes mesocorticolímbicas, que subyacen al procesamiento de recompensas naturales y de drogas, han demostrado que estas redes están altamente interconectadas con áreas responsables del control emocional, la toma de decisiones y las funciones ejecutivas (Volkow et al., 2008). Esto sugiere que la inhibición de KMO puede tener un efecto de amplio espectro sobre los comportamientos impulsados por reforzantes, debido a su influencia sobre la homeostasis dopaminérgica y su posible impacto en la excitabilidad neuronal a través de receptores como los NMDA, AMPA o $\alpha 7$ nACh. Desde una perspectiva traslacional, los efectos de Ro 61-8048 sobre la conducta relacionada con la obtención y búsqueda de reforzadores naturales pueden interpretarse de dos maneras. En primer lugar, la disminución en el consumo y la búsqueda de reforzadores naturales observada podría sugerir un potencial efecto adverso, como la anhedonia o la pérdida de apetito, en el contexto del tratamiento de pacientes con TCO. En este sentido, estudios previos han mostrado que la administración de KYN puede inducir anhedonia, como se ha evidenciado en el test de preferencia por sacarosa en ratones (Salazar et al., 2012). Este posible efecto adverso plantea la necesidad de una evaluación cuidadosa en el desarrollo clínico de inhibidores de KMO para el tratamiento de TCO. Por otro lado, los resultados obtenidos también sugieren que los inhibidores de KMO podrían tener un potencial terapéutico en el tratamiento de otros trastornos, como el trastorno por atracón o la ingesta compulsiva. El hecho de que Ro 61-8048 reduzca el consumo de sacarosa y prevenga la reinstauración de la búsqueda de alimentos en respuesta a estímulos condicionados sugiere que este compuesto podría ser útil para controlar comportamientos compulsivos relacionados con el consumo de alimentos, lo que podría tener implicaciones clínicas en el manejo de trastornos alimentarios (Jordan et al., 2019). Finalmente, es relevante destacar que el tratamiento repetido con Ro 61-8048 durante siete sesiones en un estudio de autoadministración de fentanilo no alteró el peso corporal de los animales (datos no mostrados), lo que sugiere que el compuesto no afecta de manera significativa el consumo de alimentos o el metabolismo a largo plazo (Vengeliene et al., 2016). Esto apoya la idea de que los efectos de Ro 61-8048 sobre la conducta relacionada con los reforzadores naturales podrían ser específicos de situaciones de recompensa y no necesariamente inducir alteraciones globales en el balance energético.

La prueba de exploración en campo abierto, además de permitir evaluar los efectos del tratamiento sobre la actividad locomotora, proporciona una medida indirecta de la **ansiedad**. En este sentido, nuestros resultados apuntan a un efecto ansiogénico asociado a la administración 100 mg/kg de Ro 61-8048 que se manifiesta por un aumento del tiempo pasado en la periferia y una disminución del tiempo pasado en el centro del equipo, un patrón comúnmente interpretado como indicativo de mayor comportamiento ansioso en roedores. La literatura científica sobre el efecto de la modulación de la KynP en el comportamiento similar a la ansiedad es variada y depende de varios factores, como la especie, el paradigma experimental y las dosis utilizadas. En nuestro laboratorio, por ejemplo, se ha reportado que la administración de 50 mg/kg de Ro 61-8048 en ratones dependientes de etanol no induce un efecto ansiogénico en el laberinto en cruz elevado (Gil de Biedma-Elduayen et al., 2022). Sin embargo, otros estudios han mostrado que el aumento agudo o repetido de los niveles de KYNA mediante estrategias farmacológicas o genéticas puede inducir comportamientos indicativos de ansiedad en diversas pruebas, como la exploración en campo abierto, la caja iluminada/oscura o el laberinto en cruz elevada, tanto en ratones como en ratas (Erhardt et al., 2017; Olsson et al., 2012; Salazar et al., 2012; Vécsei & Beal, 1990). Es posible que la falta de efecto ansiogénico observado en el estudio de Gil de Biedma-Elduayen y colaboradores se deba a diferencias clave en el diseño experimental, como la utilización de una dosis más baja de Ro 61-8048 (50 mg/kg), la elección de una especie animal distinta y el uso de un modelo diferente para evaluar la ansiedad. Los resultados discrepantes en cuanto al perfil de efectos de Ro 61-8048 sobre la ansiedad subraya la importancia de realizar estudios adicionales para evaluar si una dosis más baja, como 75 mg/kg, podría ser igualmente eficaz en la reducción de la conducta adictiva inducida por la autoadministración de fentanilo en ratas, sin provocar efectos ansiogénicos.

Los posibles efectos ansiogénicos observados con Ro 61-8048 podrían estar relacionados con el aumento de los niveles de KYN y 3-HK tanto a nivel central como periférico, dado que se ha demostrado que tanto KYN, como 3-HK y QUIN tienen efectos ansiogénicos. Sin embargo, esta respuesta ansiogénica podría teóricamente contrarrestarse por el efecto ansiolítico de metabolitos como el KYNA, el ácido xanturénico (XA) y el ácido indolpirúvico, de los cuales se ha demostrado que poseen propiedades ansiolíticas (Kim & Jeon, 2018). Teniendo en cuenta el marcado incremento en las concentraciones centrales y periféricas de KYNA que genera Ro 61-8048, lo más plausible es que el balance entre metabolitos genere un perfil global ansiolítico, lo que contrasta con los resultados obtenidos en la presente Tesis Doctoral. A pesar de esto, por ejemplo, se han descrito niveles elevados de KYNA en pacientes con trastorno de ansiedad social (Butler et al., 2022), por lo que sería importante estudiar los cambios específicos en el equilibrio del resto de metabolitos implicados en ansiedad que no han sido analizados para entender mejor cómo la inhibición de KMO puede influir en el comportamiento relacionado con la ansiedad y excluir la posibilidad de que los incrementos tan marcados en KYNA puedan tener efectos ansiogénicos.

Las alteraciones en la KynP se han asociado a **déficits cognitivos** tanto en humanos como en modelos animales. En estudios con humanos, se ha observado que un incremento en el cociente KYN/TRP se correlaciona inversamente con el rendimiento cognitivo, afectando especialmente las pruebas que evalúan la memoria y el lenguaje, mientras que no se ha observado un impacto significativo en las funciones ejecutivas (Solvang et al.,

2019). En pacientes con depresión, un aumento en el cociente QUIN/KYNA se asocia con un menor rendimiento en tareas de memoria asociativa (Chirico et al., 2020). En cuanto al impacto específico de Ro 61-8048 en las funciones cognitivas de los roedores, la literatura indica que diferentes dosis de este compuesto no afectan negativamente a ciertas funciones cognitivas. Por ejemplo, la administración i.p. de 50 mg/kg de Ro 61-8048 no influye en la memoria en el test de reconocimiento de objeto novedoso (Gil de Biedma-Elduayen et al., 2022), y dosis de 100 o 20 mg/kg no alteran la memoria de trabajo en ratas o monos ardilla sometidos a la prueba de *delayed-matching to sample* (Justinova et al., 2013). En modelos de roedores, se ha demostrado que un aumento en los niveles de KYNA puede dar lugar a alteraciones cognitivas, incluyendo déficits en el filtrado sensorimotor en la prueba de inhibición pre-pulso (Erhardt et al., 2004; Shepard et al., 2003), así como en la memoria de trabajo (Chess et al., 2007), la memoria y el aprendizaje contextual (Chess et al., 2009; Pocivavsek et al., 2011) y la flexibilidad cognitiva (K. S. Alexander et al., 2012). Sin embargo, también existen evidencias que sugieren que la administración i.c.v. de dosis bajas de KYNA (0.5 µg) puede facilitar el aprendizaje y la consolidación de la memoria en ratones sanos, mediado por neurotransmisores como dopamina, noradrenalina, acetilcolina y péptidos opioides (Martos et al., 2022). La mayoría de los estudios citados anteriormente, donde se han evidenciado alteraciones en la cognición, han utilizado la administración sistémica de KYN, lo que podría sugerir que los efectos cognitivos atribuibles al aumento de KYNA en el SNC pueden ser en realidad consecuencia de otros metabolitos de la KynP, diferentes de KYNA o QUIN, que se generan secundariamente tras la administración de KYN. Sin embargo, algunos estudios que demuestran déficits cognitivos han utilizado la administración i.c.v. de KYNA (Martos et al., 2022; Pocivavsek et al., 2011), lo que reduce la plausibilidad de esta hipótesis.

En conjunto, la evidencia sugiere un papel diferencial en la afectación de las funciones cognitivas, dependiendo de la administración de ciertos metabolitos o inhibidores de la KynP y sus dosis correspondientes. Estos hallazgos subrayan la necesidad de realizar estudios en mayor profundidad sobre el efecto de diversas estrategias de modulación de la KynP y su impacto en las funciones cognitivas.

Ro 61-8048 no previene el desarrollo de abstinencia condicionada

Habiendo observado el marcado efecto de Ro 61-8048 sobre el *craving* reactivo a la administración no contingente de fentanilo o al estímulo condicionado asociado a este en ratas dependientes en situación de abstinencia tras la extinción de la conducta de búsqueda, evaluamos el efecto del inhibidor de KMO sobre el desarrollo de abstinencia condicionada inducida por naloxona. Para ello, utilizamos el paradigma de aversión condicionada de lugar (CPA) en ratas dependientes de fentanilo.

El protocolo experimental se desarrolló de manera adecuada, ya que se consiguió que los animales mostraran aversión hacia el compartimento asociado a la abstinencia inducida por naloxona, lo cual se manifestó como una disminución del porcentaje de tiempo y el número de entradas en el compartimento condicionado. El tratamiento con Ro 61-8048 no afectó a ninguno de estos parámetros, por lo que los resultados sugieren que Ro 61-

8048 no afectó a la abstinencia condicionada por naloxona en animales dependientes de fentanilo.

Es relevante comparar nuestros resultados con estudios que han evaluado la abstinencia inducida por opioides mediante la observación y cuantificación de síntomas físicos de abstinencia. Por ejemplo, la administración i.c.v. de KYNA atenúa la activación de neuronas en el *locus coeruleus* y reduce algunos de los síntomas de abstinencia inducidos por naloxona en ratas dependientes de morfina (Rasmussen, 1991). Otro estudio más reciente mostró que la inyección bilateral de KYNA en la médula rostral ventromedial reduce los síntomas somáticos y autonómicos de abstinencia inducidos por naloxona en ratas dependientes de morfina (Vera-Portocarrero et al., 2011). De hecho, a pesar de que existen evidencias contradictorias, en general, el empleo de distintos tipos compuestos con actividad inhibitoria sobre NMDAR se ha mostrado efectivo para reducir los síntomas de abstinencia inducidos en roedores dependientes de opioides. Por ejemplo, se ha empleado con éxito el antagonista del sitio de glicina en NMDAR felbamato, así como antagonistas no competitivos (MK-801) y competitivos (LY2774614) (Herman et al., 1995). Teniendo en cuenta estas evidencias y el aumento de la concentración periférica y central de KYNA inducido por Ro 61-8048, cabría esperar que el desarrollo de abstinencia condicionada fuera atenuado por los efectos bioquímicos de este inhibidor. Sin embargo, nuestros resultados no son directamente comparables con los estudios citados, ya que la discrepancia probablemente se deba al empleo del modelo CPA, el cual mide la aversión condicionada en lugar de los síntomas físicos de abstinencia, como sacudidas de cabeza (*wet-dog shakes*), rechinar de dientes, posturas corporales anormales, bostezos, acicalamiento excesivo, diarrea o pérdida de peso, entre otros. La aversión al compartimento condicionado en el modelo CPA no refleja la dependencia física a opioides en términos de síntomas de abstinencia, sino que evalúa el fenómeno de abstinencia condicionada. **En definitiva, el pretratamiento con el inhibidor de KMO durante la fase de condicionamiento en el protocolo CPA no afecta al desarrollo de abstinencia condicionada, ya que no previene la aversión al compartimento condicionado.** Estudios futuros que evalúen los síntomas de abstinencia física durante los días 5 y 7 del protocolo, cuando se condiciona a los animales con naloxona y se administra Ro 61-8048, nos permitirán determinar si el inhibidor de KMO tiene algún efecto sobre los signos y síntomas de abstinencia inducidos por naloxona en ratas dependientes de fentanilo.

Ro 61-8048 no afecta a la motivación para obtener fentanilo

El pretratamiento con el inhibidor de KMO no tuvo efecto sobre la conducta de las ratas en el paradigma de refuerzo de ratio progresivo (PR). En este esquema de refuerzo, los animales deben incrementar de manera exponencial el esfuerzo requerido para obtener cada dosis de fentanilo, lo que se ha empleado tradicionalmente para evaluar la motivación para obtener un reforzador. Sin embargo, recientemente algunos autores han argumentado que el paradigma de refuerzo de PR no mide exclusivamente la motivación, como se suele interpretar, ya que este paradigma también puede verse influenciado por factores como la sensibilización a la asociación conducta-resultado y el valor del refuerzo. Desde esta perspectiva, el paradigma PR podría interpretarse mejor como una medida de persistencia o intensidad motivacional (K. G. Bryant & Barker, 2024). **La ausencia de**

efecto del pretratamiento con el inhibidor de KMO sobre la conducta de las ratas en este paradigma sugiere que Ro 61-8048 no afecta los procesos motivacionales que subyacen al mantenimiento de la conducta o a la eficacia reforzante del fentanilo.

Una posible explicación para esta falta de efecto en el paradigma PR, en contraste con su eficacia en el paradigma de refuerzo fijo 1 (FR1), es que en el esquema PR el control de la conducta puede estar más relacionado con la expresión de hábitos ya formados, en lugar de una dirigida a objetivos. Es decir, la autoadministración en PR podría estar dominada por un control más automático e inflexible de la conducta. Desafortunadamente, no hemos podido encontrar en la literatura estudios que informen sobre tratamientos que modulen la conducta adictiva por opioides u otras drogas de abuso en un paradigma FR1, pero no en PR. Esto podría deberse a un sesgo de publicación, que limita los estudios que informan sobre la ausencia de efectos en paradigmas de motivación.

La conducta dirigida a objetivos, en condiciones normales, es flexible y se adapta a la información disponible, mientras que la formación de hábitos, aunque es un proceso adaptativo, puede llevar a un control de la conducta menos flexible. A través de la repetición prolongada, la conducta puede volverse automática, perdiendo sensibilidad a los cambios en el valor del reforzador o a nuevas contingencias (Dickinson, 1985; Everitt & Robbins, 2016; K. S. Smith & Graybiel, 2016). Dado que los comportamientos controlados por hábitos tienden a ser insensibles a los cambios en el valor del reforzador, un experimento que degrade la contingencia entre la conducta operante y la recompensa (por ejemplo, mediante la administración de dosis de fentanilo no contingentes) podría ser útil para evaluar el efecto de Ro 61-8048 en la sensibilización de la contingencia. En este diseño, los animales recibirían el mismo número de refuerzos independientemente de la conducta operante, lo que permitiría examinar si el inhibidor afecta la conducta dependiente de hábitos. Aunque la distinción entre conductas motivadas y aquellas controladas por hábitos ha sido concebida como una dicotomía, es probable que estas dos modalidades conductuales interactúen o se solapen en ciertos contextos (K. G. Bryant & Barker, 2024). Sería interesante explorar más a fondo estas interacciones para comprender mejor cómo Ro 61-8048 podría modular distintos aspectos del comportamiento adictivo.

El efecto de Ro 61-8048 sobre la conducta de búsqueda no está mediado por la alteración de la expresión de proteínas implicadas en la conducta adictiva inducida por opioides

El estudio de la expresión de proteínas en el NAcc de ratas sometidas a la prueba de reinstauración inducida por fentanilo, en el que la conducta de búsqueda fue prevenida por Ro 61-8048, se centró en proteínas relacionadas con la adicción a distintas drogas de abuso. El objetivo era investigar si estas proteínas podían mediar el efecto de Ro 61-8048 en la prevención de la reinstauración de la búsqueda de fentanilo tras la administración de una dosis no contingente.

No se observaron cambios significativos en la expresión de GluN2A, GluN2B, EAAT2, Akt (nativa y fosforilada) ni Erk1/2 (nativa y fosforilada) tras el tratamiento con Ro 61-8048. Los factores específicos que puedan haber contribuido a estos resultados serán discutidos en sucesivos párrafos, pero podrían estar afectados por el momento de

recolección de las muestras y el enfoque del procesamiento. Las muestras analizadas fueron recogidas 2.5 h después de un único tratamiento con Ro 61-8048, lo que sugiere que la cinética de la expresión de las diferentes proteínas podría haber desempeñado un papel crucial, además de que la evaluación se realizó en homogenado total y no en la superficie celular, lo que también podría haber limitado la detección de cambios. Cabe mencionar, además, que en estudios futuros se prevé la inclusión de un grupo control de ratas que se autoadministran solución salina, algo que no fue viable en este trabajo debido a la disponibilidad limitada de equipos.

La administración de Ro 61-8048 no altera la expresión total de las subunidades GluN2B o GluN2A del NMDAR en NAcc. Un estudio previo demostró que la expresión de GluN2B en el *core* del NAcc aumenta tras la extinción de la conducta de búsqueda de heroína, y que la administración de ifenprodilo, un antagonista específico de receptores que contienen GluN2B, reduce la reinstauración de la búsqueda de heroína inducida tanto por la droga como por estímulo condicionado (H. Shen et al., 2011). En el paradigma de CPP, este mismo fármaco bloquea de manera dosis-dependiente el desarrollo, mantenimiento y reinstauración de la preferencia de lugar inducida por morfina (Ma et al., 2011).

Ya hemos mencionado anteriormente que los fármacos que bloquean el NMDAR, como memantina, son eficaces en la reducción del consumo, el *craving* y los síntomas de abstinencia inducidos por opioides (Montemitto et al., 2021). Por otro lado, los agonistas parciales del receptor NMDA, como D-Ser o D-cicloserina, han mostrado ser eficaces en facilitar la extinción de la conducta de búsqueda (Cleva et al., 2010). A pesar de esta evidencia acumulada sobre el papel crucial de los receptores NMDA y la señalización glutamatergica en las diferentes fases de la conducta adictiva inducida por diversas drogas de abuso, nuestros resultados no muestran cambios significativos inducidos por el tratamiento con Ro 61-8048 en la expresión total de las subunidades GluN2B o GluN2A en el homogenado de NAcc. Esto sugiere que el efecto preventivo de Ro 61-8048 sobre la reinstauración de la conducta de búsqueda no parece estar mediado por la alteración de la expresión de las subunidades GluN2B o GluN2A del receptor NMDA en esta región del cerebro.

Shen y colaboradores describieron una disminución en la expresión en superficie de EAAT2 en el *core* del NAcc de ratas sometidas a extinción tras la autoadministración de heroína, la cual se acompaña de una reducción en la recaptación de glutamato, tanto *in vitro* como *in vivo*. El tratamiento con ceftriaxona restauró los niveles normales de expresión y actividad de EAAT2 en estos animales y redujo significativamente la reinstauración de la conducta de búsqueda de heroína inducida por estímulo condicionado. Los autores plantean la hipótesis de que la disminución de la recaptación de glutamato en NAcc *core* genera un “vertido” de glutamato (*spillover*) que difunde hasta el espacio extrasináptico, donde activa receptores NMDA que contienen subunidades GluN2B y receptores mGlu5. Esta activación desencadena una señalización intracelular mediada por calcio, lo que conduce a una potenciación sináptica (H. W. Shen et al., 2014). En definitiva, la regulación a la baja de EAAT2 puede aumentar la neurotransmisión excitatoria y facilitar la reinstauración de la conducta de búsqueda no solo de heroína, sino también de otras sustancias como cocaína y nicotina (Roberts-Wolfé & Kalivas, 2015). Un estudio adicional de Fujio y colaboradores mostró que la inyección

bilateral de adenovirus que aumentan la expresión de EAAT2 en el NAcc *shell* inhibió la preferencia condicionada de lugar inducida por morfina o metanfetamina (Fujio et al., 2005). A pesar de estas evidencias, los resultados obtenidos sugieren que el efecto del tratamiento con Ro 61-8048 no está mediado por una alteración en la expresión de EAAT2 en NAcc durante la prueba de reinstauración inducida por la droga. En su lugar, es probable que el efecto del inhibidor de KMO esté relacionado con una disminución de la señalización glutamatérgica inducida por Ro 61-8048, como se ha descrito previamente (Carpenedo et al., 2001; Secci et al., 2019; Zwilling et al., 2011).

La administración de Ro 61-8048 no induce alteraciones en la expresión de Akt, ni en su forma nativa ni fosforilada en Ser473 (pAkt-473). Zhu y colaboradores demostraron en 2021 que la expresión total de pAkt-473 se correlaciona con la incubación del *craving*, observándose niveles más elevados de esta proteína en el NAcc de ratas sometidas a reinstauración inducida por estímulo condicionado, con un incremento proporcional al tiempo de abstinencia. Además, el pretratamiento con un inhibidor de Akt redujo de manera dosis-dependiente tanto la conducta de búsqueda en la prueba de reinstauración como los niveles de pAkt-473. Estos hallazgos fueron reproducidos utilizando herramientas genéticas, mostrando que la regulación a la baja de la isoforma 1 de Akt en NAcc también atenúa la reinstauración de la conducta de búsqueda de heroína inducida por estímulo condicionado (Zhu et al., 2021). El efecto de los opioides sobre la activación de Akt parece ser dependiente de la región cerebral analizada. En un modelo murino de autoadministración oral de fentanilo, la expresión de pAkt-473 en homogenado total de corteza prefrontal dorsomedial disminuyó tras catorce días de abstinencia forzada (G. Li et al., 2023). Los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral sugieren que el efecto de Ro 61-8048 sobre el *craving* reactivo a una dosis no contingente de fentanilo no está mediado por modificaciones en la activación de Akt en NAcc. Esto indica que, aunque la vía Akt/pAkt-473 está implicada en la reinstauración de la conducta de búsqueda de opioides en otros contextos, Ro 61-8048 parece actuar a través de mecanismos diferentes a la modulación de esta vía en el NAcc.

Los opioides pueden activar la vía de señalización dependiente de β -arrestinas, lo que incluye la activación de kinasas, como Erk1/2 (Al-Hasani & Bruchas, 2011). En este contexto, Sun y colaboradores observaron una reducción en la expresión de pErk1/2 en el homogenado total de NAcc de ratas sometidas a la prueba de reinstauración de la conducta de búsqueda de heroína inducida por estímulo condicionado. Esta reducción en la expresión se acompaña de una disminución de la expresión de la forma fosforilada del factor de transcripción CREB (pCREB), el cual es sustrato de Erk1/2. Estos hallazgos son relevantes, ya que la inactivación de la señalización CREB podría contribuir al estado emocional negativo asociado con la abstinencia y a la incubación del *craving* tras un periodo prolongado de abstinencia (A. Sun et al., 2015). Sin embargo, estos resultados contrastan con los obtenidos en un modelo murino de autoadministración oral de fentanilo, donde no se apreció ninguna variación en la expresión de Erk1/2, ni en su forma nativa ni fosforilada, tras la prueba de reinstauración inducida por contexto asociado (G. Li et al., 2023). De manera similar, en nuestro estudio, la expresión de Erk1/2, tanto en su forma nativa como fosforilada, no se vio alterada en el NAcc de ratas sometidas a la prueba de reinstauración inducida por fentanilo. En conjunto, estos hallazgos sugieren que el efecto preventivo de Ro 61-8048 sobre la conducta de búsqueda de fentanilo no parece estar mediado por la modulación de la expresión de Erk1/2 o pErk1/2. Es posible

que las alteraciones en la señalización de Erk1/2, o su implicación, sean específicas del tipo de opioide empleado, como se sugiere al comparar los resultados de estudios que emplean heroína y fentanilo. Esta especificidad podría ser relevante para entender las diferencias en los mecanismos moleculares subyacentes a la conducta adictiva inducida por distintos opioides.

Metabolitos de la KynP como potenciales biomarcadores diagnósticos en TCO

Con el fin de identificar potenciales biomarcadores de TCO en nuestros animales, se llevó a cabo la cuantificación de metabolitos de la KynP por UPLC-MS/MS en plasma de animales sometidos a autoadministración de salino o fentanilo que recibieron Ro 61-8048 o su vehículo durante la prueba de reinstauración inducida por estímulo condicionado. Al tratar a los animales con el inhibidor de KMO, es posible obtener información valiosa sobre la eficacia terapéutica de Ro 61-8048 en la reinstauración de la conducta de búsqueda, así como determinar si este compuesto tiene el potencial de revertir alteraciones en los metabolitos de KynP que podrían haber sido inducidas por la administración de fentanilo.

En primer lugar, la historia de **autoadministración de fentanilo** generó un perfil de concentraciones plasmáticas diferencial caracterizado por unos niveles plasmáticos de **3-HK y QUIN ligeramente disminuidos**. Hasta donde llega nuestro conocimiento, solo existe un estudio que describe niveles disminuidos de KYN y TRP en pacientes con TCO (Ghanbari et al., 2021). En el caso del trastorno por consumo de alcohol destacan dos estudios que apuntan a niveles incrementados de QUIN y disminuidos de KYNA en plasma de pacientes en periodo de abstinencia alcohólica (Leclercq et al., 2021; Mechtcheriakov et al., 2022). A pesar de que la literatura relativa al potencial de metabolitos de la KynP como biomarcadores es escasa, y que no podemos comparar directamente nuestros resultados con los obtenidos en otras especies y modelos de diversas drogas, nuestros hallazgos contrastan con los de estos estudios, mostrando alteraciones frontalmente opuestas en comparación con los niveles plasmáticos observados en pacientes alcohólicos. Esto, sorprendentemente, sugiere que la historia de fentanilo puede ejercer un efecto teóricamente beneficioso a nivel de la KynP, al disminuir las concentraciones plasmáticas de dos metabolitos ampliamente caracterizados como neurotóxicos, 3-HK y QUIN. Estas diferencias en los perfiles de metabolitos pueden atribuirse, al menos parcialmente, a diferencias relativas a la especie, droga de abuso y la fase de la conducta adictiva estudiada.

Por otro lado, podemos observar cómo se replica el efecto de Ro 61-8048 de desviación de la KynP hacia la rama de producción de KYNA, como se describió en una sección anterior, aunque con ligeras diferencias. En este caso, se aprecian concentraciones plasmáticas elevadas de PA, mientras que los niveles de 3-HAA no muestran alteraciones significativas. Hay dos factores atribuibles *a priori* a estas diferencias observadas. El primero se relaciona con el uso de pentobarbital durante el sacrificio de los animales en los que se realizaron estas determinaciones. En contraste, en el resto de los grupos experimentales analizados no se empleó pentobarbital, ya que no se sacrificaron por perfusión. Es relevante destacar que el uso de este anestésico ha producido una

disminución de alrededor del 50% en los niveles plasmáticos de TRP, independientemente del tratamiento con el inhibidor de KMO, como se ha descrito previamente (Eriksson et al., 1981). Teniendo esto en cuenta, es posible que la utilización de pentobarbital como anestésico terminal haya afectado a la KynP y haya interactuado con el efecto de Ro 61-8048, lo cual podría explicar las diferencias observadas en las concentraciones de PA y 3-HAA en comparación con los otros grupos. El segundo factor que podría haber influido en estas discrepancias es el hecho de haber empleado diferentes animales en un periodo de tiempo diferente para los experimentos, lo que puede introducir variabilidad biológica en las mediciones de metabolitos. Esta variabilidad inherente en los sujetos puede contribuir a las diferencias en los perfiles de metabolitos observados y subraya la importancia de controlar las condiciones experimentales al interpretar los resultados.

En el mismo estudio, decidimos evaluar la concentración plasmática de metabolitos de la KynP en animales sacrificados durante la primera sesión de **extinción** o tras la **reinstauración** inducida por estímulo condicionado. El análisis realizado mediante UPLC-MS/MS del **plasma** de estos animales muestra que los individuos sacrificados tras la prueba de **reinstauración** presentan **concentraciones plasmáticas significativamente superiores de TRP, QUIN y PA. Por el contrario, los niveles de 3-HK son menores en comparación con los individuos sacrificados durante la primera sesión de extinción.** Estos hallazgos son relevantes, ya que muestran un perfil diferente de concentraciones plasmáticas de metabolitos de la KynP en dos situaciones distintas que comparten un factor en común muy importante: el *craving*. Este fenómeno subraya la posibilidad de que los metabolitos de la KynP puedan tener roles funcionales en la modulación de las conductas adictivas. Sería interesante investigar el papel funcional directo de alguno de estos metabolitos alterados según la fase de la conducta adictiva, mediante la administración de estos metabolitos en el NAcc y evaluar sus efectos en la conducta de búsqueda de droga o en el *craving*.

Finalmente, el efecto de Ro 61-8048 en este experimento, donde se evaluó la influencia de la fase de la conducta adictiva, reprodujo en general lo descrito en secciones anteriores. Sin embargo, se observaron diferencias en los metabolitos 3-HAA y PA en comparación con el efecto de Ro 61-8048 descrito en el experimento anterior con animales en reinstauración. Estos hallazgos sugieren que el contexto de la fase de la conducta adictiva puede influir en la respuesta a Ro 61-8048 y resalta la complejidad de la interacción entre el tratamiento farmacológico y el estado del sujeto en relación con la adicción.

Potencial terapéutico de Ro 61-8048 en TCO y dolor neuropático

Ro 61-8048 es efectivo en la modulación de la conducta adictiva inducida por fentanilo en ratas, ya que dificulta la adquisición, reduce el consumo, facilita la extinción y previene la reinstauración inducida por estímulo condicionado o una dosis no contingente de fentanilo. Además, Ro 61-8048 ejerce estos efectos con un perfil de seguridad a nivel preclínico relativamente favorable, ya que afecta de manera específica la conducta adictiva, sin alterar de forma significativa la función motora, cognitiva o la conducta operante inespecífica. No obstante, existe evidencia variada sobre el papel de Ro 61-8048 en la actividad locomotora espontánea, en la ansiogénesis, o en la obtención de reforzantes naturales, que sugiere una cierta cautela.

DISCUSIÓN

Para poder valorar adecuadamente el potencial de Ro 61-80148 como tratamiento para el TCO, es necesario considerar el estado de otras estrategias terapéuticas en desarrollo.

Una de estas estrategias son las inmunofarmacoterapias, incluidas las vacunas y los anticuerpos monoclonales dirigidos contra fentanilo y otros opioides. La inmunización con estos productos reduce la distribución de la droga al cerebro al atrapar la sustancia en la periferia. Esta estrategia ha mostrado resultados prometedores en estudios preclínicos, demostrando la capacidad de reducir los efectos analgésicos y de depresión respiratoria en roedores. De hecho, se está llevando a cabo un ensayo clínico en fase I de una vacuna para oxicodona (Volkow & Blanco, 2023). Sin embargo, una limitación importante de esta estrategia es su aplicabilidad en escenarios de consumo en el mundo real. En este contexto, sería necesario que la vacuna mostrara reactividad cruzada contra varios opioides, debido a la variedad de sustancias consumidas y la complejidad del mercado ilícito. Además, los esfuerzos previos en el desarrollo de vacunas contra la cocaína o nicotina fracasaron debido a la falta de una respuesta inmunitaria suficientemente robusta. En cuanto a la inmunización pasiva con anticuerpos, aunque podría ser efectiva, tiene menor potencial terapéutico debido a la necesidad de múltiples dosis (Y. Han et al., 2019; Volkow & Blanco, 2023).

Otra intervención no farmacológica en desarrollo es la neuromodulación, que puede ser invasiva o no invasiva y utilizarse como tratamiento único o coadyuvante para el TCO. Se están estudiando diversas técnicas como la estimulación magnética transcraneal (TMS), la estimulación de corriente directa transcraneal (tDCS, *direct current stimulation*), los ultrasonidos focalizados de baja intensidad (LIFU, *low-intensity focused ultrasound*) y la estimulación nerviosa periférica. Estas intervenciones buscan actuar sobre áreas y circuitos implicados en las conductas adictivas, con estudios que ya se han enfocado en la ínsula, la corteza cingulada anterior y la corteza prefrontal dorsolateral (Volkow & Blanco, 2023).

El resto de las estrategias terapéuticas que describiremos son de naturaleza farmacológica. Por un lado, se están explorando opciones que podrían llegar rápidamente al mercado mediante la estrategia de reposicionamiento de fármacos. Esto implica investigar fármacos ya aprobados para otras indicaciones, como el suvorexant (antagonista dual de receptores de orexinas) (James et al., 2020) o liraglutida (agonista del receptor de GLP-1) (Douton et al., 2022; Urbanik et al., 2022), que, de ser eficaces, podrían llegar a la clínica más rápidamente al estar ya autorizados para otras indicaciones terapéuticas.

Por otro lado, se están investigando fármacos antagonistas de KOR y del receptor del factor liberador de corticotropina (CRF) para reducir la reactividad al estrés, así como agonistas parciales o antagonistas del receptor de dopamina D3 (Jordan et al., 2019; You et al., 2019) para modular el consumo y la reactividad a estímulos asociados. También se están investigando antagonistas de los receptores de orexina 1 y de neuroquinina 1 para modular el circuito de recompensa. La mayoría de estos compuestos se encuentran en etapas preclínicas (Volkow & Blanco, 2023).

Un fármaco muy prometedor para el tratamiento del TCO y la sobredosis por opioides es el methocinnamox (MCAM). MCAM es un antagonista MOR con acción pseudoirreversible, lo que le confiere una potencia y duración notables. Además, actúa de manera reversible sobre los DOR. En estudios realizados en macacos *Rhesus*, la

administración de MCAM previene y atenúa repetidamente los efectos de depresión respiratoria inducidos por heroína, mostrando una duración de acción significativamente mayor que la naltrexona. En cuanto a su potencial para reducir la conducta adictiva, la administración de una única dosis de MCAM disminuye la autoadministración intravenosa de heroína en macacos *Rhesus*, tanto en el día de la administración como durante los diez días siguientes. Este efecto se acompaña de un perfil de seguridad adecuado en este modelo animal, ya que su administración no afecta a parámetros fisiológicos como presión arterial, frecuencia cardíaca o temperatura corporal (Gerak et al., 2019). El mismo grupo de investigación demostró en macacos *Rhesus* que una única dosis de MCAM reduce la autoadministración de fentanilo durante dos semanas, mientras que la naltrexona solo es efectiva durante la primera sesión de autoadministración. Además, la administración repetida (cinco dosis, una cada doce días) atenúa la autoadministración de fentanilo durante más de dos meses, incluso cuando los niveles plasmáticos del fármaco eran muy bajos. Es importante destacar que MCAM no afecta a la autoadministración de cocaína, lo que sugiere una selectividad específica para opioides (Maguire et al., 2020).

Otra molécula de interés en el tratamiento del TCO es la mitraginina, el principal alcaloide presente en las hojas de *Myragina speciosa*, comúnmente conocido como *kratom*. Su disponibilidad y uso se han incrementado debido a sus efectos moderadamente estimulantes y opioides, según la dosis administrada. Encuestas realizadas a usuarios de *kratom* revelan que lo usan para aumentar la energía y la concentración, aliviar el dolor, la ansiedad y la depresión, así como para reducir o cesar el uso de opioides de prescripción o heroína y mitigar los síntomas de abstinencia. La mitraginina es un agonista parcial del MOR y un antagonista competitivo de KOR y DOR. Además, se clasifica como un agonista sesgado hacia la señalización por proteínas G, lo que significa que podría evitar la señalización mediada por β -arrestinas, relacionada con efectos secundarios como estreñimiento, depresión respiratoria y dependencia. Estudios preclínicos han mostrado que la mitraginina tiene un potencial de abuso reducido, ya que no es susceptible de autoadministración en modelos animales y tampoco puede sustituir la autoadministración de morfina en ratas (Hemby et al., 2019). Además, disminuye de forma dosis-dependiente la autoadministración de heroína (Yue et al., 2018). Otro aspecto destacado de la mitraginina es su capacidad antinociceptiva, aunque su potencia es 66 veces menor que la de la morfina (Tabanelli et al., 2023). Su combinación de efectos analgésicos y su reducido potencial de abuso la convierten en una molécula prometedora para futuros tratamientos del TCO.

Un reciente estudio ha mostrado resultados similares a los obtenidos con MCAM utilizando oxa-noribogaina, un compuesto derivado de la estructura de la ibogaina, un alcaloide natural presente en *Tabernanthe iboga*. Oxa-noribogaina presenta actividad en varias dianas clave relacionadas con las conductas adictivas, actuando como antagonista del NMDAR, agonista parcial de KOR e inhibidor del transportador de 5-HT (SERT). Este compuesto novedoso ofrece varias ventajas sobre el ya conocido papel beneficioso de la ibogaina. Entre ellas, se destaca un mayor efecto terapéutico en la reducción del consumo de opioides y en la reinstauración de la conducta de búsqueda inducida por estímulo condicionado, tanto en modelos de adicción a fentanilo como a morfina. Una ventaja significativa de la oxa-noribogaina es la ausencia de los efectos cardiotoxicos asociados a la ibogaina. Además, oxa-noribogaina no genera efectos aversivos o pro-

depresivos, a diferencia de otros agonistas parciales de KOR. También presenta efectos antinociceptivos como se ha demostrado en ensayos de retirada de la cola y alivia la hiperalgesia mecánica inducida por opioides en ratas dependientes. En términos del tratamiento agudo, oxa-noribogaina reduce significativamente el consumo de fentanilo durante siete días y de heroína durante cuatro días (Havel et al., 2024). Estos hallazgos destacan su potencial como una prometedora opción terapéutica para el tratamiento del TCO.

Por último, Schwartz y colaboradores proponen el uso de fármacos moduladores de la glía para el tratamiento de TCO y el dolor crónico, dos patologías que están estrechamente relacionadas. Ibutilast ha mostrado en estudios preclínicos la capacidad de atenuar los síntomas de abstinencia, potenciar la analgesia inducida por opioides y reducir la liberación de dopamina en NAcc inducida por morfina. En estudios clínicos con pacientes dependientes de opioides, ibutilast mostró una disminución en la percepción de los efectos subjetivos positivos de oxicodona, en el punto de ruptura (*breakpoint*) en un protocolo de refuerzo en PR (razón progresiva) y en las puntuaciones del *craving*. La minociclina ha mostrado ser efectiva en modelos preclínicos al inhibir la activación glial inducida por opioides, retrasar la aparición de tolerancia, potenciar la analgesia, prevenir la hiperalgesia y reducir el refuerzo inducido por opioides. Sin embargo, los estudios en humanos dependientes de opioides han sido menos prometedores. Aunque esta tetraciclina es capaz de reducir los efectos subjetivos positivos de los opioides y mejorar las funciones cognitivas, no parece influir significativamente en el umbral de dolor, la tolerancia, el *craving* o los síntomas de abstinencia inducidos por opioides. La pioglitazona, un agonista de los receptores activados por proliferadores de peroxisomas gamma (PPAR γ), ha mostrado en estudios preclínicos la capacidad de inhibir la expresión de citoquinas en microglía y atenuar conductas adictivas. En usuarios de opioides, no mostró efectos positivos; sin embargo, en pacientes con TCO redujo el *craving* producido por heroína y la ansiedad. Finalmente, el dextrometorfano, un antagonista no competitivo del NMDAR, ha mostrado eficacia en la reducción del dolor agudo, el desarrollo de tolerancia a los opioides y los síntomas de abstinencia durante la desintoxicación. En pacientes en tratamiento con metadona, el dextrometorfano redujo el uso concomitante de opioides y mejoró la adherencia al tratamiento, probablemente debido a la reducción del *craving* y los síntomas de abstinencia (Schwartz et al., 2024).

El Instituto Nacional sobre el Abuso de Drogas estadounidense (NIDA, por sus siglas en inglés) público en 2018 un artículo en el que se aborda el desarrollo de medicamentos para enfrentar la crisis de opioides. Basados en la evidencia científica, los autores proponen diez mecanismos farmacológicos prometedores para responder a la crisis por sobredosis de opioides con mayor eficacia. Entre estos mecanismos se destacan algunos relacionados con fármacos discutidos previamente, como el antagonismo o la modulación alostérica negativa de receptores de orexina 1 y 2 (OX1R y OX2R), KOR, y fármacos moduladores de los receptores de dopamina D3. Además, se sugieren otras estrategias farmacológicas que implican la modulación de receptores como el GABA-B, muscarínico M5, AMPA, receptor opioide de nociceptina (NOP), mGlu2/3, ghrelina y de cannabinoides tipo 1 (CB1). En este mismo artículo inciden en otros hechos de vital importancia en cuanto al tratamiento del TCO. Los autores subrayan que, a pesar de que los tratamientos autorizados son efectivos, enfrentan importantes limitaciones. Dos de las principales barreras son: (1) la persistencia de sintomatología residual como el *craving* y

la abstinencia prolongada que puede durar semanas, meses, o años y (2) la elevada tasa de abandono del tratamiento, que a su vez está asociada a un mayor riesgo de sobredosis mortal (Bell et al., 2009; Degenhardt et al., 2015; Kimber et al., 2015). El artículo también destaca la complejidad inherente de la conducta adictiva, sugiriendo que las diferentes fases del desarrollo del TCO probablemente tengan bases fisiopatológicas diferentes, aunque estas puedan estar parcialmente solapadas. Por lo tanto, los autores consideran improbable que la modulación de una única diana farmacológica sea suficiente para abordar eficazmente las diferentes etapas de la conducta adictiva inducida por opioides (Rasmussen et al., 2018).

Este es precisamente uno de los factores que hace especialmente prometedores nuestros resultados sobre el uso de Ro 61-8048 en ratas sometidas a autoadministración intravenosa de fentanilo. Ro 61-8048, un inhibidor de la KMO, modula el consumo y la búsqueda de fentanilo en todas las fases del ciclo adictivo. En las fases de adquisición y extinción, el pretratamiento con Ro 61-8048 produce una reducción significativa del consumo y la búsqueda de fentanilo, respectivamente. Durante la fase de mantenimiento, Ro 61-8048 reduce el consumo de fentanilo en más de un 50% en ratas dependientes. Sin embargo, el efecto más notable es la prevención casi total de la conducta de búsqueda de fentanilo en ratas dependientes tras la exposición a una dosis no contingente de fentanilo o al estímulo condicionado asociado a la droga. Este hallazgo es especialmente relevante dado que entre el 90 y el 95% de los pacientes que sufren TCO experimentan recaídas (Kadam et al., 2017; Montiel Ishino et al., 2020; Smyth et al., 2010). Si bien es cierto, que para que realmente este último efecto tenga potencial traslacional, habría que asegurarse en primera instancia de la seguridad de la elevación crónica de los niveles de KYNA, especialmente sobre funciones cognitivas. En este sentido, recientemente se han obtenido resultados preliminares esperanzadores con respecto a la seguridad de la inhibición de KMO en humanos. En el primer ensayo clínico de fase I realizado hasta la fecha con un inhibidor de KMO, se ha mostrado que la inhibición de esta enzima, al menos mediante KNS366, es bien tolerada, segura, y no afecta al rendimiento cognitivo cuando es administrada durante siete días de forma continua (Edinburgh Innovations, 2024; EUDRACT:2022-003179-41, ISRCTN10496020: Safety, Tolerability, Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of KNS366, n.d.). Otro aspecto que subraya el potencial terapéutico de Ro 61-8048 es su eficacia en la modulación de la conducta adictiva inducida por otras sustancias de abuso, como alcohol, cocaína, nicotina o cannabinoides (Morales-Puerto et al., 2021). Esto sugiere que este inhibidor de KMO podría ser útil en el tratamiento en contexto de policonsumo, un fenómeno frecuente en pacientes con TCO (Ciccarone, 2019, 2021). Además, los efectos producidos por Ro 61-8048 sobre el consumo de fentanilo y la conducta de búsqueda observada en la prueba de reinstauración inducida por estímulo condicionado se reproducen en animales sometidos al modelo de dolor neuropático SNI. Esto sugiere, que el tratamiento es igualmente efectivo en condiciones donde la conducta adictiva está motivada por el alivio del dolor. Asimismo, se plantea la posibilidad de que Ro 61-8048 presente un efecto antinociceptivo sinérgico con el fentanilo, lo que refuerza aún más su potencial terapéutico en el manejo del dolor asociado a la adicción a opioides.

En resumen, esta Tesis Doctoral demuestra por primera vez que la inhibición de KMO mediante el uso de Ro 61-8048 y la consecuente elevación de los niveles de KYN y KYNA reduce el consumo y la conducta de búsqueda de fentanilo en todas las fases de la conducta adictiva en animales sometidos a un modelo de autoadministración intravenosa operante. Este efecto beneficioso sobre la conducta adictiva no parece estar justificado por alteraciones relevantes en la conducta operante inespecífica, funcionamiento locomotor o un posible efecto sedante del inhibidor de KMO. No obstante, se requieren estudios adicionales para profundizar en los efectos observados en la ansiogénesis, así como en la disminución de consumo o búsqueda de reforzantes naturales, como alimento o sacarosa, resultados que contrastan con la evidencia científica disponible. También en contraposición a lo sugerido por la literatura disponible, el mecanismo de acción del Ro 61-8048 sobre la conducta adictiva inducida por fentanilo no parece involucrar los receptores $\alpha 7$ nACh o NMDA. Esto sugiere que, al menos en las condiciones ensayadas en el presente estudio, el efecto podría estar mediado por otras dianas de KYNA, como los receptores AMPA, kainato, GPR35 o AhR. Además, el mecanismo de Ro 61-8048 no parece implicar alteraciones en la expresión de las subunidades GluN2A o GluN2B del receptor NMDA, el transportador astrocítico de glutamato EAAT2 o las quinasas Akt o Erk1/2. Por otro lado, se ha descrito por primera vez en profundidad el efecto de Ro 61-8048 sobre metabolitos de la KynP en NAcc y plasma, lo cual nos ha permitido constatar el desvío metabólico hacia la producción de KYNA y la acumulación de KYN, previamente descritos. Además, se ha observado una disminución de la concentración plasmática de TRP y una elevación paradójica de 3-HK en plasma y NAcc. También se han descrito diferencias en la concentración plasmática de metabolitos de la KynP en función de la exposición a fentanilo, la fase de la conducta adictiva o la presencia de dolor neuropático, lo que podría contribuir al desarrollo de biomarcadores novedosos para el TCO, las distintas fases del ciclo adictivo, o el dolor neuropático. Finalmente, los efectos de Ro 61-8048 sobre la conducta adictiva inducida por fentanilo se replican en las fases de mantenimiento y reinstauración de la conducta de búsqueda inducida por estímulo condicionado en animales sometidos al modelo de dolor neuropático SNI. En conjunto, los resultados sugieren que la modulación de la KynP podría constituir una herramienta terapéutica eficaz para el tratamiento del TCO en sus diferentes fases, tanto en individuos sanos como en aquellos que sufren dolor neuropático.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. El modelo de autoadministración intravenosa operante de fentanilo, 3.2 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{infusión}$ con esquema de refuerzo de razón fija 1 (FR1), establece una conducta operante sólida en animales, permitiendo la adquisición, mantenimiento, extinción y reinstauración de la conducta de búsqueda de fentanilo tras la exposición a una dosis no contingente de fentanilo o al estímulo condicionado asociado al mismo. La administración del inhibidor de kinurenina monooxigenasa, Ro 61-8048, a la dosis de 100 mg/kg reduce el efecto reforzante de fentanilo, mientras que 50 mg/kg es una dosis insuficiente.
2. Ro 61-8048 modula las propiedades reforzantes y el *craving* inducido por fentanilo en animales sanos y con dolor neuropático, afectando comportamientos como la alodinia mecánica en estos últimos.
 - 2.1. El pretratamiento con Ro 61-8048 modula la capacidad reforzante y el *craving* inducido por fentanilo, disminuyendo tanto el consumo como la conducta de búsqueda en todas las fases de la conducta adictiva. Estos efectos no parecen estar mediados por los receptores $\alpha 7$ nACh o NMDA, ni asociados a cambios en la motivación para obtener el opioide.
 - 2.2. El efecto de Ro 61-8048 sobre la conducta adictiva no se relaciona con alteraciones en la función locomotora ni con efectos sedantes o letárgicos. Sin embargo, Ro 61-8048 induce ansiogénesis y disminuye el consumo y la búsqueda de reforzadores naturales.
 - 2.3. Ro 61-8048 no parece reducir el *craving* inducido por fentanilo mediante la mitigación del estado aversivo asociado a la abstinencia.
 - 2.4. La conducta adictiva inducida por fentanilo en animales con dolor neuropático es similar a la de los animales sin dolor, aunque su consumo en la fase de mantenimiento es ligeramente inferior. El efecto de Ro 61-8048 sobre el *craving* y el refuerzo inducido por fentanilo en el modelo de dolor neuropático SNI es comparable al de los animales control. La autoadministración de fentanilo produce un efecto antinociceptivo moderado, potenciado por el pretratamiento con Ro 61-8048. Este compuesto por sí mismo no afecta a la alodinia mecánica inducida por el modelo de dolor neuropático.
3. El efecto beneficioso de Ro 61-8048 sobre el *craving* inducido por fentanilo se asocia con alteraciones en las concentraciones de metabolitos de la vía de la kinurenina (KynP) en el *nucleus accumbens* (NAcc) y plasma, pero no con cambios en la expresión de proteínas implicadas en trastorno por consumo de opioides. Además, estos metabolitos también se ven afectados por la historia de autoadministración de fentanilo, la fase de la conducta adictiva y el modelo de dolor neuropático SNI. Estos hallazgos sugieren que los metabolitos de la KynP podrían ser biomarcadores en el trastorno por consumo de fentanilo y el dolor neuropático.
 - 3.1. Ro 61-8048 impacta a la KynP de manera que trasciende su previamente descrito efecto neuroprotector, favoreciendo la producción de ácido kinurénico (KYNA) mediante la acumulación de kinurenina (KYN) y la reducción de ácido quinolínico (QUIN) en plasma y NAcc. Paradójicamente, se observa un aumento

moderado de 3-hidroxikinurenina (3-HK) en ambos tejidos, junto con una disminución en las concentraciones plasmáticas de triptófano (TRP) y ácido 3-hidroxiantranílico (3-HAA). En el modelo de dolor neuropático SNI los niveles de 3-HAA en el NAcc se reducen, mientras que los incrementos inducidos por Ro 61-8048 de KYNA y 3-HK en plasma, y de KYN y KYNA en NAcc, son potenciados. Además, en animales con una historia de autoadministración de fentanilo, las concentraciones de 3-HK y QUIN en plasma son más bajas. Finalmente, la fase de conducta adictiva inducida por fentanilo genera un perfil alterado en los metabolitos de la KynP, con mayores concentraciones de TRP, QUIN y ácido picolínico (PA), y menores de 3-HK tras la reinstauración en comparación con la extinción.

3.2. Los efectos de Ro 61-8048 en la prevención de la conducta de búsqueda durante la fase de reinstauración inducida por fentanilo no están relacionados con cambios en la expresión proteica de GluN2A, GluN2B, EAAT2, Akt o Erk1/2 en el NAcc, ni en sus formas nativas ni fosforiladas.

En conjunto, este estudio sugiere que la inhibición de KMO mediante Ro 61-8048 podría ser una estrategia terapéutica efectiva para reducir el consumo y la conducta de búsqueda de fentanilo en sujetos sanos y con dolor neuropático y destaca el potencial de los metabolitos de la KynP como biomarcadores del trastorno por consumo de opioides.

CONCLUSIONS

CONCLUSIONS

1. The operant intravenous fentanyl self-administration model at 3.2 µg/kg/infusion under a fixed ratio 1 (FR1) schedule of reinforcement establishes robust operant behaviour in animals, enabling the acquisition, maintenance, extinction and reinstatement of fentanyl-seeking behaviour following exposure to a non-contingent dose of fentanyl or the associated conditioned stimulus. Administration of the kynurenine monooxygenase inhibitor Ro 61-8048 at a dose of 100 mg/kg reduces the reinforcing effect of fentanyl, whereas 50 mg/kg is insufficient.
2. Ro 61-8048 reduces the reinforcing and craving-inducing properties of fentanyl in both healthy rats and those exposed to the spared nerve injury model (SNI) of neuropathic pain, affecting behaviours such as mechanical allodynia in the latter.
 - 2.1. Ro 61-8048 pretreatment modulates the reinforcing effect and fentanyl-induced craving, reducing both consumption and drug-seeking behaviour across all phases of addictive behaviour. These effects do not appear to involve $\alpha 7$ nACh or NMDA receptors, nor are they linked to changes in motivation to obtain the opioid.
 - 2.2. The effect of Ro 61-8048 on addictive behaviour is not related to an impairment of locomotor function, sedative or lethargic effects. However, Ro 61-8048 induces anxiogenesis and reduces the consumption and seeking-behaviour of natural reinforcers.
 - 2.3. Ro 61-8048 does not appear to reduce fentanyl-induced craving by mitigating the aversive state associated with withdrawal.
 - 2.4. Fentanyl-induced addictive behaviour in animals experiencing neuropathic pain is similar to that in control animals, though consumption during the maintenance phase is slightly lower. The effect of Ro 61-8048 on craving and reinforcement of fentanyl in the SNI neuropathic pain model is comparable to that in pain-free animals. Fentanyl self-administration produces a moderate antinociceptive effect, enhanced by Ro 61-8048 pretreatment. This compound alone does not affect mechanical allodynia induced by the neuropathic pain model.
3. The beneficial effect of Ro 61-8048 on fentanyl-induced craving is associated with changes in kynurenine pathway (KynP) metabolite concentrations in the *nucleus accumbens* (NAcc) and plasma, but not with alterations in the expression of proteins involved in opioid use disorder. Additionally, these metabolites are also affected by fentanyl self-administration history, the phase of addictive behaviour, and the SNI neuropathic pain model. These findings suggest that KynP metabolites may serve as biomarkers in fentanyl use disorder and neuropathic pain.
 - 3.1. Ro 61-8048 impacts the KynP beyond its previously described neuroprotective effect, promoting kynurenic acid (KYNA) production through kynurenine (KYN) accumulation and quinolinic acid (QUIN) reduction in plasma and NAcc. Paradoxically, a moderate increase in 3-hydroxykynurenine (3-HK) is observed in both tissues, along with a decrease in plasma tryptophan (TRP) and 3-hydroxyanthranilic acid (3-HAA) concentrations. In the SNI model,

3-HAA levels in the NAcc are reduced, while Ro 61-8048-induced increases in KYNA and 3-HK in plasma, and KYN and KYNA in the NAcc, are enhanced. Furthermore, animals with a fentanyl self-administration history have lower plasma concentrations of 3-HK and QUIN. Finally, the fentanyl-induced addictive behaviour phase generates an altered profile in KynP metabolites, with higher concentrations of TRP, QUIN, and PA, and lower 3-HK concentrations during reinstatement compared to extinction.

3.2. Ro 61-8048's effects in preventing drug-seeking behaviour during fentanyl-induced reinstatement are unrelated to changes in GluN2A, GluN2B, EAAT2, Akt, or Erk1/2 protein expression in the NAcc, in either their native or phosphorylated forms.

In conclusion, this study suggests that KMO inhibition by Ro 61-8048 could be an effective therapeutic strategy to reduce fentanyl consumption and drug-seeking behaviour in both healthy subjects and those suffering from neuropathic pain, while also highlighting the potential of KynP metabolites as biomarkers of opioid use disorder.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abrimian, A., Kraft, T., & Pan, Y. X. (2021). Endogenous Opioid Peptides and Alternatively Spliced Mu Opioid Receptor Seven Transmembrane Carboxyl-Terminal Variants. *International Journal of Molecular Sciences* 2021, Vol. 22, Page 3779, 22(7), 3779. <https://doi.org/10.3390/IJMS22073779>
- Adams, S., Teo, C., McDonald, K. L., Zinger, A., Bustamante, S., Lim, C. K., Sundaram, G., Braid, N., Brew, B. J., & Guillemin, G. J. (2014). Involvement of the Kynurenine Pathway in Human Glioma Pathophysiology. *PLOS ONE*, 9(11), e112945. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0112945>
- Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS). (n.d.). *CIMA: Centro de información de medicamentos*. Retrieved July 19, 2024, from <https://cima.aemps.es/cima/publico/home.html>
- Akagbosu, C. O., Evans, G. C., Gulick, D., Suckow, R. F., & Bucci, D. J. (2012). Exposure to kynurenic acid during adolescence produces memory deficits in adulthood. *Schizophrenia Bulletin*, 38(4), 769–778. <https://doi.org/10.1093/SCHBUL/SBQ151>
- Ala, M. (2021). The footprint of kynurenine pathway in every cancer: a new target for chemotherapy. *European Journal of Pharmacology*, 896, 173921. <https://doi.org/10.1016/J.EJPHAR.2021.173921>
- Ala, M., & Eftekhari, S. P. (2022). The Footprint of Kynurenine Pathway in Cardiovascular Diseases. *International Journal of Tryptophan Research: IJTR*, 15. <https://doi.org/10.1177/11786469221096643>
- Albuquerque, E. X., & Schwarcz, R. (2013). Kynurenic acid as an Antagonist of $\alpha 7$ Nicotinic Acetylcholine Receptors in the Brain: Facts and Challenges. *Biochemical Pharmacology*, 85(8), 1027. <https://doi.org/10.1016/J.BCP.2012.12.014>
- Alexander, G. M., Reichenberger, E., Peterlin, B. L., Perreault, M. J., Grothusen, J. R., & Schwartzman, R. J. (2013). Plasma Amino Acids Changes in Complex Regional Pain Syndrome. *Pain Research and Treatment*, 2013(1), 742407. <https://doi.org/10.1155/2013/742407>
- Alexander, K. S., Wu, H. Q., Schwarcz, R., & Bruno, J. P. (2012). Acute elevations of brain kynurenic acid impair cognitive flexibility: Normalization by the $\alpha 7$ positive modulator galantamine. *Psychopharmacology*, 220(3), 627–637. <https://doi.org/10.1007/S00213-011-2539-2>
- Al-Hasani, R., & Bruchas, M. R. (2011). Molecular mechanisms of opioid receptor-dependent signaling and behavior. *Anesthesiology* (Vol. 115, Issue 6, pp. 1363–1381). *Anesthesiology*. <https://doi.org/10.1097/ALN.0b013e318238bba6>
- Al-Karaghali, M. A. M., Hansen, J. M., Abou-Kassem, D., Hansted, A. K., Ubhayasekera, K., Bergquist, J., Vécsei, L., Jansen-Olesen, I., & Ashina, M. (2021). Phase 1 study to assess safety, tolerability, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of kynurenine in healthy volunteers. *Pharmacology Research & Perspectives*, 9(2), e00741. <https://doi.org/10.1002/PRP2.741>
- Amaral, M., Levy, C., Heyes, D. J., Lafite, P., Outeiro, T. F., Giorgini, F., Leys, D., & Scrutton, N. S. (2013). Structural basis of kynurenine 3-monooxygenase inhibition. *Nature*, 496(7445), 382. <https://doi.org/10.1038/NATURE12039>
- American Psychiatric Association (APA). (2024). *Manual diagnóstico y estadístico de los trastornos mentales: texto revisado. DSM-5-TR®*. <https://mieureka-medicapanamericana-com.bucm.idm.oclc.org/viewer/dsm-5-tr-manual-diagnostico-y-estadistico-de-los-trastornos-mentales/619>
- Amirdelfan, K., Pope, J. E., Gunn, J., Hill, M. M., Cotten, B. M., Beresh, J. E., Dobecki, D., Miller, N., Mehta, P., Girardi, G., & Deer, T. R. (2020). Clinical Validation of a Multi-Biomarker Assay for the Evaluation of Chronic Pain Patients in a Cross-Sectional, Observational Study. *Pain and Therapy*, 9(2), 511–529. <https://doi.org/10.1007/S40122-020-00175-3/TABLES/9>
- Antoine, D., Huhn, A. S., Strain, E. C., Turner, G., Jardot, J., Hammond, A. S., & Dunn, K. E. (2021). Method for Successfully Inducing Individuals Who Use Illicit Fentanyl Onto Buprenorphine/Naloxone. *The American Journal on Addictions*, 30(1), 83–87. <https://doi.org/10.1111/AJAD.13069>
- Armenian, P., Vo, K. T., Barr-Walker, J., & Lynch, K. L. (2018a). Fentanyl, fentanyl analogs and novel synthetic opioids: A comprehensive review. In *Neuropharmacology* (Vol. 134, pp. 121–132). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2017.10.016>
- American Society of Addiction Medicine (ASAM). (2020). *NATIONAL PRACTICE GUIDELINE For the Treatment of Opioid Use Disorder*. <https://doi.org/10.1097/ADM.0000000000000633>
- Auyeung, A., Wang, H. C., Aravagiri, K., & Knezevic, N. N. (2023). Kynurenine Pathway Metabolites as Potential Biomarkers in Chronic Pain. *Pharmaceuticals*, 16(5). <https://doi.org/10.3390/PH16050681>

- Azar, P., Westenberg, J. N., Ignaszewski, M. J., Wong, J. S. H., Isac, G., Mathew, N., & Krausz, R. M. (2022). Case report: acute care management of severe opioid withdrawal with IV fentanyl. *Addiction Science and Clinical Practice*, *17*(1), 1–6. <https://doi.org/10.1186/S13722-022-00305-6/TABLES/2>
- Baca-Atlas, M. H., & Williams, J. B. (2021). Treatment of Opioid Use Disorder Attributed to Fentanyl with High-Dose Buprenorphine: A Case Report. *Journal of Clinical Psychopharmacology*, *41*(1), 83–85. <https://doi.org/10.1097/JCP.0000000000001308>
- Badawy, A. A. B. (2000). Tryptophan metabolism in alcoholism. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, *467*, 265–274. <https://doi.org/10.1079/nrr200133>
- Badawy, A. A. B. (2013). Tryptophan: the key to boosting brain serotonin synthesis in depressive illness. *Journal of Psychopharmacology (Oxford, England)*, *27*(10), 878–893. <https://doi.org/10.1177/0269881113499209>
- Badawy, A. A. B. (2017). Tryptophan availability for kynurenine pathway metabolism across the life span: Control mechanisms and focus on aging, exercise, diet and nutritional supplements. In *Neuropharmacology* (Vol. 112, pp. 248–263). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2015.11.015>
- Badawy, A. A. B., & Bano, S. (2016). Tryptophan Metabolism in Rat Liver After Administration of Tryptophan, Kynurenine Metabolites, and Kynureninase Inhibitors. *International Journal of Tryptophan Research : IJTR*, *9*(1), 51. <https://doi.org/10.4137/IJTR.S38190>
- Badawy, A. A. B., & Evans, M. (1975). Regulation of rat liver tryptophan pyrrolase by its cofactor haem: Experiments with haematin and 5-aminolaevulinate and comparison with the substrate and hormonal mechanisms. *Biochemical Journal*, *150*(3), 511. <https://doi.org/10.1042/BJ1500511>
- Badawy, A. A.-B. (2017). Kynurenine pathway of tryptophan metabolism: Regulatory and functional aspects. *International Journal of Tryptophan Research*, *10*(1), 1178646917691938. <https://doi.org/10.1177/1178646917691938>
- Badawy, A. B. (2010). Plasma free tryptophan revisited: What you need to know and do before measuring it. In *Journal of Psychopharmacology* (Vol. 24, Issue 6, pp. 809–815). <https://doi.org/10.1177/0269881108098965>
- Bae, C., Wang, J., Shim, H. S., Tang, S. J., Chung, J. M., & La, J. H. (2018). Mitochondrial superoxide increases excitatory synaptic strength in spinal dorsal horn neurons of neuropathic mice. *Molecular Pain*, *14*. <https://doi.org/10.1177/1744806918797032>
- Bahn, A., Ljubojević, M., Lorenz, H., Schultz, C., Ghebremedhin, E., Ugele, B., Sabolić, I., Burckhardt, G., & Hagos, Y. (2005). Murine renal organic anion transporters mOAT1 and mOAT3 facilitate the transport of neuroactive tryptophan metabolites. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, *289*(5 58-5), 1075–1084. <https://doi.org/10.1152/AJPCELL.00619.2004>
- Bai, Y., Zhou, L., Wu, X., & Dong, Z. (2014). D-Serine enhances fear extinction by increasing GluA2-containing AMPA receptor endocytosis. *Behavioural Brain Research*, *270*, 223–227. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2014.05.025>
- Ballesteros, J., Rivas, D., & Duque, G. (2023). The Role of the Kynurenine Pathway in the Pathophysiology of Frailty, Sarcopenia, and Osteoporosis. *Nutrients*, *15*(14). <https://doi.org/10.3390/NU15143132>
- Baran, H., & Schwarcz, R. (1990). Presence of 3-Hydroxyanthranilic Acid in Rat Tissues and Evidence for Its Production from Anthranilic Acid in the Brain. *Journal of Neurochemistry*, *55*(3), 738–744. <https://doi.org/10.1111/J.1471-4159.1990.TB04553.X>
- Barjandi, G., Louca Jounger, S., Löfgren, M., Bileviciute-Ljungar, I., Kosek, E., & Ernberg, M. (2020). Plasma tryptophan and kynurenine in females with temporomandibular disorders and fibromyalgia—An exploratory pilot study. *Journal of Oral Rehabilitation*, *47*(2), 150–157. <https://doi.org/10.1111/JOOR.12892>
- Barnett, B. S., Morris, N. P., & Suzuki, J. (2021). Addressing in-hospital illicit substance use. *The Lancet Psychiatry*, *8*(1), 17–18. [https://doi.org/10.1016/S2215-0366\(20\)30487-9](https://doi.org/10.1016/S2215-0366(20)30487-9)
- Beaumont, V., Mrzljak, L., Dijkman, U., Freije, R., Heins, M., Rassoulpour, A., Tombaugh, G., Gelman, S., Bradaia, A., Steidl, E., Gleyzes, M., Heikkinen, T., Lehtimäki, K., Puoliväli, J., Kontkanen, O., Javier, R. M., Neagoe, I., Deisemann, H., Winkler, D., ... Munoz-Sanjuan, I. (2016). The novel KMO inhibitor CHDI-340246 leads to a restoration of electrophysiological alterations in mouse models of Huntington's disease. *Experimental Neurology*, *282*, 99–118. <https://doi.org/10.1016/J.EXPNEUROL.2016.05.005>
- Behl, T., Kaur, I., Sehgal, A., Singh, S., Bhatia, S., Al-Harrasi, A., Zengin, G., Bumbu, A. G., Andronie-Cioara, F. L., Nechifor, A. C., Gitea, D., Bungau, A. F., Toma, M. M., & Bungau, S. G. (2021). The

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- footprint of kynurenine pathway in neurodegeneration: Janus-faced role in parkinson's disorder and therapeutic implications. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 22, Issue 13). *Int J Mol Sci.* <https://doi.org/10.3390/ijms22136737>
- Belin, D., & Everitt, B. J. (2008). Cocaine seeking habits depend upon dopamine-dependent serial connectivity linking the ventral with the dorsal striatum. *Neuron*, *57*(3), 432–441. <https://doi.org/10.1016/J.NEURON.2007.12.019>
- Belin, D., Jonkman, S., Dickinson, A., Robbins, T. W., & Everitt, B. J. (2009). Parallel and interactive learning processes within the basal ganglia: Relevance for the understanding of addiction. *Behavioural Brain Research*, *199*(1), 89–102. <https://doi.org/10.1016/J.BBR.2008.09.027>
- Bell, J. (2010). The Global Diversion of Pharmaceutical Drugs. *Addiction*, *105*(9), 1531–1537. <https://doi.org/10.1111/J.1360-0443.2010.03014.X>
- Bell, J., & Strang, J. (2020). Medication Treatment of Opioid Use Disorder. *Biological Psychiatry*, *87*(1), 82–88. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2019.06.020>
- Bell, J., Trinh, L., Butler, B., Randall, D., & Rubin, G. (2009). Comparing retention in treatment and mortality in people after initial entry to methadone and buprenorphine treatment. *Addiction*, *104*(7), 1193–1200. <https://doi.org/10.1111/J.1360-0443.2009.02627.X>
- Bello, E. P., Mateo, Y., Gelman, D. M., Noain, D., Shin, J. H., Low, M. J., Alvarez, V. A., Lovinger, D. M., & Rubinstein, M. (2011). Cocaine supersensitivity and enhanced motivation for reward in mice lacking dopamine D2 autoreceptors. *Nature Neuroscience*, *14*(8), 1033–1038. <https://doi.org/10.1038/NN.2862>
- Bender, D. A. (1983). Biochemistry of tryptophan in health and disease. *Molecular Aspects of Medicine*, *6*(2), 101–197. [https://doi.org/10.1016/0098-2997\(83\)90005-5](https://doi.org/10.1016/0098-2997(83)90005-5)
- Bender, D. A., & McCreanor, G. M. (1982). The preferred route of kynurenine metabolism in the rat. *BBA - General Subjects*, *717*(1), 56–60. [https://doi.org/10.1016/0304-4165\(82\)90379-8](https://doi.org/10.1016/0304-4165(82)90379-8)
- Bender, D. A., & McCreanor, G. M. (1985). Kynurenine hydroxylase: a potential rate-limiting enzyme in tryptophan metabolism. *Biochemical Society Transactions*, *13*(2), 441–443. <https://doi.org/10.1042/BST0130441>
- Berger, M., Gray, J. A., & Roth, B. L. (2009). The Expanded Biology of Serotonin. *Annual Review of Medicine*, *60*, 355. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.MED.60.042307.110802>
- Biernacki, T., Sandi, D., Bencsik, K., & Vécsei, L. (2020). Kynurenines in the Pathogenesis of Multiple Sclerosis: Therapeutic Perspectives. *Cells*, *9*(6), 1–35. <https://doi.org/10.3390/CELLS9061564>
- Bird, H. E., Huhn, A. S., & Dunn, K. E. (2023). Fentanyl Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion (ADME): Narrative Review and Clinical Significance Related to Illicitly-Manufactured Fentanyl. *Journal of Addiction Medicine*, *17*(5), 503. <https://doi.org/10.1097/ADM.0000000000001185>
- Bizjak, D. A., Stangl, M., Börner, N., Bösch, F., Durner, J., Drunin, G., Buhl, J. L., & Abendroth, D. (2022). Kynurenine serves as useful biomarker in acute, Long- and Post-COVID-19 diagnostics. *Frontiers in Immunology*, *13*. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.1004545>
- Bonci, A., & Williams, J. T. (1997). Increased Probability of GABA Release during Withdrawal from Morphine. *Journal of Neuroscience*, *17*(2), 796–803. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.17-02-00796.1997>
- Bondulich, M. K., Fan, Y., Song, Y., Giorgini, F., & Bates, G. P. (2021). Ablation of kynurenine 3-monooxygenase rescues plasma inflammatory cytokine levels in the R6/2 mouse model of Huntington's disease. *Scientific Reports*, *11*(1), 5484. <https://doi.org/10.1038/S41598-021-84858-7>
- Bongiovanni, M., & See, R. E. (2008). A comparison of the effects of different operant training experiences and dietary restriction on the reinstatement of cocaine-seeking in rats. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, *89*(2), 227–233. <https://doi.org/10.1016/J.PBB.2007.12.019>
- Bordelon, Y. M., Chesselet, M. F., Erecińska, M., & Silver, I. A. (1998). Effects of intrastriatal injection of quinolinic acid on electrical activity and extracellular ion concentrations in rat striatum in vivo. *Neuroscience*, *83*(2), 459–469. [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(97\)00421-1](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(97)00421-1)
- Bordelon, Y. M., Chesselet, M. F., Nelson, D., Welsh, F., & Erecińska, M. (1997). Energetic Dysfunction in Quinolinic Acid-Lesioned Rat Striatum. *Journal of Neurochemistry*, *69*(4), 1629–1639. <https://doi.org/10.1046/J.1471-4159.1997.69041629.X>

- Bossert, J. M., Hoots, J. K., Fredriksson, I., Adhikary, S., Zhang, M., Venniro, M., & Shaham, Y. (2019). Role of mu, but not delta or kappa, opioid receptors in context-induced reinstatement of oxycodone seeking. *European Journal of Neuroscience*, *50*(3), 2075–2085. <https://doi.org/10.1111/ejn.13955>
- Breivik, H., Collett, B., Ventafridda, V., Cohen, R., & Gallacher, D. (2006). Survey of chronic pain in Europe: prevalence, impact on daily life, and treatment. *European Journal of Pain (London, England)*, *10*(4), 287. <https://doi.org/10.1016/J.EJPAIN.2005.06.009>
- Bryant, B. M., Eaton, E., & Li, L. (2021). A Systematic Review of Opioid Use Disorder and Related Biomarkers. In *Frontiers in Psychiatry* (Vol. 12, p. 708283). Frontiers Media SA. <https://doi.org/10.3389/fpsy.2021.708283>
- Bryant, K. G., & Barker, J. M. (2024). Positive correlation between measures of habitual responding and motivated responding in mice. *Journal of the Experimental Analysis of Behavior*, *121*(1), 74–87. <https://doi.org/10.1002/JEAB.895>
- Bryleva, E. Y., & Brundin, L. (2017). Kynurenine pathway metabolites and suicidality. *Neuropharmacology*, *112*, 324–330. <https://doi.org/10.1016/J.NEUROPHARM.2016.01.034>
- Buczek, Y., Lê, A. D., Wang, A., Stewart, J., & Shaham, Y. (1999). Stress reinstates nicotine seeking but not sucrose solution seeking in rats. *Psychopharmacology*, *144*(2), 183–188. <https://doi.org/10.1007/s002130050992>
- Butler, M. I., Long-Smith, C., Moloney, G. M., Morkl, S., O'Mahony, S. M., Cryan, J. F., Clarke, G., & Dinan, T. G. (2022). The immune-kynurenine pathway in social anxiety disorder. *Brain, Behavior, and Immunity*, *99*, 317–326. <https://doi.org/10.1016/J.BBI.2021.10.020>
- Caine, S. B., Negus, S. S., Mello, N. K., Patel, S., Bristow, L., Kulagowski, J., Vallone, D., Saiardi, A., & Borrelli, E. (2002). Role of dopamine D2-like receptors in cocaine self-administration: studies with D2 receptor mutant mice and novel D2 receptor antagonists. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *22*(7), 2977–2988. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.22-07-02977.2002>
- Carpenido, R., Pittaluga, A., Cozzi, A., Attucci, S., Galli, A., Raiteri, M., & Moroni, F. (2001). Presynaptic kynurenate-sensitive receptors inhibit glutamate release. *The European Journal of Neuroscience*, *13*(11), 2141–2147. <https://doi.org/10.1046/J.0953-816X.2001.01592.X>
- Cavaleri, D., Crocamo, C., Morello, P., Bartoli, F., & Carrà, G. (2024). The Kynurenine Pathway in Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder: A Systematic Review and Meta-Analysis of Blood Concentrations of Tryptophan and Its Catabolites. *Journal of Clinical Medicine*, *13*(2), 583. <https://doi.org/10.3390/JCM13020583/S1>
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). (2022). *Understanding the Opioid Overdose Epidemic | Opioids | CDC*. U.S. Department of Health and Human Services. <https://www.cdc.gov/opioids/basics/epidemic.html>
- Charbogne, P., Gardon, O., Martín-García, E., Keyworth, H. L., Matsui, A., Mechling, A. E., Bienert, T., Nasseef, T., Robé, A., Moquin, L., Darcq, E., Ben Hamida, S., Robledo, P., Matifas, A., Befort, K., Gavériaux-Ruff, C., Harsan, L. A., von Elverfeldt, D., Hennig, J., ... Kieffer, B. L. (2017). Mu Opioid Receptors in Gamma-Aminobutyric Acidergic Forebrain Neurons Moderate Motivation for Heroin and Palatable Food. *Biological Psychiatry*, *81*(9), 778–788. <https://doi.org/10.1016/J.BIOPSYCH.2016.12.022>
- Chen, Y., Brew, B. J., & Guillemin, G. J. (2011). Characterization of the kynurenine pathway in NSC-34 cell line: implications for amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of Neurochemistry*, *118*(5), 816–825. <https://doi.org/10.1111/J.1471-4159.2010.07159.X>
- Chen, Y., Jiang, Y., Yue, W., Zhou, Y., Lu, L., & Ma, L. (2008). Chronic, but not acute morphine treatment, up-regulates α -Ca²⁺/calmodulin dependent protein kinase II gene expression in rat brain. *Neurochemical Research*, *33*(10), 2092–2098. <https://doi.org/10.1007/S11064-008-9690-0>
- Chess, A. C., Landers, A. M., & Bucci, D. J. (2009). L-kynurenine treatment alters contextual fear conditioning and context discrimination but not cue-specific fear conditioning. *Behavioural Brain Research*, *201*(2), 325–331. <https://doi.org/10.1016/J.BBR.2009.03.013>
- Chess, A. C., Simoni, M. K., Alling, T. E., & Bucci, D. J. (2007). Elevations of endogenous kynurenic acid produce spatial working memory deficits. *Schizophrenia Bulletin*, *33*(3), 797–804. <https://doi.org/10.1093/SCHBUL/SBL033>
- Chiarugi, A., Carpenedo, R., Molina, M. T., Mattoli, L., Pellicciari, R., & Moroni, F. (1995). Comparison of the Neurochemical and Behavioral Effects Resulting from the Inhibition of Kynurenine

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Hydroxylase and/or Kynureninase. *Journal of Neurochemistry*, 65(3), 1176–1183. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1995.65031176.x>
- Chiarugi, A., Meli, E., & Moroni, F. (2001). Similarities and differences in the neuronal death processes activated by 3OH-kynurenine and quinolinic acid. *Journal of Neurochemistry*, 77(5), 1310–1318. <https://doi.org/10.1046/J.1471-4159.2001.00335.X>
- Chirico, M., Custer, J., Shoyombo, I., Cooper, C., Meldrum, S., Dantzer, R., Trivedi, M. H., Rathouz, P., & Toups, M. S. (2020). Kynurenine pathway metabolites selectively associate with impaired associative memory function in depression. *Brain, Behavior, & Immunity - Health*, 8. <https://doi.org/10.1016/J.BBIH.2020.100126>
- Chou, R., Hartung, D., Turner, J., Blazina, I., Chan, B., Levander, X., McDonagh, M., Selph, S., Fu, R., & Pappas, M. (2020). Opioid Treatments for Chronic Pain. *AHRQ Publication No. 20-EHC011*, 229. <https://doi.org/https://doi.org/10.23970/AHRQEPCCER229>
- Chow, J. J., Pitts, K. M., Chabot, J. M., Ito, R., & Shaham, Y. (2024). A rat model of operant negative reinforcement in opioid-dependent males and females. *Psychopharmacology*, 241(9), 1791–1813. <https://doi.org/10.1007/S00213-024-06594-W>
- Christen, S., Peterhans, E., & Stocker, R. (1990). Antioxidant activities of some tryptophan metabolites: possible implication for inflammatory diseases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87(7), 2506–2510. <https://doi.org/10.1073/PNAS.87.7.2506>
- Ciapała, K., Mika, J., & Rojewska, E. (2021). The kynurenine pathway as a potential target for neuropathic pain therapy design: From basic research to clinical perspectives. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 22, Issue 20). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/ijms222011055>
- Ciapała, K., Pawlik, K., Ciechanowska, A., Mika, J., & Rojewska, E. (2023). Effect of pharmacological modulation of the kynurenine pathway on pain-related behavior and opioid analgesia in a mouse model of neuropathic pain. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 461. <https://doi.org/10.1016/J.TAAP.2023.116382>
- Ciccarone, D. (2019). The triple wave epidemic: Supply and demand drivers of the US opioid overdose crisis. *The International Journal on Drug Policy*, 71, 183–188. <https://doi.org/10.1016/J.DRUGPO.2019.01.010>
- Ciccarone, D. (2021). The rise of illicit fentanyl, stimulants and the fourth wave of the opioid overdose crisis. *Current Opinion in Psychiatry*, 34(4), 344–350. <https://doi.org/10.1097/YCO.0000000000000717>
- Ciccarone, D., Holm, N., Ondocsin, J., Schlosser, A., Fessel, J., Cowan, A., & Mars, S. G. (2024). Innovation and adaptation: The rise of a fentanyl smoking culture in San Francisco. *PloS One*, 19(5). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0303403>
- CIMA: FICHA TÉCNICA FENTICERTA 200 MICROGRAMOS COMPRIMIDOS SUBLINGUALES EFG. (n.d.). Retrieved August 5, 2024, from https://cima.aemps.es/cima/dochtml/ft/84209/FT_84209.html#4.8
- Colín-González, A. L., Maldonado, P. D., & Santamaría, A. (2013). 3-Hydroxykynurenine: An intriguing molecule exerting dual actions in the Central Nervous System. *NeuroToxicology*, 34(1), 189–204. <https://doi.org/10.1016/J.NEURO.2012.11.007>
- Coluzzi, F., Scerpa, M. S., Rocco, M., & Fornasari, D. (2022). The Impact of P-Glycoprotein on Opioid Analgesics: What's the Real Meaning in Pain Management and Palliative Care? *International Journal of Molecular Sciences*, 23(22). <https://doi.org/10.3390/IJMS232214125>
- Comer, S. D., & Cahill, C. M. (2019). Fentanyl: Receptor pharmacology, abuse potential, and implications for treatment. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 106, 49–57. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2018.12.005>
- Comer, S. D., & Sullivan, M. A. (2007). Memantine produces modest reductions in heroin-induced subjective responses in human research volunteers. *Psychopharmacology*, 193(2), 235–245. <https://doi.org/10.1007/S00213-007-0775-2>
- Connor, T. J., Starr, N., O'Sullivan, J. B., & Harkin, A. (2008). Induction of indolamine 2,3-dioxygenase and kynurenine 3-monooxygenase in rat brain following a systemic inflammatory challenge: a role for IFN-gamma? *Neuroscience Letters*, 441(1), 29–34. <https://doi.org/10.1016/J.NEULET.2008.06.007>

- Cooper, T. E., Chen, J., Wiffen, P. J., Derry, S., Carr, D. B., Aldington, D., Cole, P., & Moore, R. A. (2017). Morphine for chronic neuropathic pain in adults. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*, 5(5). <https://doi.org/10.1002/14651858.CD011669.PUB2>
- Correia, A. S., & Vale, N. (2022). Tryptophan Metabolism in Depression: A Narrative Review with a Focus on Serotonin and Kynurenine Pathways. *International Journal of Molecular Sciences* 2022, Vol. 23, Page 8493, 23(15), 8493. <https://doi.org/10.3390/IJMS23158493>
- Cruz, V. P. D. La, Elinos-Calderón, D., Carrillo-Mora, P., Silva-Adaya, D., Konigsberg, M., Morán, J., Ali, S. F., Cháñez-Cárdenas, M. E., Pérez-De La Cruz, G., & Santamaría, A. (2010). Time-course correlation of early toxic events in three models of striatal damage: Modulation by proteases inhibition. *Neurochemistry International*, 56(6–7), 834–842. <https://doi.org/10.1016/J.NEUINT.2010.03.008>
- Cuartero, M. I., Parra, J. de la, García-Culebras, A., Ballesteros, I., Lizasoain, I., & Moro, M. Á. (2016). The Kynurenine Pathway in the Acute and Chronic Phases of Cerebral Ischemia. *Current Pharmaceutical Design*, 22(8), 1060. <https://doi.org/10.2174/1381612822666151214125950>
- Cui, Y., Ostlund, S. B., James, A. S., Park, C. S., Ge, W., Roberts, K. W., Mittal, N., Murphy, N. P., Cepeda, C., Kieffer, B. L., Levine, M. S., Jentsch, J. D., Walwyn, W. M., Sun, Y. E., Evans, C. J., Maidment, N. T., & William Yang, X. (2014). Targeted expression of μ -opioid receptors in a subset of striatal direct-pathway neurons restores opiate reward. *Nature Neuroscience*, 17(2), 254–261. <https://doi.org/10.1038/NN.3622>
- Curtis, K., Viswanath, H., Velasquez, K. M., Molfese, D. L., Harding, M. J., Aramayo, E., Baldwin, P. R., Ambrosi, E., Madan, A., Patriquin, M., Frueh, B. C., Fowler, J. C., Kosten, T. R., Nielsen, D. A., & Salas, R. (2017). Increased habenular connectivity in opioid users is associated with an $\alpha 5$ subunit nicotinic receptor genetic variant. *The American Journal on Addictions*, 26(7), 751–759. <https://doi.org/10.1111/AJAD.12607>
- Dang, H., Castro-Portuguez, R., Espejo, L., Backer, G., Freitas, S., Spence, E., Meyers, J., Shuck, K., Gardea, E. A., Chang, L. M., Balsa, J., Thorns, N., Corban, C., Liu, T., Bean, S., Sheehan, S., Korstanje, R., & Sutphin, G. L. (2023). On the benefits of the tryptophan metabolite 3-hydroxyanthranilic acid in *Caenorhabditis elegans* and mouse aging. *Nature Communications* 2023 14:1, 14(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-43527-1>
- Darcq, E., & Kieffer, B. L. (2018). Opioid receptors: Drivers to addiction? *Nature Reviews Neuroscience* (Vol. 19, Issue 8, pp. 499–514). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/s41583-018-0028-x>
- Darlington, L. G., Forrest, C. M., Mackay, G. M., Smith, R. A., Smith, A. J., Stoy, N., & Stone, T. W. (2010). On the biological importance of the 3-hydroxyanthranilic acid: Anthranilic acid ratio. *International Journal of Tryptophan Research*, 3(1), 51–59. <https://doi.org/10.4137/ijtr.s4282>
- de Bruin-Hoegée, M., Kleiweg, D., Noort, D., & van Asten, A. C. (2021). Chemical attribution of fentanyl: The effect of human metabolism. *Forensic Chemistry*, 24, 100330. <https://doi.org/10.1016/J.FORC.2021.100330>
- De Neve, J., Barlow, T. M. A., Tourwé, D., Bihel, F., Simonin, F., & Ballet, S. (2021). Comprehensive overview of biased pharmacology at the opioid receptors: biased ligands and bias factors. *RSC Medicinal Chemistry*, 12(6), 828. <https://doi.org/10.1039/D1MD00041A>
- Drug Enforcement Administration (DEA). (2016). *DEA Intelligence BRIEF Counterfeit Prescription Pills Containing Fentanyl: A Global Threat*. <https://www.dea.gov/sites/default/files/docs/Counterfeit%2520Prescription%2520Pills.pdf>
- DEA. (2019). *Fentanyl Signature Profiling Program Report, October 2019*. https://www.dea.gov/sites/default/files/2019-10/DEA_Fentanyl_Signature_Profiling_Program_Report-Oct-2019.pdf
- Decosterd, I., & Woolf, C. J. (2000). Spared nerve injury as a long-lasting model of neuropathic pain. *Pain*, 87, 149–158. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7571-6_28
- Degenhardt, L., Larney, S., Kimber, J., Farrell, M., & Hall, W. (2015). Excess mortality among opioid-using patients treated with oral naltrexone in Australia. *Drug and Alcohol Review*, 34(1), 90–96. <https://doi.org/10.1111/DAR.12205>
- Delfs, J. M., Zhu, Y., Druhan, J. P., & Aston-Jones, G. (2000). Noradrenaline in the ventral forebrain is critical for opiate withdrawal-induced aversion. *Nature* 2000 403:6768, 403(6768), 430–434. <https://doi.org/10.1038/35000212>

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Derry, S., Stannard, C., Cole, P., Wiffen, P. J., Knaggs, R., Aldington, D., & Moore, R. A. (2016). Fentanyl for neuropathic pain in adults. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*, 2016(10). <https://doi.org/10.1002/14651858.CD011605.PUB2>
- Deuis, J. R., Dvorakova, L. S., & Vetter, I. (2017). Methods Used to Evaluate Pain Behaviors in Rodents. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 10, 284. <https://doi.org/10.3389/FNMOL.2017.00284>
- Dhanda, A., & Salsitz, E. A. (2021). The duration dilemma in opioid agonist therapy. *Journal of Opioid Management*, 17(4), 353–358. <https://doi.org/10.5055/JOM.2021.0668>
- Diana, M. (2011). The dopamine hypothesis of drug addiction and its potential therapeutic value. *Frontiers in Psychiatry*, 2(NOV), 16093. <https://doi.org/10.3389/FPSYT.2011.00064>
- Dickinson, A. (1985). Actions and habits: the development of behavioural autonomy. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B, Biological Sciences*, 308(1135), 67–78. <https://doi.org/10.1098/rstb.1985.0010>
- Dietrich, C. (2016). Antioxidant Functions of the Aryl Hydrocarbon Receptor. *Stem Cells International*, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/7943495>
- DiNatale, B. C., Murray, I. A., Schroeder, J. C., Flaveny, C. A., Lahoti, T. S., Laurenzana, E. M., Omiecinski, C. J., & Perdew, G. H. (2010). Kynurenic acid is a potent endogenous aryl hydrocarbon receptor ligand that synergistically induces interleukin-6 in the presence of inflammatory signaling. *Toxicological Sciences: An Official Journal of the Society of Toxicology*, 115(1), 89–97. <https://doi.org/10.1093/TOXSCI/KFQ024>
- D’Onofrio, G., O’Connor, P. G., Pantaloni, M. V., Chawarski, M. C., Busch, S. H., Owens, P. H., Bernstein, S. L., & Fiellin, D. A. (2015). Emergency Department–Initiated Buprenorphine/Naloxone Treatment for Opioid Dependence: A Randomized Clinical Trial. *JAMA*, 313(16), 1636–1644. <https://doi.org/10.1001/JAMA.2015.3474>
- Douton, J. E., Acharya, N. K., Stoltzfus, B., Sun, D., Grigson, P. S., & Nyland, J. E. (2022). Acute Glucagon-Like Peptide-1 Receptor Agonist Liraglutide Prevents Cue-, Stress- and Drug-Induced Heroin Seeking in Rats. *Behavioural Pharmacology*, 33(5), 364. <https://doi.org/10.1097/FBP.0000000000000685>
- Dowell, D., Brown, S., Gyawali, S., Hoenig, J., Ko, J., Mikosz, C., Ussery, E., Baldwin, G., Jones, C. M., Olsen, Y., Tomoyasu, N., Han, B., Compton, W. M., & Volkow, N. D. (2024). Treatment for Opioid Use Disorder: Population Estimates — United States, 2022. *MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report*, 73(25), 567–574. <https://doi.org/10.15585/mmwr.mm7325a1>
- Dowell, D., Haegerich, T. M., & Chou, R. (2016). CDC Guideline for Prescribing Opioids for Chronic Pain—United States, 2016. *JAMA*, 315(15), 1624–1645. <https://doi.org/10.1001/JAMA.2016.1464>
- Dowell, D., Ragan, K. R., Jones, C. M., Baldwin, G. T., & Chou, R. (2023). CDC Clinical Practice Guideline for Prescribing Opioids for Pain — United States, 2022. *MMWR. Recommendations and Reports*, 71(3), 1–95. <https://doi.org/10.15585/MMWR.RR7103A1>
- Dupuis, J. P., Nicole, O., & Groc, L. (2023). NMDA receptor functions in health and disease: Old actor, new dimensions. *Neuron*, 111(15), 2312–2328. <https://doi.org/10.1016/J.NEURON.2023.05.002>
- Duraku, L. S., Hossaini, M., Hoendervangers, S., Falke, L. L., Kambiz, S., Mudera, V. C., Holstege, J. C., Walbeehm, E. T., & Ruigrok, T. J. H. (2012). Spatiotemporal dynamics of re-innervation and hyperinnervation patterns by uninjured CGRP fibers in the rat foot sole epidermis after nerve injury. *Molecular Pain*, 8. <https://doi.org/10.1186/1744-8069-8-61>
- Edinburgh Innovations. (2024, April 22). *Positive trial results for Kynos Therapeutics’ inflammation drug candidate*. <https://edinburgh-innovations.ed.ac.uk/news/positive-trial-results-for-kynos-therapeutics-inflammation-drug-candidate>
- Egea, J., Buendia, I., Parada, E., Navarro, E., León, R., & Lopez, M. G. (2015). Anti-inflammatory role of microglial alpha7 nAChRs and its role in neuroprotection. *Biochemical Pharmacology*, 97(4), 463–472. <https://doi.org/10.1016/J.BCP.2015.07.032>
- Eidson, L. N., Inoue, K., Young, L. J., Tansey, M. G., & Murphy, A. Z. (2016). Toll-like Receptor 4 Mediates Morphine-Induced Neuroinflammation and Tolerance via Soluble Tumor Necrosis Factor Signaling. *Neuropsychopharmacology* 2017 42:3, 42(3), 661–670. <https://doi.org/10.1038/npp.2016.131>
- Eidson, L. N., & Murphy, A. Z. (2013). Blockade of Toll-Like Receptor 4 Attenuates Morphine Tolerance and Facilitates the Pain Relieving Properties of Morphine. *The Journal of Neuroscience*, 33(40), 15952. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1609-13.2013>
- Elkiweri, I. A., Zhang, Y. L., Christians, U., Ng, K. Y., Van Patot, M. C. T., & Henthorn, T. K. (2009). Competitive Substrates for P-Glycoprotein and Organic Anion Protein Transporters Differentially

- Reduce Blood Organ Transport of Fentanyl and Loperamide: Pharmacokinetics and Pharmacodynamics in Sprague Dawley Rats. *Anesthesia and Analgesia*, 108(1), 149. <https://doi.org/10.1213/ANE.0B013E31818E0BD1>
- European Medicines Agency (EMA). (2023). *First Union Critical Medicines list*. https://ec.europa.eu/commission/presscorner/detail/en/ip_23_6377
- Engeln, M., Fox, M. E., & Lobo, M. K. (2021). Housing conditions during self-administration determine motivation for cocaine in mice following chronic social defeat stress. *Psychopharmacology*, 238(1), 41–54. <https://doi.org/10.1007/s00213-020-05657-y>
- Englander, H., Thakrar, A. P., Bagley, S. M., Rolley, T., Dong, K., & Hyshka, E. (2024). Caring for Hospitalized Adults With Opioid Use Disorder in the Era of Fentanyl: A Review. *JAMA Internal Medicine*, 184(6), 691–701. <https://doi.org/10.1001/JAMAINTERNMED.2023.7282>
- Erhardt, S., Blennow, K., Nordin, C., Skogh, E., Lindström, L. H., & Engberg, G. (2001). Kynurenic acid levels are elevated in the cerebrospinal fluid of patients with schizophrenia. *Neuroscience Letters*, 313(1–2), 96–98. [https://doi.org/10.1016/S0304-3940\(01\)02242-X](https://doi.org/10.1016/S0304-3940(01)02242-X)
- Erhardt, S., Schwieler, L., Emanuelsson, C., & Geyer, M. (2004). Endogenous kynurenic acid disrupts prepulse inhibition. *Biological Psychiatry*, 56(4), 255–260. <https://doi.org/10.1016/J.BIOPSYCH.2004.06.006>
- Erhardt, S., Schwieler, L., Imbeault, S., & Engberg, G. (2017). The kynurenine pathway in schizophrenia and bipolar disorder. *Neuropharmacology*, 112, 297–306. <https://doi.org/10.1016/J.NEUROPHARM.2016.05.020>
- Erhardt, S., Schwieler, L., Nilsson, L., Linderholm, K., & Engberg, G. (2007). The kynurenic acid hypothesis of schizophrenia. *Physiology & Behavior*, 92(1–2), 203–209. <https://doi.org/10.1016/J.PHYSBEH.2007.05.025>
- Eriksson, T., & Carlsson, A. (1988). β -adrenergic control of brain uptake of large neutral amino acids. *Life Sciences*, 42(17), 1583–1589. [https://doi.org/10.1016/0024-3205\(88\)90436-5](https://doi.org/10.1016/0024-3205(88)90436-5)
- Eriksson, T., Carlsson, A., Hagman, M., & Jagenburg, R. (1981). Effects of pentobarbital and diazepam on rat plasma amino acid patterns. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 317(2), 165–167. <https://doi.org/10.1007/BF00500074>
- Ettenberg, A., Pettit, H. O., Bloom, F. E., & Koob, G. F. (1982). Heroin and cocaine intravenous self-administration in rats: mediation by separate neural systems. *Psychopharmacology*, 78(3), 204–209. <https://doi.org/10.1007/BF00428151>
- European Union Drugs Agency (EUDA). (2024a). *Drug-induced deaths – the current situation in Europe (European Drug Report 2024)* | www.euda.europa.eu. https://www.euda.europa.eu/publications/european-drug-report/2024/drug-induced-deaths_en
- European Drugs Agency (EUDA). (2024b). *Heroin and other opioids-the current situation in Europe (European Drug Report 2024)*.
- Everitt, B. J., & Robbins, T. W. (2016). Drug addiction: Updating actions to habits to compulsions ten years on. *Annual Review of Psychology*, 67(Volume 67, 2016), 23–50. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-PSYCH-122414-033457>
- Everitt, B. J., & Wolf, M. E. (2002). Psychomotor Stimulant Addiction: A Neural Systems Perspective. *Journal of Neuroscience*, 22(9), 3312–3320. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.22-09-03312.2002>
- Ezeomah, C., Cunningham, K. A., Stutz, S. J., Fox, R. G., Bukreyeva, N., Dineley, K. T., Paessler, S., & Cisneros, I. E. (2020). Fentanyl self-administration impacts brain immune responses in male Sprague-Dawley rats. *Brain, Behavior, and Immunity*, 87, 725–738. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2020.03.003>
- Falcon, E., Browne, C. A., Leon, R. M., Fleites, V. C., Sweeney, R., Kirby, L. G., & Lucki, I. (2016). Antidepressant-like Effects of Buprenorphine are Mediated by Kappa Opioid Receptors. *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 41(9), 2344–2351. <https://doi.org/10.1038/NPP.2016.38>
- Fazio, F., Lionetto, L., Curto, M., Iacovelli, L., Cavallari, M., Zappulla, C., Ulivieri, M., Napoletano, F., Capi, M., Corigliano, V., Scaccianoce, S., Caruso, A., Miele, J., De Fusco, A., Di Menna, L., Comparelli, A., De Carolis, A., Gradini, R., Nisticò, R., ... Simmaco, M. (2015). Xanthurenic Acid Activates mGlu2/3 Metabotropic Glutamate Receptors and is a Potential Trait Marker for Schizophrenia. *Scientific Reports 2015 5:1*, 5(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/srep17799>
- Fazio, F., Lionetto, L., Curto, M., Iacovelli, L., Copeland, C. S., Neale, S. A., Bruno, V., Battaglia, G., Salt, T. E., & Nicoletti, F. (2017). Cinnabarinic acid and xanthurenic acid: Two kynurenine metabolites

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- that interact with metabotropic glutamate receptors. *Neuropharmacology*, *112*, 365–372. <https://doi.org/10.1016/J.NEUROPHARM.2016.06.020>
- Fazio, F., Lionetto, L., Molinaro, G., Bertrand, H. O., Acher, F., Ngomba, R. T., Notartomaso, S., Curini, M., Rosati, O., Scarselli, P., Di Marco, R., Battaglia, G., Bruno, V., Simmaco, M., Pin, J. P., Nicoletti, F., & Goudet, C. (2012). Cinnabarinic Acid, an Endogenous Metabolite of the Kynurenine Pathway, Activates Type 4 Metabotropic Glutamate Receptors. *Molecular Pharmacology*, *81*(5), 643–656. <https://doi.org/10.1124/MOL.111.074765>
- Feng, B., Xing, J. hao, Jia, D., Liu, S. bing, Guo, H. ju, Li, X. qiang, He, X. sheng, & Zhao, M. gao. (2011). Blocking $\alpha 4\beta 2$ and $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors inhibits the reinstatement of morphine-induced CPP by drug priming in mice. *Behavioural Brain Research*, *220*(1), 100–105. <https://doi.org/10.1016/J.BBR.2011.01.040>
- Fernandes, B. S., Inam, M. E., Enduru, N., Quevedo, J., & Zhao, Z. (2023). The kynurenine pathway in Alzheimer's disease: a meta-analysis of central and peripheral levels. *Brazilian Journal of Psychiatry*, *45*(3), 286. <https://doi.org/10.47626/1516-4446-2022-2962>
- Ferrier, J., Marchand, F., & Balaýssac, D. (2016). Assessment of Mechanical Allodynia in Rats Using the Electronic Von Frey Test. *BIO-PROTOCOL*, *6*(18). <https://doi.org/10.21769/BIOPROTOC.1933>
- Fields, H. L., & Margolis, E. B. (2015). Understanding opioid reward. *Trends in Neurosciences*, *38*(4), 217–225. <https://doi.org/10.1016/J.TINS.2015.01.002>
- Finnerup, N. B., Attal, N., Haroutounian, S., McNicol, E., Baron, R., Dworkin, R. H., Gilron, I., Haanpää, M., Hansson, P., Jensen, T. S., Kamerman, P. R., Lund, K., Moore, A., Raja, S. N., Rice, A. S. C., Rowbotham, M., Sena, E., Siddall, P., Smith, B. H., & Wallace, M. (2015). Pharmacotherapy for neuropathic pain in adults: A systematic review and meta-analysis. *The Lancet Neurology*, *14*(2), 162–173. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(14\)70251-0](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(14)70251-0)
- Finnerup, N. B., Kuner, R., & Jensen, T. S. (2021). Neuropathic pain: From mechanisms to treatment. *Physiological Reviews*, *101*(1), 259–301. <https://doi.org/10.1152/PHYSREV.00045.2019>
- Forouhar, F., Anderson, J. L. R., Mowat, C. G., Vorobiev, S. M., Hussain, A., Abashidze, M., Bruckmann, C., Thackray, S. J., Seetharaman, J., Tucker, T., Xiao, R., Ma, L. C., Zhao, L., Acton, T. B., Montelione, G. T., Chapman, S. K., & Tong, L. (2007). Molecular insights into substrate recognition and catalysis by tryptophan 2,3-dioxygenase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *104*(2), 473–478. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0610007104>
- Foster, A. C., Okuno, E., Brougher, D. S., & Schwarcz, R. (1986). A radioenzymatic assay for quinolinic acid. *Analytical Biochemistry*, *158*(1), 98–103. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(86\)90595-6](https://doi.org/10.1016/0003-2697(86)90595-6)
- Freitas, K., Negus, S., Carroll, F. I., & Damaj, M. I. (2013). In vivo pharmacological interactions between a type II positive allosteric modulator of $\alpha 7$ nicotinic ACh receptors and nicotinic agonists in a murine tonic pain model. *British Journal of Pharmacology*, *169*(3), 567–579. <https://doi.org/10.1111/J.1476-5381.2012.02226.X>
- Fujigaki, H., Yamamoto, Y., & Saito, K. (2017). L-Tryptophan-kynurenine pathway enzymes are therapeutic target for neuropsychiatric diseases: Focus on cell type differences. *Neuropharmacology*, *112*(Pt B), 264–274. <https://doi.org/10.1016/J.NEUROPHARM.2016.01.011>
- Fujio, M., Nakagawa, T., Sekiya, Y., Ozawa, T., Suzuki, Y., Minami, M., Satoh, M., & Kaneko, S. (2005). Gene transfer of GLT-1, a glutamate transporter, into the nucleus accumbens shell attenuates methamphetamine- and morphine-induced conditioned place preference in rats. *European Journal of Neuroscience*, *22*(11), 2744–2754. <https://doi.org/10.1111/J.1460-9568.2005.04467.X>
- Fukui, S., Schwarcz, R., Rapoport, S. I., Takada, Y., & Smith, Q. R. (1991). Blood–Brain Barrier Transport of Kynurenines: Implications for Brain Synthesis and Metabolism. *Journal of Neurochemistry*, *56*(6), 2007–2017. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1991.tb03460.x>
- Fukunaga, Y., Inoue, N., Miyamoto, M., Kishioka, S., & Yamamoto, H. (1998). Effects of peptidase inhibitors, [D-Ala², Met⁵]-enkephalinamide and antiserum to methionine-enkephalin microinjected into the caudal periaqueductal gray on morphine withdrawal in rats. *Japanese Journal of Pharmacology*, *78*(4), 455–461. <https://doi.org/10.1254/JJP.78.455>
- Gabrielli, T. A. E., As, T., & Gabrielli, A. E. (2023). Incapacitating agents review: 20 years after Nord Ost Siege. *Critical Reviews in Toxicology*, *53*(8), 481–490. <https://doi.org/10.1080/10408444.2023.2270567>
- Gaelings, L., Söderholm, S., Bugai, A., Fu, Y., Nandania, J., Schepens, B., Lorey, M. B., Tynell, J., Vande Ginste, L., Le Goffic, R., Miller, M. S., Kuisma, M., Marjomäki, V., De Brabander, J., Matikainen, S., Nyman, T. A., Bamford, D. H., Saelens, X., Julkunen, I., ... Kainov, D. E. (2017). Regulation of

- kynurenine biosynthesis during influenza virus infection. *The FEBS Journal*, 284(2), 222–236. <https://doi.org/10.1111/FEBS.13966>
- Gál, E. M., & Sherman, A. D. (1980). L-kynurenine: its synthesis and possible regulatory function in brain. *Neurochemical Research*, 5(3), 223–239. <https://doi.org/10.1007/BF00964611>
- Garcia, K. L. P., Lê, A. D., & Tyndale, R. F. (2014). Effect of food training and training dose on nicotine self-administration in rats. *Behavioural Brain Research*, 274, 10–18. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2014.07.043>
- Gawel, K. (2024). A Review on the Role and Function of Cinnabarinic Acid, a “Forgotten” Metabolite of the Kynurenine Pathway. *Cells* 2024, Vol. 13, Page 453, 13(5), 453. <https://doi.org/10.3390/CELLS13050453>
- Geisler, S., & Wise, R. A. (2008). Functional implications of glutamatergic projections to the ventral tegmental area. *Reviews in the Neurosciences*, 19(4–5), 227. <https://doi.org/10.1515/REVNEURO.2008.19.4-5.227>
- Gerak, L. R., Maguire, D. R., Woods, J. H., Husbands, S. M., Disney, A., & France, C. P. (2019). Reversal and Prevention of the Respiratory-Depressant Effects of Heroin by the Novel μ -Opioid Receptor Antagonist Methocinnamox in Rhesus Monkeys. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 368(2), 229–236. <https://doi.org/10.1124/JPET.118.253286>
- Gershon, M. D., & Tack, J. (2007). The Serotonin Signaling System: From Basic Understanding To Drug Development for Functional GI Disorders. *Gastroenterology*, 132(1), 397–414. <https://doi.org/10.1053/J.GASTRO.2006.11.002>
- Ghanbari, R., Li, Y., Pathmasiri, W., McRitchie, S., Etemadi, A., Pollock, J. D., Poustchi, H., Rahimi-Movaghar, A., Amin-Esmacili, M., Roshandel, G., Shayanrad, A., Abaei, B., Malekzadeh, R., & Sumner, S. C. J. (2021). Metabolomics reveals biomarkers of opioid use disorder. *Translational Psychiatry* 2021 11:1, 11(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41398-021-01228-7>
- Gil de Biedma-Elduayen, L., Giménez-Gómez, P., Morales-Puerto, N., Vidal, R., Núñez-de la Calle, C., Gutiérrez-López, M. D., O’Shea, E., & Colado, M. I. (2022a). Influx of kynurenine into the brain is involved in the reduction of ethanol consumption induced by Ro 61-8048 after chronic intermittent ethanol in mice. *British Journal of Pharmacology*, 179(14), 3711–3726. <https://doi.org/10.1111/bph.15825>
- Giménez-Gómez, P., Pérez-Hernández, M., Gutiérrez-López, M. D., Vidal, R., Abuin-Martínez, C., O’Shea, E., & Colado, M. I. (2018). Increasing kynurenine brain levels reduces ethanol consumption in mice by inhibiting dopamine release in nucleus accumbens. *Neuropharmacology*, 135, 581–591. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2018.04.016>
- Giménez-Gómez, P., Pérez-Hernández, M., O’Shea, E., Caso, J. R., Martín-Hernandez, D., Cervera, L. A., Centelles, M. L. G.-L., Gutiérrez-Lopez, M. D., & Colado, M. I. (2019). Changes in brain kynurenine levels via gut microbiota and gut-barrier disruption induced by chronic ethanol exposure in mice. *The FASEB Journal*, fj.201900491RR. <https://doi.org/10.1096/fj.201900491rr>
- Giorgini, F., Huang, S. Y., Sathyaikumar, K. V., Notarangelo, F. M., Thomas, M. A. R., Tararina, M., Wu, H. Q., Schwarcz, R., & Muchowski, P. J. (2013). Targeted Deletion of Kynurenine 3-Monooxygenase in Mice: A NEW TOOL FOR STUDYING KYNURENINE PATHWAY METABOLISM IN PERIPHERY AND BRAIN. *Journal of Biological Chemistry*, 288(51), 36554–36566. <https://doi.org/10.1074/JBC.M113.503813>
- Gobaille, S., Kemmel, V., Brumar, D., Dugave, C., Aunis, D., & Maitre, M. (2008). Xanthurenic acid distribution, transport, accumulation and release in the rat brain. *Journal of Neurochemistry*, 105(3), 982–993. <https://doi.org/10.1111/J.1471-4159.2008.05219.X>
- Goda, K., Kishimoto, R., Shimizu, S., Hamane, Y., & Ueda, M. (1996). Quinolinic Acid and Active Oxygens: Possible Contribution of Active Oxygens during Cell Death in the Brain. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 398, 247–254. https://doi.org/10.1007/978-1-4613-0381-7_38
- Goldstein, L. E., Leopold, M. C., Huang, X., Atwood, C. S., Saunders, A. J., Hartshorn, M., Lim, J. T., Faget, K. Y., Muffat, J. A., Scarpa, R. C., Chylack, L. T., Bowden, E. F., Tanzi, R. E., & Bush, A. I. (2000). 3-hydroxykynurenine and 3-hydroxyanthranilic acid generate hydrogen peroxide and promote α -crystallin cross-linking by metal ion reduction. *Biochemistry*, 39(24), 7266–7275. <https://doi.org/10.1021/bi992997s>
- González Esquivel, D., Ramírez-Ortega, D., Pineda, B., Castro, N., Ríos, C., & Pérez de la Cruz, V. (2017). Kynurenine pathway metabolites and enzymes involved in redox reactions. In *Neuropharmacology* (Vol. 112, pp. 331–345). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2016.03.013>

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Gotti, C., & Clementi, F. (2004). Neuronal nicotinic receptors: from structure to pathology. *Progress in Neurobiology*, 74(6), 363–396. <https://doi.org/10.1016/J.PNEUROBIO.2004.09.006>
- Gotti, C., Zoli, M., & Clementi, F. (2006). Brain nicotinic acetylcholine receptors: native subtypes and their relevance. *Trends in Pharmacological Sciences*, 27(9), 482–491. <https://doi.org/10.1016/J.TIPS.2006.07.004>
- Gowing, L., Ali, R., & White, J. M. (2009). Opioid antagonists with minimal sedation for opioid withdrawal. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 4. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD002021.PUB3>
- Gowing, L., Farrell, M., Ali, R., & White, J. M. (2016). Alpha2-adrenergic agonists for the management of opioid withdrawal. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*, 2016(5). <https://doi.org/10.1002/14651858.CD002024.PUB5>
- Gracy, K. N., Dankiewicz, L. A., & Koob, G. F. (2001). Opiate Withdrawal-Induced Fos Immunoreactivity in the Rat Extended Amygdala Parallels the Development of Conditioned Place Aversion. *Neuropsychopharmacology*, 24(2), 152–160. [https://doi.org/10.1016/S0893-133X\(00\)00186-X](https://doi.org/10.1016/S0893-133X(00)00186-X)
- Grape, S., Schug, S. A., Lauer, S., & Schug, B. S. (2010). Formulations of fentanyl for the management of pain. *Drugs*, 70(1), 57–72. <https://doi.org/10.2165/11531740-000000000-00000/FIGURES/4>
- Green, T. C., & Gilbert, M. (2016). Counterfeit medications and fentanyl. In *JAMA Internal Medicine* (Vol. 176, Issue 10, pp. 1555–1557). American Medical Association. <https://doi.org/10.1001/jamainternmed.2016.4310>
- Greenwell, T. N., Funk, C. K., Cottone, P., Richardson, H. N., Chen, S. A., Rice, K. C., Zorrilla, E. P., & Koob, G. F. (2009). PRECLINICAL STUDY: Corticotropin-releasing factor-1 receptor antagonists decrease heroin self-administration in long- but not short-access rats. *Addiction Biology*, 14(2), 130–143. <https://doi.org/10.1111/J.1369-1600.2008.00142.X>
- Greenwell, T. N., Walker, B. M., Cottone, P., Zorrilla, E. P., & Koob, G. F. (2009). The $\alpha 1$ adrenergic receptor antagonist prazosin reduces heroin self-administration in rats with extended access to heroin administration. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 91(3), 295–302. <https://doi.org/10.1016/J.PBB.2008.07.012>
- Guillemin, G. J. (2012). Quinolinic acid, the inescapable neurotoxin. In *FEBS Journal* (Vol. 279, Issue 8, pp. 1356–1365). <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2012.08485.x>
- Guillemin, G. J., Croitoru-Lamoury, J., Dormont, D., Armati, P. J., & Brew, B. J. (2003). Quinolinic acid upregulates chemokine production and chemokine receptor expression in astrocytes. *Glia*, 41(4), 371–381. <https://doi.org/10.1002/GLIA.10175>
- Guillemin, G. J., Cullen, K. M., Lim, C. K., Smythe, G. A., Garner, B., Kapoor, V., Takikawa, O., & Brew, B. J. (2007). Characterization of the kynurenine pathway in human neurons. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 27(47), 12884–12892. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4101-07.2007>
- Guillemin, G. J., Kerr, S. J., Smythe, G. A., Smith, D. G., Kapoor, V., Armati, P. J., Croitoru, J., & Brew, B. J. (2001). Kynurenine pathway metabolism in human astrocytes: a paradox for neuronal protection. *Journal of Neurochemistry*, 78(4), 842–853. <https://doi.org/10.1046/J.1471-4159.2001.00498.X>
- Guillemin, G. J., Smith, D. G., Smythe, G. A., Armati, P. J., & Brew, B. J. (2003). Expression of the kynurenine pathway enzymes in human microglia and macrophages. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 527, 105–112. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-0135-0_12
- Guillemin, G. J., Wang, L., & Brew, B. J. (2005). Quinolinic acid selectively induces apoptosis of human astrocytes: potential role in AIDS dementia complex. *Journal of Neuroinflammation*, 2. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-2-16>
- Gunn, J., Hill, M. M., Cotten, B. M., & Deer, T. R. (2020). Observational Study An Analysis of Biomarkers in Patients with Chronic Pain. *Pain Physician*, 23, e41–e49. www.painphysicianjournal.com
- Guo, J., Williams, D. J., Puhl, H. L., & Ikeda, S. R. (2008). Inhibition of N-type calcium channels by activation of GPR35, an orphan receptor, heterologously expressed in rat sympathetic neurons. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 324(1), 342–351. <https://doi.org/10.1124/JPET.107.127266>
- Gupta, P. K., Ganesan, K., Pande, A., & Malhotra, R. C. (2005). A convenient one pot synthesis of fentanyl. <https://doi.org/10.3184/030823405774309078>, 7, 452–453. <https://doi.org/10.3184/030823405774309078>

- Gutierrez, T., Oliva, I., Crystal, J. D., & Hohmann, A. G. (2021). Peripheral nerve injury promotes morphine-seeking behavior in rats during extinction. *Experimental Neurology*, *338*, 113601. <https://doi.org/10.1016/J.EXPNEUROL.2021.113601>
- Gutiérrez-Vázquez, C., & Quintana, F. J. (2018). Regulation of the Immune Response by the Aryl Hydrocarbon Receptor. *Immunity*, *48*(1), 19–33. <https://doi.org/10.1016/J.IMMUNI.2017.12.012>
- Hadland, S. E., Bagley, S. M., Rodean, J., Silverstein, M., Levy, S., Larochele, M. R., Samet, J. H., & Zima, B. T. (2018). Receipt of Timely Addiction Treatment and Association of Early Medication Treatment With Retention in Care Among Youths With Opioid Use Disorder. *JAMA Pediatrics*, *172*(11), 1029–1037. <https://doi.org/10.1001/JAMAPEDIATRICS.2018.2143>
- Haight, B. R., Learned, S. M., Laffont, C. M., Fudala, P. J., Zhao, Y., Garofalo, A. S., Greenwald, M. K., Nadipelli, V. R., Ling, W., Heidbreder, C., Andersen, J. L., Bailey, G. L., Bartley, S. R., Biunno, M. J., Boyett, B., Carr, J. M., Cifuentes, E., Duarte-Skell, S. D., Dueno, O. R., ... Wiest, K. L. (2019). Efficacy and safety of a monthly buprenorphine depot injection for opioid use disorder: a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *The Lancet*, *393*(10173), 778–790. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)32259-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)32259-1)
- Hajiasgharzadeh, K., Sadigh-Eteghad, S., Mansoori, B., Mokhtarzadeh, A., Shانهbandi, D., Doustvandi, M. A., Asadzadeh, Z., & Baradaran, B. (2019). Alpha7 nicotinic acetylcholine receptors in lung inflammation and carcinogenesis: Friends or foes? *Journal of Cellular Physiology*, *234*(9), 14666–14679. <https://doi.org/10.1002/JCP.28220>
- Han, Q., Cai, T., Tagle, D. A., & Li, J. (2010). Structure, expression, and function of kynurenine aminotransferases in human and rodent brains. *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS*, *67*(3), 353–368. <https://doi.org/10.1007/S00018-009-0166-4>
- Han, Q., Cai, T., Tagle, D. A., Robinson, H., & Li, J. (2008). Substrate specificity and structure of human aminoadipate aminotransferase/kynurenine aminotransferase II. *Bioscience Reports*, *28*(4), 205. <https://doi.org/10.1042/BSR20080085>
- Han, Y., Yan, W., Zheng, Y., Khan, M. Z., Yuan, K., & Lu, L. (2019). The rising crisis of illicit fentanyl use, overdose, and potential therapeutic strategies. *Translational Psychiatry 2019 9:1*, *9*(1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41398-019-0625-0>
- Hankinson, O. (1995). The aryl hydrocarbon receptor complex. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, *35*, 307–340. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.PA.35.040195.001515>
- Hansen, K. B., Wollmuth, L. P., Bowie, D., Furukawa, H., Menniti, F. S., Sobolevsky, A. I., Swanson, G. T., Swanger, S. A., Greger, I. H., Nakagawa, T., McBain, C. J., Jayaraman, V., Low, C. M., Dell'acqua, M. L., Diamond, J. S., Camp, C. R., Perszyk, R. E., Yuan, H., & Traynelis, S. F. (2021). Structure, Function, and Pharmacology of Glutamate Receptor Ion Channels. *Pharmacological Reviews*, *73*(4), 1469–1658. <https://doi.org/10.1124/PHARMREV.120.000131>
- Hao, S., Liu, S., Zheng, X., Zheng, W., Ouyang, H., Mata, M., & Fink, D. J. (2010). The Role of TNF α in the Periaqueductal Gray During Naloxone-Precipitated Morphine Withdrawal in Rats. *Neuropsychopharmacology 2011 36:3*, *36*(3), 664–676. <https://doi.org/10.1038/npp.2010.197>
- Harrison, I. F., Powell, N. M., & Dexter, D. T. (2019). The histone deacetylase inhibitor nicotinamide exacerbates neurodegeneration in the lactacystin rat model of Parkinson's disease. *Journal of Neurochemistry*, *148*(1), 136–156. <https://doi.org/10.1111/JNC.14599>
- Havel, V., Kruegel, A. C., Bechand, B., McIntosh, S., Stallings, L., Hodges, A., Wulf, M. G., Nelson, M., Hunkele, A., Ansonoff, M., Pintar, J. E., Hwu, C., Ople, R. S., Abi-Gerges, N., Zaidi, S. A., Katritch, V., Yang, M., Javitch, J. A., Majumdar, S., ... Sames, D. (2024). Oxa-Iboga alkaloids lack cardiac risk and disrupt opioid use in animal models. *Nature Communications 2024 15:1*, *15*(1), 1–21. <https://doi.org/10.1038/s41467-024-51856-y>
- Hayes, A. J., Zheng, X., O'Kelly, J., Neyton, L. P. A., Bochkina, N. A., Uings, I., Liddle, J., Baillie, J. K., Just, G., Binnie, M., Homer, N. Z. M., Murray, T. B. J., Baily, J., McGuire, K., Skouras, C., Garden, O. J., Webster, S. P., Iredale, J. P., Howie, S. E. M., & Mole, D. J. (2023). Kynurenine monooxygenase regulates inflammation during critical illness and recovery in experimental acute pancreatitis. *Cell Reports*, *42*(8). <https://doi.org/10.1016/J.CELREP.2023.112763>
- Hazrati, E., Eftekhari, S. P., Mosaed, R., Shiralizadeh Dini, S., & Namazi, M. (2024). Understanding the kynurenine pathway: A narrative review on its impact across chronic pain conditions. *Molecular Pain*, *20*. <https://doi.org/10.1177/17448069241275097>
- Heimer, L., & Alheid, G. F. (1991). Piecing together the Puzzle of Basal Forebrain Anatomy. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, *295*, 1–42. https://doi.org/10.1007/978-1-4757-0145-6_1

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Heinrichs, S. C., Menzaghi, F., Schulteis, G., Koob, G. F., & Stinus, L. (1995). Suppression of corticotropin-releasing factor in the amygdala attenuates aversive consequences of morphine withdrawal. *Behavioural Pharmacology*, *6*(1), 74–80. <https://doi.org/10.1097/00008877-199501000-00011>
- Hemby, S. E., McIntosh, S., Leon, F., Cutler, S. J., & McCurdy, C. R. (2019). Abuse liability and therapeutic potential of the *Mitragyna speciosa* (kratom) alkaloids mitragynine and 7-hydroxymitragynine. *Addiction Biology*, *24*(5), 874–885. <https://doi.org/10.1111/adb.12639>
- Herman, B. H., Vocci, F., & Bridge, P. (1995). The effects of NMDA receptor antagonists and nitric oxide synthase inhibitors on opioid tolerance and withdrawal medication development issues for opiate addiction. *Neuropsychopharmacology* (Vol. 13, Issue 4, pp. 269–293). [https://doi.org/10.1016/0893-133X\(95\)00140-9](https://doi.org/10.1016/0893-133X(95)00140-9)
- Heyliger, S. O., Goodman, C. B., Ngong, J. M., & Soliman, K. F. A. (1998). The analgesic effects of tryptophan and its metabolites in the rat. *Pharmacological Research*, *38*(4), 243–250. <https://doi.org/10.1006/PHRS.1998.0362>
- Higgins, B., Simitsidelis, I., Zheng, X., Collins, F., Homer, N. Z., Denham, S. G., Simpson, J. P., Millar, M., Boswell, L., Lee, H. Y., Sweeney, P. J., Feraille, G., Taddei, A., Chagras, D., Alvarez, T., Webster, S. P., Horne, A., Saunders, P. T., & Mole, D. J. (2024). *Kynurenine monoxygenase blockade reduces endometriosis-like lesions, improves visceral hyperalgesia, and rescues mice from a negative behavioural phenotype in experimental endometriosis*. <https://doi.org/10.7554/eLife.99226.1>
- Hikosaka, O. (2010). The habenula: from stress evasion to value-based decision-making. *Nature Reviews Neuroscience* *2010 11:7*, *11*(7), 503–513. <https://doi.org/10.1038/nrn2866>
- Hilmas, C., Pereira, E. F. R., Alkondon, M., Rassoulpour, A., Schwarcz, R., & Albuquerque, E. X. (2001). The brain metabolite kynurenic acid inhibits $\alpha 7$ nicotinic receptor activity and increases non- $\alpha 7$ nicotinic receptor expression: Physiopathological implications. *Journal of Neuroscience*, *21*(19), 7463–7473. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.21-19-07463.2001>
- Hnasko, T. S., Sotak, B. N., & Palmiter, R. D. (2005). Morphine reward in dopamine-deficient mice. *Nature* *2005 438:7069*, *438*(7069), 854–857. <https://doi.org/10.1038/nature04172>
- Höglund, E., Øverli, Ø., & Winberg, S. (2019). Tryptophan metabolic pathways and brain serotonergic activity: A comparative review. *Frontiers in Endocrinology*, *10*(APR), 435368. <https://doi.org/10.3389/FENDO.2019.00158>
- Hser, Y. I., Saxon, A. J., Huang, D., Hasson, A., Thomas, C., Hillhouse, M., Jacobs, P., Teruya, C., McLaughlin, P., Wiest, K., Cohen, A., & Ling, W. (2014). Treatment retention among patients randomized to buprenorphine/naloxone compared to methadone in a multi-site trial. *Addiction*, *109*(1), 79–87. <https://doi.org/10.1111/ADD.12333>
- Huang, J. Y., Butler, L. M., Middttun, Ø., Ulvik, A., Wang, R., Jin, A., Gao, Y. T., Ueland, P. M., Koh, W. P., & Yuan, J. M. (2018). A prospective evaluation of serum kynurenine metabolites and risk of pancreatic cancer. *PLOS ONE*, *13*(5), e0196465. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0196465>
- Hucke, C., MacKenzie, C. R., Adjogble, K. D. Z., Takikawa, O., & Däubener, W. (2004). Nitric oxide-mediated regulation of gamma interferon-induced bacteriostasis: inhibition and degradation of human indoleamine 2,3-dioxygenase. *Infection and Immunity*, *72*(5), 2723–2730. <https://doi.org/10.1128/IAI.72.5.2723-2730.2004>
- Hunt, N. H., Too, L. K., Khaw, L. T., Guo, J., Hee, L., Mitchell, A. J., Grau, G. E., & Ball, H. J. (2017). The kynurenine pathway and parasitic infections that affect CNS function. *Neuropharmacology*, *112*, 389–398. <https://doi.org/10.1016/J.NEUROPHARM.2016.02.029>
- ISRCTN10496020: Safety, tolerability, pharmacokinetics and pharmacodynamics of KNS366*. (n.d.). <https://doi.org/10.1186/ISRCTN10496020>
- James, M. H., Fragale, J. E., Aurora, R. N., Cooperman, N. A., Langleben, D. D., & Aston-Jones, G. (2020). Repurposing the dual orexin receptor antagonist suvorexant for the treatment of opioid use disorder: why sleep on this any longer? *Neuropsychopharmacology* *2020 45:5*, *45*(5), 717–719. <https://doi.org/10.1038/s41386-020-0619-x>
- Janssen, P. A. J., & Eddy, N. B. (1960). Compounds related to pethidine-IV. New general chemical methods of increasing the analgesic activity of pethidine. *Journal of Medicinal and Pharmaceutical Chemistry*, *2*(1), 31–45. <https://doi.org/10.1021/JM50008A003>
- Janvier. (2017). *Janvier technical sheet*. https://janvier-labs.com/wp-content/uploads/FICHE_RESEARCH_MODEL_LONG_EVANS.pdf

- Jaureguiberry-Bravo, M., Lopez, L., & Berman, J. W. (2018). Frontline Science: Buprenorphine decreases CCL2-mediated migration of CD14+CD16+ monocytes. *Journal of Leukocyte Biology*, *104*(6), 1049–1059. <https://doi.org/10.1002/JLB.3HI0118-015R>
- Jentsch, J. D., & Taylor, J. R. (1999). Impulsivity resulting from frontostriatal dysfunction in drug abuse: implications for the control of behavior by reward-related stimuli. *Psychopharmacology*, *146*(4), 373–390. <https://doi.org/10.1007/PL00005483>
- Jhamandas, K. H., Boegman, R. J., Beninger, R. J., & Fiesher, S. (1998). Role of zinc in blockade of excitotoxic action of quinolinic acid by picolinic acid. *Amino Acids*, *14*(1), 257–261. <https://doi.org/10.1007/BF01345272>
- Junta Internacional de Fiscalización de Estupefacientes (JIFE). (2023). *Precursores y sustancias químicas frecuentemente utilizados para la fabricación ilícita de estupefacientes y sustancias sicotrópicas 2023*. www.incb.org
- Johnson, S. W., & North, R. A. (1992). Opioids excite dopamine neurons by hyperpolarization of local interneurons. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *12*(2), 483–488. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.12-02-00483.1992>
- Jones, I. W., & Wonnacott, S. (2004). Precise localization of alpha7 nicotinic acetylcholine receptors on glutamatergic axon terminals in the rat ventral tegmental area. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *24*(50), 11244–11252. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3009-04.2004>
- Jordan, C. J., Humburg, B., Rice, M., Bi, G. H., You, Z. B., Shaik, A. B., Cao, J., Bonifazi, A., Gadiano, A., Rais, R., Slusher, B., Newman, A. H., & Xi, Z. X. (2019). The Highly Selective Dopamine D3R Antagonist, R-VK4-40, Attenuates Oxycodone Reward and Augments Analgesia in Rodents. *Neuropharmacology*, *158*, 107597. <https://doi.org/10.1016/J.NEUROPHARM.2019.04.003>
- Jovanovic, F., Candido, K. D., & Knezevic, N. N. (2020). The Role of the Kynurenine Signaling Pathway in Different Chronic Pain Conditions and Potential Use of Therapeutic Agents. *International Journal of Molecular Sciences* *2020*, Vol. *21*, Page *6045*, *21*(17), 6045. <https://doi.org/10.3390/IJMS21176045>
- Juricek, L., & Coumoul, X. (2018). The Aryl Hydrocarbon Receptor and the Nervous System. *International Journal of Molecular Sciences*, *19*(9), 2504. <https://doi.org/10.3390/ijms19092504>
- Justinova, Z., Mascia, P., Wu, H. Q., Secci, M. E., Redhi, G. H., Panlilio, L. V., Scherma, M., Barnes, C., Parashos, A., Zara, T., Fratta, W., Solinas, M., Pistis, M., Bergman, J., Kangas, B. D., Ferré, S., Tanda, G., Schwarcz, R., & Goldberg, S. R. (2013). Reducing cannabinoid abuse and preventing relapse by enhancing endogenous brain levels of kynurenic acid. *Nature Neuroscience*, *16*(11), 1652–1661. <https://doi.org/10.1038/nn.3540>
- Kadam, M., Sinha, A., Nimkar, S., Matcheswalla, Y., & De Sousa, A. (2017). A comparative study of factors associated with relapse in alcohol dependence and opioid dependence. *Indian Journal of Psychological Medicine*, *39*(5), 627–633. https://doi.org/10.4103/IJPSYM.IJPSYM_356_17
- Kadriu, B., Farmer, C. A., Yuan, P., Park, L. T., Deng, Z. De, Moaddel, R., Henter, I. D., Shovestul, B., Ballard, E. D., Kraus, C., Gold, P. W., Machado-Vieira, R., & Zarate, C. A. (2019). The kynurenine pathway and bipolar disorder: intersection of the monoaminergic and glutamatergic systems and immune response. *Molecular Psychiatry* *2019* *26*:8, *26*(8), 4085–4095. <https://doi.org/10.1038/s41380-019-0589-8>
- Kakko, J., Alho, H., Baldacchino, A., Molina, R., Nava, F. A., & Shaya, G. (2019). Craving in opioid use disorder: From neurobiology to clinical practice. *Frontiers in Psychiatry*, *10*(AUG), 466627. <https://doi.org/10.3389/FPSYT.2019.00592>
- Kakko, J., Dybrandt Svanborg, K., Kreek, M. J., & Heilig, M. (2003). 1-year retention and social function after buprenorphine-assisted relapse prevention treatment for heroin dependence in Sweden: a randomised, placebo-controlled trial. *Lancet (London, England)*, *361*(9358), 662–668. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(03\)12600-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(03)12600-1)
- Kakko, J., Gronbladh, L., Svanborg, K. D., Von Wachenfeldt, J., Rück, C., Rawlings, B., Nilsson, L. H., & Heilig, M. (2007). A stepped care strategy using buprenorphine and methadone versus conventional methadone maintenance in heroin dependence: a randomized controlled trial. *The American Journal of Psychiatry*, *164*(5), 797–803. <https://doi.org/10.1176/AJP.2007.164.5.797>
- Kalivas, P. W. (2009). The glutamate homeostasis hypothesis of addiction. *Nature Reviews. Neuroscience*, *10*(8), 561–572. <https://doi.org/10.1038/NRN2515>

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Kariisa, M., O'Donnell, J., Kumar, S., Mattson, C. L., & Goldberger, B. A. (2023). Illicitly Manufactured Fentanyl—Involved Overdose Deaths with Detected Xylazine — United States, January 2019–June 2022. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, 72(26), 721. <https://doi.org/10.15585/MMWR.MM7226A4>
- Kegel, M. E., Bhat, M., Skogh, E., Samuelsson, M., Lundberg, K., Dahl, M. L., Sellgren, C., Schwieler, L., Engberg, G., Schuppe-Koistinen, I., & Erhardt, S. (2014). Imbalanced Kynurenine Pathway in Schizophrenia. *International Journal of Tryptophan Research*, 7, 15–22. <https://doi.org/10.4137/IJTR.S16800>
- Kelamangalath, L., Seymour, C. M., & Wagner, J. J. (2009). d-Serine facilitates the effects of extinction to reduce cocaine-primed reinstatement of drug-seeking behavior. *Neurobiology of Learning and Memory*, 92(4), 544–551. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2009.07.004>
- Kelly, E., Sutcliffe, K., Cavallo, D., Ramos-Gonzalez, N., Alhosan, N., & Henderson, G. (2023). The anomalous pharmacology of fentanyl. *British Journal of Pharmacology*, 180(7), 797–812. <https://doi.org/10.1111/BPH.15573>
- Kenney, S. R., Anderson, B. J., Conti, M. T., Bailey, G. L., & Stein, M. D. (2018). Expected and actual fentanyl exposure among persons seeking opioid withdrawal management. *Journal of Substance Abuse Treatment*, 86, 65–69. <https://doi.org/10.1016/J.JSAT.2018.01.005>
- Kenny, P. J., Chen, S. A., Kitamura, O., Markou, A., & Koob, G. F. (2006). Conditioned Withdrawal Drives Heroin Consumption and Decreases Reward Sensitivity. *The Journal of Neuroscience*, 26(22), 5894. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0740-06.2006>
- Kim, H., Chen, L., Lim, G., Sung, B., Wang, S., McCabe, M. F., Rusanescu, G., Yang, L., Tian, Y., & Mao, J. (2012). Brain indoleamine 2,3-dioxygenase contributes to the comorbidity of pain and depression. *The Journal of Clinical Investigation*, 122(8), 2940–2954. <https://doi.org/10.1172/JCI61884>
- Kim, H. Y., Lee, I., Chun, S. W., & Kim, H. K. (2015). Reactive Oxygen Species Donors Increase the Responsiveness of Dorsal Horn Neurons and Induce Mechanical Hyperalgesia in Rats. *Neural Plasticity*, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/293423>
- Kim, M., & Tomek, P. (2021). Tryptophan: A Rheostat of Cancer Immune Escape Mediated by Immunosuppressive Enzymes IDO1 and TDO. *Frontiers in Immunology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.636081>
- Kimber, J., Larney, S., Hickman, M., Randall, D., & Degenhardt, L. (2015). Mortality risk of opioid substitution therapy with methadone versus buprenorphine: a retrospective cohort study. *The Lancet Psychiatry*, 2(10), 901–908. [https://doi.org/10.1016/S2215-0366\(15\)00366-1](https://doi.org/10.1016/S2215-0366(15)00366-1)
- Kita, T., Morrison, P. F., Heyes, M. P., & Markey, S. P. (2002). Effects of systemic and central nervous system localized inflammation on the contributions of metabolic precursors to the L-kynurenine and quinolinic acid pools in brain. *Journal of Neurochemistry*, 82(2), 258–268. <https://doi.org/10.1046/J.1471-4159.2002.00955.X>
- Klaire, S., Zivanovic, R., Barbic, S. P., Sandhu, R., Mathew, N., & Azar, P. (2019). Rapid Micro-Induction of Buprenorphine/Naloxone for Opioid Use Disorder in an Inpatient Setting: A Case Series. *The American Journal on Addictions*, 28(4), 262–265. <https://doi.org/10.1111/AJAD.12869>
- Knoll, A. T., & Carlezon, W. A. (2010). Dynorphin, stress, and depression. *Brain Research*, 1314, 56–73. <https://doi.org/10.1016/J.BRAINRES.2009.09.074>
- Kohler, C., Eriksson, L. G., Flood, P. R., Hardie, J. A., Okuno, E., & Schwarcz, R. (1988). Quinolinic acid metabolism in the rat brain. Immunohistochemical identification of 3-hydroxyanthranilic acid oxygenase and quinolinic acid phosphoribosyltransferase in the hippocampal region. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 8(3), 975–987. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.08-03-00975.1988>
- Koob, G. F. (2020). Neurobiology of Opioid Addiction: Opponent Process, Hyperkatifeia, and Negative Reinforcement. In *Biological Psychiatry* (Vol. 87, Issue 1, pp. 44–53). Elsevier USA. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2019.05.023>
- Koob, G. F., & Le Moal, M. (1997). Drug abuse: hedonic homeostatic dysregulation. *Science (New York, N.Y.)*, 278(5335), 52–58. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.278.5335.52>
- Koob, G. F., & Le Moal, M. (2008). Addiction and the brain antireward system. *Annual Review of Psychology*, 59, 29–53. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.PSYCH.59.103006.093548>
- Koob, G. F., & Volkow, N. D. (2016). Neurobiology of addiction: a neurocircuitry analysis. *The Lancet Psychiatry*, 3(8), 760–773. [https://doi.org/10.1016/S2215-0366\(16\)00104-8](https://doi.org/10.1016/S2215-0366(16)00104-8)

- Kozieł, K., & Urbanska, E. M. (2023). Kynurenine Pathway in Diabetes Mellitus—Novel Pharmacological Target? *Cells*, *12*(3). <https://doi.org/10.3390/CELLS12030460>
- Krantz, M. J., Lewkowicz, L., Hays, H., Woodroffe, M. A., Robertson, A. D., & Mehler, P. S. (2002). Torsade de pointes associated with very-high-dose methadone. *Annals of Internal Medicine*, *137*(6), 501–504. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-137-6-200209170-00010>
- Krausz, R. M., Westenberg, J. N., & Vogel, M. (2022). Addressing fentanyl use disorder with fentanyl-assisted treatment. *The Lancet Psychiatry*, *9*(2), 103–105. [https://doi.org/10.1016/S2215-0366\(21\)00393-X](https://doi.org/10.1016/S2215-0366(21)00393-X)
- Krebs, E. E., Gravely, A., Nugent, S., Jensen, A. C., DeRonne, B., Goldsmith, E. S., Kroenke, K., Bair, M. J., & Noorbalooci, S. (2018). Effect of Opioid vs Nonopioid Medications on Pain-Related Function in Patients With Chronic Back Pain or Hip or Knee Osteoarthritis Pain: The SPACE Randomized Clinical Trial. *JAMA*, *319*(9), 872–882. <https://doi.org/10.1001/JAMA.2018.0899>
- Kristensen, J. D., Post, C., Gordh, T., & Svensson, B. A. (1993). Spinal cord morphology and antinociception after chronic intrathecal administration of excitatory amino acid antagonists in the rat. *Pain*, *54*(3), 309–316. [https://doi.org/10.1016/0304-3959\(93\)90030-S](https://doi.org/10.1016/0304-3959(93)90030-S)
- Krupa, A., Krupa, M. M., & Pawlak, K. (2022). Kynurenine Pathway—An Underestimated Factor Modulating Innate Immunity in Sepsis-Induced Acute Kidney Injury? *Cells*, *11*(16). <https://doi.org/10.3390/CELLS11162604>
- Kuczyńska, K., Grzonkowski, P., Kacprzak, Ł., & Zawilska, J. B. (2018a). Abuse of fentanyl: An emerging problem to face. *Forensic Science International*, *289*, 207–214. <https://doi.org/10.1016/J.FORSCIINT.2018.05.042>
- Kuczyńska, K., Grzonkowski, P., Kacprzak, Ł., & Zawilska, J. B. (2018b). Abuse of fentanyl: An emerging problem to face. *Forensic Science International*, *289*, 207–214. <https://doi.org/10.1016/J.FORSCIINT.2018.05.042>
- Kuhlman, J. J., Levine, B., Johnson, R. E., Fudala, P. J., & Cone, E. J. (1998). Relationship of plasma buprenorphine and norbuprenorphine to withdrawal symptoms during dose induction, maintenance and withdrawal from sublingual buprenorphine. *Addiction*, *93*(4), 549–559. <https://doi.org/10.1046/j.1360-0443.1998.93454910.x>
- Laffont, C. M., Ngaimisi, E., Gopalakrishnan, M., Ivaturi, V., Young, M., Greenwald, M. K., & Heidbreder, C. (2022). Buprenorphine exposure levels to optimize treatment outcomes in opioid use disorder. *Frontiers in Pharmacology*, *13*, 1052113. <https://doi.org/10.3389/FPHAR.2022.1052113>
- Lambert, D. G. (2023). Opioids and opioid receptors; understanding pharmacological mechanisms as a key to therapeutic advances and mitigation of the misuse crisis. *BJA Open*, *6*, 100141. <https://doi.org/10.1016/J.BJAO.2023.100141>
- Land, B. B., Bruchas, M. R., Lemos, J. C., Xu, M., Melief, E. J., & Chavkin, C. (2008). The Dysphoric Component of Stress Is Encoded by Activation of the Dynorphin κ -Opioid System. *The Journal of Neuroscience*, *28*(2), 407. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4458-07.2008>
- Larigot, L., Benoit, L., Koual, M., Tomkiewicz, C., Barouki, R., & Coumoul, X. (2024). Aryl Hydrocarbon Receptor and Its Diverse Ligands and Functions: An Exposome Receptor INTRODUCTION: THE DISCOVERY OF THE AhR SIGNALING PATHWAY AND DETOXICATION FUNCTIONS. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* Downloaded from *Www.Annualreviews.Org*. Guest (Guest. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-052220>
- Larson, A. A., & Takemori, A. E. (1977). Effect of narcotics on the uptake of serotonin precursors by the rat brain. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *200*(1).
- Laumet, G., Zhou, W., Dantzer, R., Edralin, J. D., Huo, X. J., Budac, D. P., O'Connor, J. C., Lee, A. W., Heijnen, C. J., & Kavelaars, A. (2017). Upregulation of neuronal kynurenine 3-monooxygenase mediates depression-like behavior in a mouse model of neuropathic pain. *Brain, Behavior, and Immunity*, *66*, 94. <https://doi.org/10.1016/J.BBI.2017.07.008>
- Laviolette, S. R., & Van Der Kooy, D. (2004). GABAA receptors signal bidirectional reward transmission from the ventral tegmental area to the tegmental pedunculopontine nucleus as a function of opiate state. *The European Journal of Neuroscience*, *20*(8), 2179–2187. <https://doi.org/10.1111/J.1460-9568.2004.03665.X>
- Lecca, S., Meye, F. J., & Mameli, M. (2014). The lateral habenula in addiction and depression: an anatomical, synaptic and behavioral overview. *European Journal of Neuroscience*, *39*(7), 1170–1178. <https://doi.org/10.1111/EJN.12480>

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Leclercq, S., Schwarz, M., Delzenne, N. M., Stärkel, P., & de Timary, P. (2021). Alterations of kynurenine pathway in alcohol use disorder and abstinence: a link with gut microbiota, peripheral inflammation and psychological symptoms. *Translational Psychiatry*, *11*(1). <https://doi.org/10.1038/s41398-021-01610-5>
- Lee, J. D., Nunes, E. V., Novo, P., Bachrach, K., Bailey, G. L., Bhatt, S., Farkas, S., Fishman, M., Gauthier, P., Hodgkins, C. C., King, J., Lindblad, R., Liu, D., Matthews, A. G., May, J., Peavy, K. M., Ross, S., Salazar, D., Schkolnik, P., ... Rotrosen, J. (2018). Comparative effectiveness of extended-release naltrexone versus buprenorphine-naloxone for opioid relapse prevention (X:BOT): a multicentre, open-label, randomised controlled trial. *The Lancet*, *391*(10118), 309–318. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)32812-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)32812-X)
- Lee, M. C., Ting, K. K., Adams, S., Brew, B. J., Chung, R., & Guillemin, G. J. (2010). Characterisation of the Expression of NMDA Receptors in Human Astrocytes. *PLOS ONE*, *5*(11), e14123. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0014123>
- Lemen, P. M., Garrett, D. P., Thompson, E., Aho, M., Vasquez, C., & Park, J. N. (2024). High-dose naloxone formulations are not as essential as we thought. *Harm Reduction Journal*, *21*(1). <https://doi.org/10.1186/S12954-024-00994-Z>
- Li, G., Yue, S., Wang, Y., Singh, A., & Wang, Z. J. (2023). IGF-1 Microinjection in the Prefrontal Cortex Attenuates Fentanyl-Seeking Behavior in Mice. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, *26*(5), 359. <https://doi.org/10.1093/IJNP/PYAD013>
- Li, Q., Wang, Y., Zhang, Y., Li, W., Yang, W., Zhu, J., Wu, N., Chang, H., Zheng, Y., Qin, W., Zhao, L., Yuan, K., Liu, J., Wang, W., & Tian, J. (2012). Craving correlates with mesolimbic responses to heroin-related cues in short-term abstinence from heroin: An event-related fMRI study. *Brain Research*, *1469*, 63–72. <https://doi.org/10.1016/J.BRAINRES.2012.06.024>
- Li, S., Li, H., & Takahata, T. (2022). Pigmented Long-Evans rats demonstrate better visual ability than albino Wistar rats in slow angles-descent forepaw grasping test. *NeuroReport*, *33*(12), 543–547. <https://doi.org/10.1097/WNR.0000000000001815>
- Liu, Z. Q., Gu, X. H., Yang, Y. J., Yin, X. P., Xu, L. J., & Wang, W. (2016). D-Serine in the nucleus accumbens region modulates behavioral sensitization and extinction of conditioned place preference. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, *143*, 44–56. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2016.02.002>
- López-Moreno, J. A., Trigo-Díaz, J. M., Rodríguez De Fonseca, F., González Cuevas, G., Gómez De Heras, R., Crespo Galán, I., & Navarro, M. (2004). Nicotine in alcohol deprivation increases alcohol operant self-administration during reinstatement. *Neuropharmacology*, *47*(7), 1036–1044. <https://doi.org/10.1016/J.NEUROPHARM.2004.08.002>
- Lowe, M. M., Mold, J. E., Kanwar, B., Huang, Y., Louie, A., Pollastri, M. P., Wang, C., Patel, G., Franks, D. G., Schlezinger, J., Sherr, D. H., Silverstone, A. E., Hahn, M. E., & McCune, J. M. (2014). Identification of Cinnabarinic Acid as a Novel Endogenous Aryl Hydrocarbon Receptor Ligand That Drives IL-22 Production. *PLOS ONE*, *9*(2), e87877. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0087877>
- LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L., & RANDALL, R. J. (1951). PROTEIN MEASUREMENT WITH THE FOLIN PHENOL REAGENT. *Journal of Biological Chemistry*, *193*(1), 265–275. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)52451-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)52451-6)
- Lu, R. B., Wang, T. Y., Lee, S. Y., Chen, S. L., Chang, Y. H., See Chen, P., Lin, S. H., Chu, C. H., Huang, S. Y., Tzeng, N. S., Lee, I. H., Chin Chen, K., Kuang Yang, Y., Chen, P., Chen, S. H., & Hong, J. S. (2019). Correlation between interleukin-6 levels and methadone maintenance therapy outcomes. *Drug and Alcohol Dependence*, *204*. <https://doi.org/10.1016/j.drugalcdep.2019.06.018>
- Lugo-Huitrón, R., Blanco-Ayala, T., Ugalde-Muñoz, P., Carrillo-Mora, P., Pedraza-Chaverrí, J., Silva-Adaya, D., Maldonado, P. D., Torres, I., Pinzón, E., Ortiz-Islas, E., López, T., García, E., Pineda, B., Torres-Ramos, M., Santamaría, A., & La Cruz, V. P. De. (2011). On the antioxidant properties of kynurenic acid: Free radical scavenging activity and inhibition of oxidative stress. *Neurotoxicology and Teratology*, *33*(5), 538–547. <https://doi.org/10.1016/j.ntt.2011.07.002>
- Lugo-Huitrón, R., Ugalde Muñoz, P., Pineda, B., Pedraza-Chaverrí, J., Ríos, C., & Pérez-De La Cruz, V. (2013). Quinolinic acid: an endogenous neurotoxin with multiple targets. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, *2013*. <https://doi.org/10.1155/2013/104024>
- Lüscher, C., & Malenka, R. C. (2011). Drug-evoked synaptic plasticity in addiction: from molecular changes to circuit remodeling. *Neuron*, *69*(4), 650–663. <https://doi.org/10.1016/J.NEURON.2011.01.017>

- M. Clewa, R., T. Gass, J., J. Widholm, J., & F. Olive, M. (2010). Glutamatergic Targets for Enhancing Extinction Learning in Drug Addiction. *Current Neuropharmacology*, 8(4), 394. <https://doi.org/10.2174/157015910793358169>
- Ma, Y. Y., Yu, P., Guo, C. Y., & Cui, C. L. (2011). Effects of ifenprodil on morphine-induced conditioned place preference and spatial learning and memory in rats. *Neurochemical Research*, 36(3), 383–391. <https://doi.org/10.1007/S11064-010-0342-9>
- Maex, R., Grinevich, V. P., Grinevich, V., Budygin, E., Bencherif, M., & Gutkin, B. (2014). Understanding the Role $\alpha 7$ Nicotinic Receptors Play in Dopamine Efflux in Nucleus Accumbens. *ACS Chemical Neuroscience*, 5(10), 1032. <https://doi.org/10.1021/CN500126T>
- Maganin, A. G., Souza, G. R., Fonseca, M. D., Lopes, A. H., Guimarães, R. M., Dagostin, A., Cecilio, N. T., Mendes, A. S., Gonçalves, W. A., Silva, C. E. A., Gomes, F. I. F., Mauriz Marques, L. M., Silva, R. L., Arruda, L. M., Santana, D. A., Lemos, H., Huang, L., Davoli-Ferreira, M., Santana-Coelho, D., ... Cunha, T. M. (2022). Meningeal dendritic cells drive neuropathic pain through elevation of the kynurenine metabolic pathway in mice. *The Journal of Clinical Investigation*, 132(23). <https://doi.org/10.1172/JCI153805>
- Maguire, D. R., Gerak, L. R., Sanchez, J. J., Javors, M. A., Disney, A., Husbands, S. M., & France, C. P. (2020). Effects of acute and repeated treatment with methocinnamox, a mu opioid receptor antagonist, on fentanyl self-administration in rhesus monkeys. *Neuropsychopharmacology* 2020 45:12, 45(12), 1986–1993. <https://doi.org/10.1038/s41386-020-0698-8>
- Maitre, M., Taleb, O., Jeltsch-David, H., Klein, C., & Mensah-Nyagan, A. G. (2024). Xanthurenic acid: A role in brain intercellular signaling. *Journal of Neurochemistry*. <https://doi.org/10.1111/JNC.16099>
- Majumdar, S., Grinnell, S., Le Rouzic, V., Burgman, M., Polikar, L., Ansonoff, M., Pintar, J., Pan, Y. X., & Pasternak, G. W. (2011). Truncated G protein-coupled mu opioid receptor MOR-1 splice variants are targets for highly potent opioid analgesics lacking side effects. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(49), 19778–19783. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1115231108>
- Majumdar, S., Subrath, J., Le Rouzic, V., Polikar, L., Burgman, M., Nagakura, K., Ocampo, J., Haselton, N., Pasternak, A. R., Grinnell, S., Pan, Y. X., & Pasternak, G. W. (2012). Synthesis and evaluation of aryl-naloxamide opiate analgesics targeting truncated exon 11-associated μ opioid receptor (MOR-1) splice variants. *Journal of Medicinal Chemistry*, 55(14), 6352–6362. <https://doi.org/10.1021/JM300305C>
- Maldonado, R., Fournie-Zaluski, M. C., & Roques, B. P. (1992). Attenuation of the morphine withdrawal syndrome by inhibition of catabolism of endogenous enkephalins in the periaqueductal gray matter. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 345(4), 466–472. <https://doi.org/10.1007/BF00176626>
- Malkesman, O., Austin, D. R., Tragon, T., Wang, G., Rompala, G., Hamidi, A. B., Cui, Z., Young, W. S., Nakazawa, K., Zarate, C. A., Manji, H. K., & Chen, G. (2012). Acute d-serine treatment produces antidepressant-like effects in rodents. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, 15(8), 1135–1148. <https://doi.org/10.1017/S1461145711001386>
- Malone, S. G. (2020). *ESCALATION AND REINSTATEMENT OF FENTANYL SELF-ADMINISTRATION IN MALE AND FEMALE RATS*.
- Malone, S. G., Keller, P. S., Hammerslag, L. R., & Bardo, M. T. (2021). Escalation and reinstatement of fentanyl self-administration in male and female rats. *Psychopharmacology*, 238(8), 2261–2273. <https://doi.org/10.1007/S00213-021-05850-7/FIGURES/4>
- Mangoni, A. A., & Zinellu, A. (2023). A systematic review and meta-analysis of the kynurenine pathway of tryptophan metabolism in rheumatic diseases. *Frontiers in Immunology*, 14. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2023.1257159>
- Marek, P., Ben-Eliyahu, S., Vaccarino, A. L., & Liebeskind, J. C. (1991). Delayed application of MK-801 attenuates development of morphine tolerance in rats. *Brain Research*, 558(1), 163–165. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(91\)90736-F](https://doi.org/10.1016/0006-8993(91)90736-F)
- Martin, T. J., Kim, S. A., Buechler, N. L., Porreca, F., & Eisenach, J. C. (2007). Opioid Self-administration in the Nerve-injured Rat Relevance of Antiallodynic Effects to Drug Consumption and Effects of Intrathecal Analgesics. *Anesthesiology*, 106(2), 312–322. <https://doi.org/10.1097/0000542-200702000-00020>

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Martínez-Navarro, M., Maldonado, R., & Baños, J. E. (2019). Why mu-opioid agonists have less analgesic efficacy in neuropathic pain? *European Journal of Pain (London, England)*, 23(3), 435–454. <https://doi.org/10.1002/EJP.1328>
- Martos, D., Tuka, B., Tanaka, M., Vécsei, L., & Telegdy, G. (2022). Memory Enhancement with Kynurenic Acid and Its Mechanisms in Neurotransmission. *Biomedicines*, 10(4). <https://doi.org/10.3390/BIOMEDICINES10040849>
- Mattick, R. P., Breen, C., Kimber, J., & Davoli, M. (2014). Buprenorphine maintenance versus placebo or methadone maintenance for opioid dependence. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 2014(2). <https://doi.org/10.1002/14651858.CD002207.PUB4>
- Mavrikaki, M., Pravetoni, M., Page, S., Potter, D., & Chartoff, E. (2017). Oxycodone self-administration in male and female rats. *Psychopharmacology*, 234(6), 977–987. <https://doi.org/10.1007/s00213-017-4536-6>
- McFarland, K., & Kalivas, P. W. (2001). The circuitry mediating cocaine-induced reinstatement of drug-seeking behavior. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 21(21), 8655–8663. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.21-21-08655.2001>
- McLellan, A. T., McKay, J. R., Forman, R., Cacciola, J., & Kemp, J. (2005). Reconsidering the evaluation of addiction treatment: From retrospective follow-up to concurrent recovery monitoring. In *Addiction* (Vol. 100, Issue 4, pp. 447–458). <https://doi.org/10.1111/j.1360-0443.2005.01012.x>
- Mcnicol, E. D., Midbari, A., & Eisenberg, E. (2013). Opioids for neuropathic pain. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 2017(4). https://doi.org/10.1002/14651858.CD006146.PUB2/MEDIA/CDSR/CD006146/IMAGE_T/TCDD06146-CMP-005-04.XXX
- Mechtcheriakov, S., Gleissenthall, G. V., Geisler, S., Arnhard, K., Oberacher, H., Schurr, T., Kemmler, G., Unterberger, C., & Fuchs, D. (2022). Tryptophan-kynurenine metabolism during acute alcohol withdrawal in patients with alcohol use disorder: The role of immune activation. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research*, 46(9), 1648. <https://doi.org/10.1111/ACER.14920>
- Mendelsohn, D., Riedel, W. J., & Sambeth, A. (2009). Effects of acute tryptophan depletion on memory, attention and executive functions: A systematic review. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 33(6), 926–952. <https://doi.org/10.1016/J.NEUBIOREV.2009.03.006>
- Merlo, L. M. F., Pigott, E., DuHadaway, J. B., Grabler, S., Metz, R., Prendergast, G. C., & Mandik-Nayak, L. (2014). IDO2 is a critical mediator of autoantibody production and inflammatory pathogenesis in a mouse model of autoimmune arthritis. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 192(5), 2082. <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.1303012>
- Messing, R. B., Flinchbaugh, C., & Waymire, J. C. (1978). Changes in brain tryptophan and tyrosine following acute and chronic morphine administration. *Neuropharmacology*, 17(6), 391–396. [https://doi.org/10.1016/0028-3908\(78\)90011-4](https://doi.org/10.1016/0028-3908(78)90011-4)
- Metz, R., DuHadaway, J. B., Kamasani, U., Laury-Kleintop, L., Muller, A. J., & Prendergast, G. C. (2007). Novel tryptophan catabolic enzyme IDO2 is the preferred biochemical target of the antitumor indoleamine 2,3-dioxygenase inhibitory compound D-1-methyl-tryptophan. *Cancer Research*, 67(15), 7082–7087. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-1872>
- Michal, M., Schulz, A., Wild, P. S., Koeck, T., Münzel, T., Schuster, A. K., Strauch, K., Lackner, K., Süßmuth, S. D., Niessen, H. G., Borta, A., Allers, K. A., Zahn, D., & Beutel, M. E. (2023). Tryptophan catabolites and depression in the general population: results from the Gutenberg Health Study. *BMC Psychiatry*, 23(1). <https://doi.org/10.1186/s12888-023-04520-6>
- Mole, D. J., Webster, S. P., Uings, I., Zheng, X., Binnie, M., Wilson, K., Hutchinson, J. P., Mirguet, O., Walker, A., Beaufils, B., Ancellin, N., Trotter, L., Bénétou, V., Mowat, C. G., Wilkinson, M., Rowland, P., Haslam, C., McBride, A., Homer, N. Z. M., ... Iredale, J. P. (2016). Kynurenine–3–monooxygenase inhibition prevents multiple organ failure in rodent models of acute pancreatitis. *Nature Medicine*, 22(2), 202. <https://doi.org/10.1038/NM.4020>
- Molteni, R., Macchi, F., Zecchillo, C., Dell'Agli, M., Colombo, E., Calabrese, F., Guidotti, G., Racagni, G., & Riva, M. A. (2013). Modulation of the inflammatory response in rats chronically treated with the antidepressant agomelatine. *European Neuropsychopharmacology : The Journal of the European College of Neuropsychopharmacology*, 23(11), 1645–1655. <https://doi.org/10.1016/J.EURONEURO.2013.03.008>

- Montemitto, C., Angebrandt, A., Wang, T. Y., Pettorruso, M., & Abulseoud, O. A. (2021). Mechanistic insights into the efficacy of memantine in treating certain drug addictions. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, *111*. <https://doi.org/10.1016/J.PNPBP.2021.110409>
- Montiel Ishino, F. A., McNab, P. R., Gilreath, T., Salmeron, B., & Williams, F. (2020). A comprehensive multivariate model of biopsychosocial factors associated with opioid misuse and use disorder in a 2017–2018 United States national survey. *BMC Public Health*, *20*(1), 1–16. <https://doi.org/10.1186/S12889-020-09856-2/TABLES/4>
- Morales-Puerto, N., Giménez-Gómez, P., Pérez-Hernández, M., Abuin-Martínez, C., Gil de Biedma-Elduayen, L., Vidal, R., Gutiérrez-López, M. D., O’Shea, E., & Colado, M. I. (2021). Addiction and the kynurenine pathway: A new dancing couple? In *Pharmacology and Therapeutics* (Vol. 223, p. 107807). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2021.107807>
- Moroni, F., Russi, P., Lombardi, G., Beni, M., & Carlà, V. (1988). Presence of kynurenic acid in the mammalian brain. *Journal of Neurochemistry*, *51*(1), 177–180. <https://doi.org/10.1111/J.1471-4159.1988.TB04852.X>
- Morrison, P. F., Morishige, G. M., Beagles, K. E., & Heyes, M. P. (1999). Quinolinic acid is extruded from the brain by a probenecid-sensitive carrier system: a quantitative analysis. *Journal of Neurochemistry*, *72*(5), 2135–2144. <https://doi.org/10.1046/J.1471-4159.1999.0722135.X>
- Moulin, D., Millard, M., Taïeb, M., Michaudel, C., Aucouturier, A., Lefèvre, A., Bermúdez-Humarán, L. G., Langella, P., Sereme, Y., Wanherdrick, K., Gautam, P., Mariette, X., Dieudé, P., Gottenberg, J. E., Jouzeau, J. Y., Skurnik, D., Emond, P., Mulleman, D., Sellam, J., & Sokol, H. (2024). Counteracting tryptophan metabolism alterations as a new therapeutic strategy for rheumatoid arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases*, *83*(3), 312–323. <https://doi.org/10.1136/ARD-2023-224014>
- Nakamura, T., Niimi, S., Nawa, K., Noda, C., Ichihara, A., Takagi, Y., Anai, M., & Sakaki, Y. (1987). Multihormonal regulation of transcription of the tryptophan 2,3-dioxygenase gene in primary cultures of adult rat hepatocytes with special reference to the presence of a transcriptional protein mediating the action of glucocorticoids. *Journal of Biological Chemistry*, *262*(2), 727–733. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)75845-1](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)75845-1)
- Nakanishi, S. (1992). Molecular Diversity of Glutamate Receptors and Implications for Brain Function. *Science*, *258*(5082), 597–603. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1329206>
- Narayanan, S., Lam, H., Christian, L., Levine, M. S., Grandy, D., Rubinstein, M., & Maidment, N. T. (2004). Endogenous opioids mediate basal hedonic tone independent of dopamine d-1 or d-2 receptor activation. *Neuroscience*, *124*(1), 241–246. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2003.11.011>
- Navratilova, E., Xie, J. Y., Okun, A., Qu, C., Eyde, N., Ci, S., Ossipov, M. H., King, T., Fields, H. L., & Porreca, F. (2012). Pain relief produces negative reinforcement through activation of mesolimbic reward–valuation circuitry. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *109*(50), 20709–20713. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1214605109>
- Neale, S. A., Copeland, C. S., & Salt, T. E. (2014). Effect of VGLUT inhibitors on glutamatergic synaptic transmission in the rodent hippocampus and prefrontal cortex. *Neurochemistry International*, *73*(1), 159–165. <https://doi.org/10.1016/J.NEUINT.2013.10.001>
- National Institute on Drug Abuse (NIDA). (2023). *Drug Overdose Death Rates National Institute on Drug Abuse (NIDA)*. <https://nida.nih.gov/research-topics/trends-statistics/overdose-death-rates>
- Nosyk, B., Min, J., Homayra, F., Kurz, M., Guerra-Alejos, B., & Yan, R. (2024). *Comparative effectiveness of buprenorphine/naloxone versus methadone for treatment of opioid use disorder: emulating target trials with population-level data*. Poster session presented at: The College on Problems of Drug Dependence (CPDD) 86th Annual Scientific Meeting; 2024 Jun 15-19; Montreal, CAN. <https://nida.nih.gov/about-nida/noras-blog/2024/07/to-address-the-fentanyl-crisis-greater-access-to-methadone-is-needed>
- O’Brien, C. P., Testa, T., O’Brien, T. J., Brady, J. P., & Wells, B. (1977). Conditioned Narcotic Withdrawal in Humans. *Science*, *195*(4282), 1000–1002. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.841320>
- O’Connor, E. C., Chapman, K., Butler, P., & Mead, A. N. (2011). The predictive validity of the rat self-administration model for abuse liability. In *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* (Vol. 35, Issue 3, pp. 912–938). Pergamon. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2010.10.012>
- Observatorio Español de las Drogas y las Adicciones (OEDA). (2022). *EDADES: Encuesta sobre alcohol y otras drogas en España*.
- Observatorio Español de las Drogas y las Adicciones (OEDA). (2023). *ESTUDES 2023: Encuesta sobre uso de drogas en Enseñanzas Secundarias en España*.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Okuda, S., Nishiyama, N., Saito, H., & Katsuki, H. (1998). 3-Hydroxykynurenine, an endogenous oxidative stress generator, causes neuronal cell death with apoptotic features and region selectivity. *Journal of Neurochemistry*, *70*(1), 299–307. <https://doi.org/10.1046/J.1471-4159.1998.70010299.X>
- Okuno, E., Nakamura, M., & Schwarcz, R. (1991). Two kynurenine aminotransferases in human brain. *Brain Research*, *542*(2), 307–312. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(91\)91583-M](https://doi.org/10.1016/0006-8993(91)91583-M)
- Opitz, C. A., Litzenburger, U. M., Sahn, F., Ott, M., Tritschler, I., Trump, S., Schumacher, T., Jestaedt, L., Schrenk, D., Weller, M., Jugold, M., Guillemin, G. J., Miller, C. L., Lutz, C., Radlwimmer, B., Lehmann, I., Von Deimling, A., Wick, W., & Platten, M. (2011). An endogenous tumour-promoting ligand of the human aryl hydrocarbon receptor. *Nature*, *478*(7368), 197–203. <https://doi.org/10.1038/NATURE10491>
- Oviedo-Joekes, E., Guh, D., Brissette, S., Marchand, K., MacDonald, S., Lock, K., Harrison, S., Janmohamed, A., Anis, A. H., Krausz, M., Marsh, D. C., & Schechter, M. T. (2016). Hydromorphone Compared With Diacetylmorphine for Long-term Opioid Dependence: A Randomized Clinical Trial. *JAMA Psychiatry*, *73*(5), 447–455. <https://doi.org/10.1001/JAMAPSYCHIATRY.2016.0109>
- Oxenkrug, G. (2013). Serotonin – kynurenine hypothesis of depression: historical overview and recent developments. *Current Drug Targets*, *14*(5), 514. <https://doi.org/10.2174/1389450111314050002>
- Ozaki, Y., Edelstein, M. P., & Duch, D. S. (1987). The actions of interferon and antiinflammatory agents of induction of indoleamine 2,3-dioxygenase in human peripheral blood monocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *144*(3), 1147–1153. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(87\)91431-8](https://doi.org/10.1016/0006-291X(87)91431-8)
- Panlilio, L. V., & Goldberg, S. R. (2007). Self-administration of drugs in animals and humans as a model and an investigative tool. *Addiction (Abingdon, England)*, *102*(12), 1863–1870. <https://doi.org/10.1111/J.1360-0443.2007.02011.X>
- Panlilio, L. V., & Schindler, C. W. (2000). Self-administration of remifentanyl, an ultra-short acting opioid, under continuous and progressive-ratio schedules of reinforcement in rats. *Psychopharmacology*, *150*(1), 61–66. <https://doi.org/10.1007/s002130000415>
- Parada, E., Egea, J., Buendia, I., Negrodo, P., Cunha, A. C., Cardoso, S., Soares, M. P., & López, M. G. (2013). The Microglial $\alpha 7$ -Acetylcholine Nicotinic Receptor Is a Key Element in Promoting Neuroprotection by Inducing Heme Oxygenase-1 via Nuclear Factor Erythroid-2-Related Factor 2. *Antioxidants & Redox Signaling*, *19*(11), 1135. <https://doi.org/10.1089/ARS.2012.4671>
- Pardo, B., Taylor, J., Caulkins, J. P. (Jonathan P., Kilmer, B., Reuter, P., Stein, B. D., & Rand Corporation. (2019). *The future of fentanyl and other synthetic opioids*.
- Park, J. H. (2022). Potential Inflammatory Biomarker in Patients with Attention Deficit Hyperactivity Disorder. *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 23, Issue 21). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/ijms232113054>
- Park, P. E., Schlosburg, J. E., Vendruscolo, L. F., Schulteis, G., Edwards, S., & Koob, G. F. (2015). Chronic CRF1 receptor blockade reduces heroin intake escalation and dependence-induced hyperalgesia. *Addiction Biology*, *20*(2), 275–284. <https://doi.org/10.1111/ADB.12120>
- Parker, D. C., Kraus, W. E., Whitson, H. E., Kraus, V. B., Smith, P. J., Cohen, H. J., Pieper, C. F., Faldowski, R. A., Hall, K. S., Huebner, J. L., Ilkayeva, O. R., Bain, J. R., Newby, L. K., & Huffman, K. M. (2023). Tryptophan Metabolism and Neurodegeneration: Longitudinal Associations of Kynurenine Pathway Metabolites with Cognitive Performance and Plasma Alzheimer’s Disease and Related Dementias Biomarkers in the Duke Physical Performance Across the LifeSpan Study. *Journal of Alzheimer’s Disease*, *91*(3), 1141–1150. <https://doi.org/10.3233/JAD-220906>
- Parrott, J. M., Redus, L., Santana-Coelho, D., Morales, J., Gao, X., & O’Connor, J. C. (2016). Neurotoxic kynurenine metabolism is increased in the dorsal hippocampus and drives distinct depressive behaviors during inflammation. *Translational Psychiatry*, *6*(10), e918. <https://doi.org/10.1038/TP.2016.200>
- Parsons, C. G., Danysz, W., Quack, G., Hartmann, S., Lorenz, B., Wollenburg, C., Baran, L., Przegalinski, E., Kostowski, W., Krzascik, P., Chizh, B., & Headley, P. M. (1997). Novel systemically active antagonists of the glycine site of the N- methyl-D-aspartate receptor: Electrophysiological, biochemical and behavioral characterization. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *283*(3), 1264–1275. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9400002/>
- Pathan, H., & Williams, J. (2012). Basic opioid pharmacology: an update. *British Journal of Pain*, *6*(1), 11. <https://doi.org/10.1177/2049463712438493>

- Patocka, J., Wu, W., Oleksak, P., Jelinkova, R., Nepovimova, E., Spicanova, L., Springerova, P., Alomar, S., Long, M., & Kuca, K. (2024). Fentanyl and its derivatives: Pain-killers or man-killers? *Heliyon*, *10*(8). <https://doi.org/10.1016/J.HELIYON.2024.E28795>
- Pattinson, K. T. S. (2008). Opioids and the control of respiration. *British Journal of Anaesthesia*, *100*(6), 747–758. <https://doi.org/10.1093/BJA/AEN094>
- Peng, J., Sarkar, S., & Chang, S. L. (2012). Opioid receptor expression in human brain and peripheral tissues using absolute quantitative real-time RT-PCR. *Drug and Alcohol Dependence*, *124*(3), 223. <https://doi.org/10.1016/J.DRUGALCDEP.2012.01.013>
- Perkins, M. N., & Stone, T. W. (1982). An iontophoretic investigation of the actions of convulsant kynurenes and their interaction with the endogenous excitant quinolinic acid. *Brain Research*, *247*(1), 184–187. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(82\)91048-4](https://doi.org/10.1016/0006-8993(82)91048-4)
- Pertin, M., Gosselin, R. D., & Decosterd, I. (2012). The spared nerve injury model of neuropathic pain. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, *851*, 205–212. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-561-9_15
- Peyrot, F., & Ducrocq, C. (2008). Potential role of tryptophan derivatives in stress responses characterized by the generation of reactive oxygen and nitrogen species. *Journal of Pineal Research*, *45*(3), 235–246. <https://doi.org/10.1111/J.1600-079X.2008.00580.X>
- Pfefferkorn, E. R., Rebhun, S., & Eckel, M. (1986). Characterization of an indoleamine 2,3-dioxygenase induced by gamma-interferon in cultured human fibroblasts. *Journal of Interferon Research*, *6*(3), 267–279. <https://doi.org/10.1089/JIR.1986.6.267>
- Pieroza, P., Zamoner, A., Krombauer Soska, Â., Bristot Silvestrin, R., Oliveira Loureiro, S., Heimfarth, L., Mello e Souza, T., Wajner, M., & Pessoa-Pureur, R. (2010). Acute intrastriatal administration of quinolinic acid provokes hyperphosphorylation of cytoskeletal intermediate filament proteins in astrocytes and neurons of rats. *Experimental Neurology*, *224*(1), 188–196. <https://doi.org/10.1016/J.EXPNEUROL.2010.03.009>
- Pineda-Farias, J. B., Pérez-Severiano, F., González-Esquivel, D. F., Barragán-Iglesias, P., Bravo-Hernández, M., Cervantes-Durán, C., Aguilera, P., Ríos, C., & Granados-Soto, V. (2013). The L-kynurenine-probenecid combination reduces neuropathic pain in rats. *European Journal of Pain (London, England)*, *17*(9), 1365–1373. <https://doi.org/10.1002/J.1532-2149.2013.00305.X>
- Pires, A. S., Sundaram, G., Heng, B., Krishnamurthy, S., Brew, B. J., & Guillemin, G. J. (2022). Recent advances in clinical trials targeting the kynurenine pathway. *Pharmacology and Therapeutics*, *236*, 108055. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2021.108055>
- Platten, M., Nollen, E. A. A., Röhrig, U. F., Fallarino, F., & Opitz, C. A. (2019). Tryptophan metabolism as a common therapeutic target in cancer, neurodegeneration and beyond. In *Nature Reviews Drug Discovery* (Vol. 18, Issue 5, pp. 379–401). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/s41573-019-0016-5>
- Pocivavsek, A., Wu, H. Q., Potter, M. C., Elmer, G. I., Pellicciari, R., & Schwarcz, R. (2011). Fluctuations in Endogenous Kynurenic Acid Control Hippocampal Glutamate and Memory. *Neuropsychopharmacology* *2011 36:11*, *36*(11), 2357–2367. <https://doi.org/10.1038/npp.2011.127>
- Pothos, E., Rada, P., Mark, G. P., & Hoebel, B. G. (1991). Dopamine microdialysis in the nucleus accumbens during acute and chronic morphine, naloxone-precipitated withdrawal and clonidine treatment. *Brain Research*, *566*(1–2), 348–350. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(91\)91724-F](https://doi.org/10.1016/0006-8993(91)91724-F)
- Pradeep Kumar Gupta, Laxmi Manral, Kumaran GanesanRamesh, Chandra Malhotra, & Krishnamurthy Sekhar. (2009). EP2252149A2 - A method for the preparation of fentanyl. <https://patents.google.com/patent/EP2252149A2/en>
- Price, D. D. (2000). Psychological and neural mechanisms of the affective dimension of pain. *Science (New York, N.Y.)*, *288*(5472), 1769–1772. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.288.5472.1769>
- Prusky, G. T., Harker, K. T., Douglas, R. M., & Wishaw, I. Q. (2002). Variation in visual acuity within pigmented, and between pigmented and albino rat strains. *Behavioural Brain Research*, *136*(2), 339–348. [https://doi.org/10.1016/S0166-4328\(02\)00126-2](https://doi.org/10.1016/S0166-4328(02)00126-2)
- Pulido, J., Sanchez-Niubo, A., Llorens, N., Hoyos, J., Barrio, G., Belza, M. J., Cea-Soriano, L., Angulo-Brunet, A., & Sordo, L. (2022). Estimating the Prevalence of Recreational Opioid Use in Spain Using a Multiplier Method. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, *19*(8). <https://doi.org/10.3390/IJERPH19084815>

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Rahman, A., Ting, K., Cullen, K. M., Braidy, N., Brew, B. J., & Guillemin, G. J. (2009). The Excitotoxin Quinolinic Acid Induces Tau Phosphorylation in Human Neurons. *PLOS ONE*, *4*(7), e6344. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0006344>
- Ramey, T., & Regier, P. S. (2019). Cognitive Impairment in Substance Use Disorders. *CNS Spectrums*, *24*(1), 102. <https://doi.org/10.1017/S1092852918001426>
- Ramirez Ortega, D., Ovalle Rodríguez, P., Pineda, B., González Esquivel, D. F., Ramos Chávez, L. A., Vázquez Cervantes, G. I., Roldán Roldán, G., Pérez de la Cruz, G., Díaz Ruiz, A., Méndez Armenta, M., Marcial Quino, J., Gómez Manzo, S., Ríos, C., & Pérez de la Cruz, V. (2020). Kynurenine Pathway as a New Target of Cognitive Impairment Induced by Lead Toxicity During the Lactation. *Scientific Reports*, *10*(1), 3184. <https://doi.org/10.1038/S41598-020-60159-3>
- Rashid, H., Inoue, M., Toda, K., & Ueda, H. (2004). Loss of Peripheral Morphine Analgesia Contributes to the Reduced Effectiveness of Systemic Morphine in Neuropathic Pain. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *309*(1), 380–387. <https://doi.org/10.1124/JPET.103.060582>
- Rasmussen, K. (1991). Afferent effects on locus coeruleus in opiate withdrawal. In *Progress in Brain Research* (Vol. 88, Issue C, pp. 207–216). [https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(08\)63810-8](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(08)63810-8)
- Rasmussen, K., White, D. A., & Acri, J. B. (2018). NIDA's medication development priorities in response to the Opioid Crisis: ten most wanted. *Neuropsychopharmacology* *2018* *44*:4, *44*(4), 657–659. <https://doi.org/10.1038/s41386-018-0292-5>
- Ren, M., & Lotfipour, S. (2022). Dose- and Sex-Dependent Bidirectional Relationship between Intravenous Fentanyl Self-Administration and Gut Microbiota. *Microorganisms*, *10*(6). <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS10061127>
- Resta, F., Masi, A., Sili, M., Laurino, A., Moroni, F., & Mannaioni, G. (2016). Kynurenic acid and zaprinast induce analgesia by modulating HCN channels through GPR35 activation. *Neuropharmacology*, *108*, 136–143. <https://doi.org/10.1016/J.NEUROPHARM.2016.04.038>
- Réus, G. Z., Becker, I. R. T., Scaini, G., Petronilho, F., Oses, J. P., Kaddurah-Daouk, R., Ceretta, L. B., Zugno, A. I., Dal-Pizzol, F., Quevedo, J., & Barichello, T. (2018). The inhibition of the kynurenine pathway prevents behavioral disturbances and oxidative stress in the brain of adult rats subjected to an animal model of schizophrenia. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, *81*, 55–63. <https://doi.org/10.1016/J.PNPBP.2017.10.009>
- Reyes Ocampo, J., Lugo Huitrón, R., González-Esquivel, D., Ugalde-Muñiz, P., Jiménez-Anguiano, A., Pineda, B., Pedraza-Chaverri, J., Ríos, C., & Pérez De La Cruz, V. (2014). Kynurenines with Neuroactive and Redox Properties: Relevance to Aging and Brain Diseases. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, *2014*(1), 646909. <https://doi.org/10.1155/2014/646909>
- Reynolds, D. S., & Morton, A. J. (1998). Changes in blood-brain barrier permeability following neurotoxic lesions of rat brain can be visualised with trypan blue. *Journal of Neuroscience Methods*, *79*(1), 115–121. [https://doi.org/10.1016/S0165-0270\(97\)00168-4](https://doi.org/10.1016/S0165-0270(97)00168-4)
- Richardson, N. R., & Roberts, D. C. S. (1996). Progressive ratio schedules in drug self-administration studies in rats: A method to evaluate reinforcing efficacy. *Journal of Neuroscience Methods*, *66*(1), 1–11. [https://doi.org/10.1016/0165-0270\(95\)00153-0](https://doi.org/10.1016/0165-0270(95)00153-0)
- Richter, A., & Hamann, M. (2003). The kynurenine 3-hydroxylase inhibitor Ro 61-8048 improves dystonia in a genetic model of paroxysmal dyskinesia. *European Journal of Pharmacology*, *478*(1), 47–52. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2003.08.038>
- Roberts-Wolfe, D. J., & Kalivas, P. W. (2015). Glutamate transporter GLT-1 as a therapeutic target for substance use disorders. *CNS & Neurological Disorders Drug Targets*, *14*(6), 745. <https://doi.org/10.2174/1871527314666150529144655>
- Robinson, T. E., & Berridge, K. C. (1993). The neural basis of drug craving: an incentive-sensitization theory of addiction. *Brain Research. Brain Research Reviews*, *18*(3), 247–291. [https://doi.org/10.1016/0165-0173\(93\)90013-P](https://doi.org/10.1016/0165-0173(93)90013-P)
- Robotka, H., Sas, K., Ágoston, M., Rózsa, É., Szénási, G., Gigler, G., Vécsei, L., & Toldi, J. (2008). Neuroprotection achieved in the ischaemic rat cortex with L-kynurenine sulphate. *Life Sciences*, *82*(17–18), 915–919. <https://doi.org/10.1016/J.LFS.2008.02.014>
- Rodríguez-Espinosa, S., Coloma-Carmona, A., Pérez-Carbonell, A., Román-Quiles, J. F., & Carballo, J. L. (2021). Clinical and psychological factors associated with interdose opioid withdrawal in chronic pain population. *Journal of Substance Abuse Treatment*, *129*. <https://doi.org/10.1016/J.JSAT.2021.108386>

- Rodríguez-Martínez, E., Camacho, A., Maldonado, P. D., Pedraza-Chaverri, J., Santamaría, D., Galván-Arzate, S., & Santamaría, A. (2000). Effect of quinolinic acid on endogenous antioxidants in rat corpus striatum. *Brain Research*, *858*(2), 436–439. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(99\)02474-9](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(99)02474-9)
- Rodríguez-Rivera, C., Girón, R., Sánchez-Robles, E., González-Martín, C., Goicoechea, C., & Alguacil, L. F. (2020). Sciatic Nerve Ligation Downregulates Mitochondrial Clusterin in the Rat Prefrontal Cortex. *Neuroscience*, *446*, 285–293. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2020.08.010>
- Rojewska, E., Ciapała, K., & Mika, J. (2019). Kynurenic acid and zaprinast diminished CXCL17-evoked pain-related behaviour and enhanced morphine analgesia in a mouse neuropathic pain model. *Pharmacological Reports : PR*, *71*(1), 139–148. <https://doi.org/10.1016/J.PHAREP.2018.10.002>
- Rojewska, E., Ciapała, K., Piotrowska, A., Makuch, W., & Mika, J. (2018). Pharmacological Inhibition of Indoleamine 2,3-Dioxygenase-2 and Kynurenine 3-Monooxygenase, Enzymes of the Kynurenine Pathway, Significantly Diminishes Neuropathic Pain in a Rat Model. *Frontiers in Pharmacology*, *9*(JUN). <https://doi.org/10.3389/FPHAR.2018.00724>
- Rojewska, E., Piotrowska, A., Jurga, A., Makuch, W., & Mika, J. (2018). Zaprinast diminished pain and enhanced opioid analgesia in a rat neuropathic pain model. *European Journal of Pharmacology*, *839*, 21–32. <https://doi.org/10.1016/J.EJPHAR.2018.09.001>
- Rojewska, E., Piotrowska, A., Makuch, W., Przewlocka, B., & Mika, J. (2016). Pharmacological kynurenine 3-monooxygenase enzyme inhibition significantly reduces neuropathic pain in a rat model. *Neuropharmacology*, *102*, 80–91. <https://doi.org/10.1016/J.NEUROPHARM.2015.10.040>
- Rossetti, Z. L., Hmaidan, Y., & Gessa, G. L. (1992). Marked inhibition of mesolimbic dopamine release: a common feature of ethanol, morphine, cocaine and amphetamine abstinence in rats. *European Journal of Pharmacology*, *221*(2–3), 227–234. [https://doi.org/10.1016/0014-2999\(92\)90706-A](https://doi.org/10.1016/0014-2999(92)90706-A)
- Rothhammer, V., Mascanfroni, I. D., Bunse, L., Takenaka, M. C., Kenison, J. E., Mayo, L., Chao, C. C., Patel, B., Yan, R., Blain, M., Alvarez, J. I., Kébir, H., Anandasabapathy, N., Izquierdo, G., Jung, S., Obholzer, N., Pochet, N., Clish, C. B., Prinz, M., ... Quintana, F. J. (2016). Type I interferons and microbial metabolites of tryptophan modulate astrocyte activity and central nervous system inflammation via the aryl hydrocarbon receptor. *Nature Medicine* *2016* *22*:6, *22*(6), 586–597. <https://doi.org/10.1038/nm.4106>
- Rothhammer, V., & Quintana, F. J. (2019). The aryl hydrocarbon receptor: an environmental sensor integrating immune responses in health and disease. In *Nature Reviews Immunology* (Vol. 19, Issue 3, pp. 184–197). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/s41577-019-0125-8>
- Röver, S., Cesura, A. M., Huguenin, P., Kettler, R., & Szenté, A. (1997). Synthesis and biochemical evaluation of N-(4-phenylthiazol-2-yl)benzenesulfonamides as high-affinity inhibitors of kynurenine 3-hydroxylase. *Journal of Medicinal Chemistry*, *40*(26), 4378–4385. <https://doi.org/10.1021/jm970467t>
- Samavati, R., Zádor, F., Szűcs, E., Tuka, B., Martos, D., Veres, G., Gáspár, R., Mándity, I. M., Fülöp, F., Vécsei, L., Benyhe, S., & Borsodi, A. (2017). Kynurenic acid and its analogue can alter the opioid receptor G-protein signaling after acute treatment via NMDA receptor in rat cortex and striatum. *Journal of the Neurological Sciences*, *376*, 63–70. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2017.02.053>
- Substance Abuse and Mental Health Services (SAMHSA). (2018). *Medications for Opioid Use Disorder*. Substance Abuse and Mental Health Services Administration (US). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK574910/>
- Salazar, A., Gonzalez-Rivera, B. L., Redus, L., Parrott, J. M., & O'Connor, J. C. (2012). Indoleamine 2,3-dioxygenase mediates anhedonia and anxiety-like behaviors caused by peripheral lipopolysaccharide immune challenge. *Hormones and Behavior*, *62*(3), 202–209. <https://doi.org/10.1016/J.YHBEH.2012.03.010>
- Sandi, D., Friczka-Nagy, Z., Bencsik, K., & Vécsei, L. (2021). Neurodegeneration in multiple sclerosis: Symptoms of silent progression, biomarkers and neuroprotective therapy—kynurenines are important players. In *Molecules* (Vol. 26, Issue 11). Molecules. <https://doi.org/10.3390/molecules26113423>
- Sanz-Clemente, A., Nicoll, R. A., & Roche, K. W. (2013). Diversity in NMDA receptor composition: many regulators, many consequences. *The Neuroscientist : A Review Journal Bringing Neurobiology, Neurology and Psychiatry*, *19*(1), 62. <https://doi.org/10.1177/1073858411435129>
- Sas, K., Robotka, H., Rózsa, É., Ágoston, M., Szénási, G., Gigler, G., Marosi, M., Kis, Z., Farkas, T., Vécsei, L., & Toldi, J. (2008). Kynurenine diminishes the ischemia-induced histological and electrophysiological deficits in the rat hippocampus. *Neurobiology of Disease*, *32*(2), 302–308. <https://doi.org/10.1016/J.NBD.2008.07.013>

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Saucier, R., Wolfe, D., & Dasgupta, N. (2018). Review of Case Narratives from Fatal Overdoses Associated with Injectable Naltrexone for Opioid Dependence. *Drug Safety*, 41(10), 981–988. <https://doi.org/10.1007/S40264-018-0653-3/FIGURES/4>
- Savitz, J. (2020). The Kynurenine Pathway: A Finger in Every Pie. *Molecular Psychiatry*, 25(1), 131. <https://doi.org/10.1038/S41380-019-0414-4>
- Schilström, B., Fagerquist, M. V., Zhang, X., Hertel, P., Panagis, G., Nomikos, G. G., & Svensson, T. H. (2000). Putative role of presynaptic $\alpha 7^*$ nicotinic receptors in nicotine stimulated increases of extracellular levels of glutamate and aspartate in the ventral tegmental area. *Synapse*, 38(4), 375–383. [https://doi.org/10.1002/1098-2396\(20001215\)38:4<375::AID-SYN2>3.0.CO;2-Y](https://doi.org/10.1002/1098-2396(20001215)38:4<375::AID-SYN2>3.0.CO;2-Y)
- Schlosburg, J. E., Whitfield, T. W., Park, P. E., Crawford, E. F., George, O., Vendruscolo, L. F., & Koob, G. F. (2013). Long-Term Antagonism of κ Opioid Receptors Prevents Escalation of and Increased Motivation for Heroin Intake. *The Journal of Neuroscience*, 33(49), 19384. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1979-13.2013>
- Schmidt, S. V., & Schultze, J. L. (2014). New insights into IDO biology in bacterial and viral infections. *Frontiers in Immunology*, 5(AUG), 1–12. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2014.00384/BIBTEX>
- Schulteis, G., Ahmed, S. H., Morse, A. C., Koob, G. F., & Everitt, B. J. (2000). Conditioning and opiate withdrawal. *Nature* 2000 405:6790, 405(6790), 1013–1014. <https://doi.org/10.1038/35016630>
- Schultz, W., Dayan, P., & Montague, P. R. (1997). A neural substrate of prediction and reward. *Science*, 275(5306), 1593–1599. <https://doi.org/10.1126/science.275.5306.1593>
- Schwarcz, R. (1993). Metabolism and function of brain kynurenines Neuroactive kynurenines. *Eur. J. Neurosci*, 361, 77–82.
- Schwarcz, R., Bruno, J. P., Muchowski, P. J., & Wu, H. Q. (2012). Kynurenines in the mammalian brain: When physiology meets pathology. In *Nature Reviews Neuroscience* (Vol. 13, Issue 7, pp. 465–477). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrn3257>
- Schwarcz, R., & Köhler, C. (1983). Differential vulnerability of central neurons of the rat to quinolinic acid. *Neuroscience Letters*, 38(1), 85–90. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(83\)90115-5](https://doi.org/10.1016/0304-3940(83)90115-5)
- Schwarcz, R., & Stone, T. W. (2017). The kynurenine pathway and the brain: Challenges, controversies and promises. *Neuropharmacology*, 112(Pt B), 237–247. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2016.08.003>
- Schwartz, E. K. C., De Aquino, J. P., & Sofuoglu, M. (2024). Glial modulators as novel therapeutics for comorbid pain and opioid use disorder. *British Journal of Clinical Pharmacology*. <https://doi.org/10.1111/BCP.16094>
- Schwieler, L., Trepici, A., Krzyzanowski, S., Hermansson, S., Granqvist, M., Piehl, F., Venckunas, T., Brazaitis, M., Kamandulis, S., Lindqvist, D., Jones, A. D., Erhardt, S., & Brundin, L. (2020). A novel, robust method for quantification of multiple kynurenine pathway metabolites in the cerebrospinal fluid. *Bioanalysis*, 12(6), 379–392. https://doi.org/10.4155/BIO-2019-0303/SUPPL_FILE/BIO-12-379-S1.DOCX
- Secci, M. E., Auber, A., Panlilio, L. V., Redhi, G. H., Thorndike, E. B., Schindler, C. W., Schwarcz, R., Goldberg, S. R., & Justinova, Z. (2017). Attenuating Nicotine Reinforcement and Relapse by Enhancing Endogenous Brain Levels of Kynurenic Acid in Rats and Squirrel Monkeys. *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 42(8), 1619–1629. <https://doi.org/10.1038/NPP.2017.21>
- Secci, M. E., Mascia, P., Sagheddu, C., Beggiano, S., Melis, M., Borelli, A. C., Tomasini, M. C., Panlilio, L. V., Schindler, C. W., Tanda, G., Ferré, S., Bradberry, C. W., Ferraro, L., Pistis, M., Goldberg, S. R., Schwarcz, R., & Justinova, Z. (2019). Astrocytic Mechanisms Involving Kynurenic Acid Control $\Delta 9$ -Tetrahydrocannabinol-Induced Increases in Glutamate Release in Brain Reward-Processing Areas. *Molecular Neurobiology*, 56(5), 3563–3575. <https://doi.org/10.1007/S12035-018-1319-Y>
- Sekine, A., Okamoto, M., Kanatani, Y., Sano, M., Shibata, K., & Fukuwatari, T. (2015). Amino acids inhibit kynurenic acid formation via suppression of kynurenine uptake or kynurenic acid synthesis in rat brain in vitro. *SpringerPlus*, 4(1). <https://doi.org/10.1186/S40064-015-0826-9>
- Semenova, S., Danysz, W., & Bessalov, A. (1999). Low-affinity NMDA receptor channel blockers inhibit acquisition of intravenous morphine self-administration in naive mice. *European Journal of Pharmacology*, 378(1), 1–8. [https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(99\)00431-8](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(99)00431-8)
- Shaham, Y., Shalev, U., Lu, L., De Wit, H., & Stewart, J. (2003). The reinstatement model of drug relapse: History, methodology and major findings. In *Psychopharmacology* (Vol. 168, Issues 1–2, pp. 3–20). Psychopharmacology (Berl). <https://doi.org/10.1007/s00213-002-1224-x>

- Sharma, V. K., Singh, T. G., Prabhakar, N. K., & Mannan, A. (2022). Kynurenine Metabolism and Alzheimer's Disease: The Potential Targets and Approaches. *Neurochemical Research* 2022 47:6, 47(6), 1459–1476. <https://doi.org/10.1007/S11064-022-03546-8>
- Shearer, D., Young, S., Fairbairn, N., & Brar, R. (2022). Challenges with buprenorphine inductions in the context of the fentanyl overdose crisis: A case series. *Drug and Alcohol Review*, 41(2), 444–448. <https://doi.org/10.1111/DAR.13394>
- Shen, H., Moussawi, K., Zhou, W., Toda, S., & Kalivas, P. W. (2011). Heroin relapse requires long-term potentiation-like plasticity mediated by NMDA2b-containing receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(48), 19407–19412. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1112052108>
- Shen, H. W., Scofield, M. D., Boger, H., Hensley, M., & Kalivas, P. W. (2014). Synaptic glutamate spillover due to impaired glutamate uptake mediates heroin relapse. *Journal of Neuroscience*, 34(16), 5649–5657. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4564-13.2014>
- Shepard, P. D., Joy, B., Clerkin, L., & Schwarcz, R. (2003). Micromolar Brain Levels of Kynurenic Acid are Associated with a Disruption of Auditory Sensory Gating in the Rat. *Neuropsychopharmacology* 2003 28:8, 28(8), 1454–1462. <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1300188>
- Shippenberg, T. S., Zapata, A., & Chefer, V. I. (2007). Dynorphin and the pathophysiology of drug addiction. *Pharmacology & Therapeutics*, 116(2), 306–321. <https://doi.org/10.1016/J.PHARMTHERA.2007.06.011>
- Siegfried. (n.d.). *Synthesis of Fentanyl*. Retrieved July 18, 2024, from <https://www.erowid.org/archive/rhodium/chemistry/fentanyl.html>
- Silva-Islas, C. A., Santana-Martínez, R. A., León-Contreras, J. C., Barrera-Oviedo, D., Pedraza-Chaverri, J., Hernández-Pando, R., & Maldonado, P. D. (2022). Quinolinic Acid Induces Alterations in Neuronal Subcellular Compartments, Blocks Autophagy Flux and Activates Necroptosis and Apoptosis in Rat Striatum. *Molecular Neurobiology*, 59(11), 6632–6651. <https://doi.org/10.1007/S12035-022-02986-1>
- Simms, J. A., Bito-Onon, J. J., Chatterjee, S., & Bartlett, S. E. (2010). Long-Evans Rats Acquire Operant Self-Administration of 20% Ethanol Without Sucrose Fading. *Neuropsychopharmacology* 2010 35:7, 35(7), 1453–1463. <https://doi.org/10.1038/npp.2010.15>
- Simon, R., Snow, R., & Wakeman, S. (2020). Understanding why patients with substance use disorders leave the hospital against medical advice: A qualitative study. *Substance Abuse*, 41(4), 519–525. <https://doi.org/10.1080/08897077.2019.1671942>
- Slosky, L. M., Pires, A., Bai, Y., Clark, N. B., Hauser, E. R., Gross, J. D., Porkka, F., Zhou, Y., Chen, X., Pogorelov, V. M., Toth, K., Wetsel, W. C., Barak, L. S., & Caron, M. G. (2022). Establishment of multi-stage intravenous self-administration paradigms in mice. *Scientific Reports* 2022 12:1, 12(1), 1–18. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-24740-2>
- Smith, A. C. W., Ghoshal, S., Centanni, S. W., Heyer, M. P., Corona, A., Wills, L., Andraka, E., Lei, Y., O'Connor, R. M., Caligiuri, S. P. B., Khan, S., Beaumont, K., Sebra, R. P., Kieffer, B. L., Winder, D. G., Ishikawa, M., & Kenny, P. J. (2024). A master regulator of opioid reward in ventral prefrontal cortex. *Science (New York, N.Y.)*, 384(6700), eadn0886. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.ADN0886>
- Smith, K. S., & Graybiel, A. M. (2016). Habit formation. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, 18(1), 33–43. <https://doi.org/10.4324/9781315009810-8>
- Smyth, B. P., Barry, J., Keenan, E., & Ducray, K. (2010). Lapse and relapse following inpatient treatment of opiate dependence. *Irish Medical Journal*, 103(6). <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20669601/>
- Socias, M. E., Wood, E., Dong, H., Brar, R., Bach, P., Murphy, S. M., & Fairbairn, N. (2020). Slow release oral morphine versus methadone for opioid use disorder in the fentanyl era (pRESTO): Protocol for a non-inferiority randomized clinical trial. *Contemporary Clinical Trials*, 91, 105993. <https://doi.org/10.1016/J.CCT.2020.105993>
- Solvang, S. E. H., Nordrehaug, J. E., Tell, G. S., Nygård, O., McCann, A., Ueland, P. M., Midttun, Ø., Meyer, K., Vedeler, C. A., Aarsland, D., Refsum, H., Smith, A. D., & Giil, L. M. (2019). The kynurenine pathway and cognitive performance in community-dwelling older adults. The Hordaland Health Study. *Brain, Behavior, and Immunity*, 75, 155–162. <https://doi.org/10.1016/J.BBI.2018.10.003>
- Song, C., Clark, S. M., Vaughn, C. N., Nicholson, J. D., Murphy, K. J., Mou, T. C. M., Schwarcz, R., Hoffman, G. E., & Tonelli, L. H. (2018). Quantitative analysis of kynurenine aminotransferase II in

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- the adult rat brain reveals high expression in proliferative zones and corpus callosum. *Neuroscience*, 369, 1. <https://doi.org/10.1016/J.NEUROSCIENCE.2017.11.001>
- Southern, W. N., Nahvi, S., & Arnsten, J. H. (2012). Increased risk of mortality and readmission among patients discharged against medical advice. *American Journal of Medicine*, 125(6), 594–602. <https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2011.12.017>
- Stanley, T. H. (2014). The fentanyl story. *Journal of Pain*, 15(12), 1215–1226. <https://doi.org/10.1016/j.jpain.2014.08.010>
- Št'astný, F., Škultétyová, I., Pliss, L., & Ježová, D. (2000). Quinolinic acid enhances permeability of rat brain microvessels to plasma albumin. *Brain Research Bulletin*, 53(4), 415–420. [https://doi.org/10.1016/S0361-9230\(00\)00368-3](https://doi.org/10.1016/S0361-9230(00)00368-3)
- Stoeber, M., Jullié, D., Lobingier, B. T., Laeremans, T., Steyaert, J., Schiller, P. W., Manglik, A., & von Zastrow, M. (2018). A genetically encoded biosensor reveals location bias of opioid drug action. *Neuron*, 98(5), 963. <https://doi.org/10.1016/J.NEURON.2018.04.021>
- Stone, A. C., Carroll, J. J., Rich, J. D., & Green, T. C. (2018). Methadone maintenance treatment among patients exposed to illicit fentanyl in Rhode Island: Safety, dose, retention, and relapse at 6 months. *Drug and Alcohol Dependence*, 192, 94. <https://doi.org/10.1016/J.DRUGALCDEP.2018.07.019>
- Stone, A. C., Carroll, J. J., Rich, J. D., & Green, T. C. (2020). One year of methadone maintenance treatment in a fentanyl endemic area: Safety, repeated exposure, retention, and remission. *Journal of Substance Abuse Treatment*, 115. <https://doi.org/10.1016/J.JSAT.2020.108031>
- Stone, T. W. (1993). Neuropharmacology of quinolinic and kynurenic acids. *Pharmacological Reviews*, 45(3), 309–379.
- Stone, T. W. (2020). Does kynurenic acid act on nicotinic receptors? An assessment of the evidence. *Journal of Neurochemistry*, 152(6), 627–649. <https://doi.org/10.1111/jnc.14907>
- Stone, T. W. (2021). Relationships and Interactions between Ionotropic Glutamate Receptors and Nicotinic Receptors in the CNS. *Neuroscience*, 468, 321–365. <https://doi.org/10.1016/J.NEUROSCIENCE.2021.06.007>
- Stone, T. W., Darlington, L. G., Badawy, A. A. B., & Williams, R. O. (2024). The Complex World of Kynurenic Acid: Reflections on Biological Issues and Therapeutic Strategy. *International Journal of Molecular Sciences* 2024, Vol. 25, Page 9040, 25(16), 9040. <https://doi.org/10.3390/IJMS25169040>
- Stone, T. W., Stoy, N., & Darlington, L. G. (2013). An expanding range of targets for kynurenine metabolites of tryptophan. In *Trends in Pharmacological Sciences* (Vol. 34, Issue 2, pp. 136–143). <https://doi.org/10.1016/j.tips.2012.09.006>
- Strang, J., Groshkova, T., Uchtenhagen, A., Van Den Brink, W., Haasen, C., Schechter, M. T., Lintzeris, N., Bell, J., Pirona, A., Oviedo-Joekes, E., Simon, R., & Metrebian, N. (2015). Heroin on trial: Systematic review and meta-analysis of randomised trials of diamorphine-prescribing as treatment for refractory heroin addiction. *The British Journal of Psychiatry*, 207(1), 5–14. <https://doi.org/10.1192/BJP.BP.114.149195>
- Strang, J., Volkow, N. D., Degenhardt, L., Hickman, M., Johnson, K., Koob, G. F., Marshall, B. D. L., Tyndall, M., & Walsh, S. L. (2020). Opioid use disorder. *Nature Reviews Disease Primers*, 6(1). <https://doi.org/10.1038/s41572-019-0137-5>
- Stuckenholz, V., Bacher, M., Balzer-Geldsetzer, M., Alvarez-Fischer, D., Oertel, W. H., Dodel, R. C., & Noeker, C. (2013). The $\alpha 7$ nAChR agonist PNU-282987 reduces inflammation and MPTP-induced nigral dopaminergic cell loss in mice. *Journal of Parkinson's Disease*, 3(2), 161–172. <https://doi.org/10.3233/JPD-120157>
- Subramanian, P., Prabhu, V., Kumar, J. S., Anuradha, M., & Ramachandran, A. S. (2024). Circulating biomarkers of upstream kynurenine pathway and brain-derived neurotrophic factor in the diagnosis of type 2 and gestational diabetes mellitus with depression. *Comparative Clinical Pathology*, 33(2), 247–255. <https://doi.org/10.1007/S00580-023-03546-2/FIGURES/1>
- Sullivan, M., Bisaga, A., Pavlicova, M., Choi, C. J., Mishlen, K., Carpenter, K. M., Levin, F. R., Dakwar, E., Mariani, J. J., & Nunes, E. V. (2017). Long-Acting Injectable Naltrexone Induction: A Randomized Trial of Outpatient Opioid Detoxification With Naltrexone Versus Buprenorphine. *The American Journal of Psychiatry*, 174(5), 459–467. <https://doi.org/10.1176/APPI.AJP.2016.16050548>
- Sun, A., Zhuang, D., Zhu, H., Lai, M., Chen, W., Liu, H., Zhang, F., & Zhou, W. (2015). Decrease of phosphorylated CREB and ERK in nucleus accumbens is associated with the incubation of heroin seeking induced by cues after withdrawal. *Neuroscience Letters*, 591, 166–170. <https://doi.org/10.1016/J.NEULET.2015.02.048>

- Sun, E. C., Dixit, A., Humphreys, K., Darnall, B. D., Baker, L. C., & MacKey, S. (2017). Association between concurrent use of prescription opioids and benzodiazepines and overdose: retrospective analysis. *BMJ (Clinical Research Ed.)*, *356*. <https://doi.org/10.1136/BMJ.J760>
- Sundaram, G., Sundaram, G., Lim, C. K., Brew, B. J., Brew, B. J., Brew, B. J., & Guillemin, G. J. (2020). Kynurenine pathway modulation reverses the experimental autoimmune encephalomyelitis mouse disease progression. *Journal of Neuroinflammation*, *17*(1). <https://doi.org/10.1186/s12974-020-01844-y>
- Suzuki, J., & El-Haddad, S. (2017). A review: Fentanyl and non-pharmaceutical fentanyls. In *Drug and Alcohol Dependence* (Vol. 171, pp. 107–116). Elsevier Ireland Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.drugalcdep.2016.11.033>
- Swiergiel, A. H., & Dunn, A. J. (2007). Effects of Interleukin-1 β and Lipopolysaccharide on Behavior of Mice in the Elevated Plus-Maze and Open Field Tests. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, *86*(4), 651. <https://doi.org/10.1016/J.PBB.2007.02.010>
- Tabanelli, R., Brogi, S., & Calderone, V. (2023). Targeting Opioid Receptors in Addiction and Drug Withdrawal: Where Are We Going? *International Journal of Molecular Sciences*, *24*(13). <https://doi.org/10.3390/IJMS241310888>
- Takeuchi, F., & Shibata, Y. (1984). Kynurenine metabolism in vitamin-B-6-deficient rat liver after tryptophan injection. *Biochemical Journal*, *220*(3), 693. <https://doi.org/10.1042/BJ2200693>
- Taleb, O., Maammar, M., Brumar, D., Bourguignon, J. J., Schmitt, M., Klein, C., Kemmel, V., Maitre, M., & Mensah-Nyagan, A. G. (2012). Xanthurenic Acid Binds to Neuronal G-Protein-Coupled Receptors That Secondarily Activate Cationic Channels in the Cell Line NCB-20. *PLOS ONE*, *7*(11), e48553. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0048553>
- Tavares, R. G., Tasca, C. I., Santos, C. E. S., Alves, L. B., Porciúncula, L. O., Emanuelli, T., & Souza, D. O. (2002). Quinolinic acid stimulates synaptosomal glutamate release and inhibits glutamate uptake into astrocytes. *Neurochemistry International*, *40*(7), 621–627. [https://doi.org/10.1016/S0197-0186\(01\)00133-4](https://doi.org/10.1016/S0197-0186(01)00133-4)
- Thomas, T., Stefanoni, D., Reisz, J. A., Nemkov, T., Bertolone, L., Francis, R. O., Hudson, K. E., Zimring, J. C., Hansen, K. C., Hod, E. A., Spitalnik, S. L., & D'Alessandro, A. (2020). COVID-19 infection alters kynurenine and fatty acid metabolism, correlating with IL-6 levels and renal status. *JCI Insight*, *5*(14). <https://doi.org/10.1172/JCI.INSIGHT.140327>
- Thomsen, M., & Caine, S. B. (2005). Chronic intravenous drug self-administration in rats and mice. *Current Protocols in Neuroscience / Editorial Board, Jacqueline N. Crawley ... [et Al.], Chapter 9*. <https://doi.org/10.1002/0471142301.ns0920s32>
- Tijet, N., Boutros, P. C., Moffat, I. D., Okey, A. B., Tuomisto, J., & Pohjanvirta, R. (2006). Aryl hydrocarbon receptor regulates distinct dioxin-dependent and dioxin-independent gene batteries. *Molecular Pharmacology*, *69*(1), 140–153. <https://doi.org/10.1124/MOL.105.018705>
- Ting, K. K., Brew, B. J., & Guillemin, G. J. (2009). Effect of quinolinic acid on human astrocytes morphology and functions: implications in Alzheimer's disease. *Journal of Neuroinflammation*, *6*, 36. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-6-36>
- Tomek, S. E., LaCrosse, A. L., Nemirovsky, N. E., & Foster Olive, M. (2013). NMDA Receptor Modulators in the Treatment of Drug Addiction. *Pharmaceuticals*, *6*(2), 251. <https://doi.org/10.3390/PH6020251>
- Török, N., Tanaka, M., & Vécsei, L. (2020). Searching for peripheral biomarkers in neurodegenerative diseases: The tryptophan-kynurenine metabolic pathway. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 21, Issue 24, pp. 1–24). Int J Mol Sci. <https://doi.org/10.3390/ijms21249338>
- Townsend, E. A., Negus, S. S., Caine, S. B., Thomsen, M., & Banks, M. L. (2019). Sex differences in opioid reinforcement under a fentanyl vs. food choice procedure in rats. *Neuropsychopharmacology*, *44*(12), 2022–2029. <https://doi.org/10.1038/s41386-019-0356-1>
- Townsend, E. A., Schwientek, K. L., Robinson, H. L., Lawson, S. T., & Banks, M. L. (2021). A drug-vs-food “choice” self-administration procedure in rats to investigate pharmacological and environmental mechanisms of substance use disorders. *Journal of Neuroscience Methods*, *354*, 109110. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2021.109110>
- Trepci, A., Imbeault, S., Wyckelsma, V. L., Westerblad, H., Hermansson, S., Andersson, D. C., Piehl, F., Venckunas, T., Brazaitis, M., Kamandulis, S., Brundin, L., Erhardt, S., & Schwieler, L. (2020). Quantification of Plasma Kynurenine Metabolites Following One Bout of Sprint Interval Exercise. *International Journal of Tryptophan Research : IJTR*, *13*. <https://doi.org/10.1177/1178646920978241>

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Trepci, A., Sellgren, C. M., Pålsson, E., Brundin, L., Khanlarkhani, N., Schwieler, L., Landén, M., & Erhardt, S. (2021). Central levels of tryptophan metabolites in subjects with bipolar disorder. *European Neuropsychopharmacology: The Journal of the European College of Neuropsychopharmacology*, *43*, 52–62. <https://doi.org/10.1016/J.EURONEURO.2020.11.018>
- Trujillo, K. A., & Akil, H. (1991). Inhibition of Morphine Tolerance and Dependence by the NMDA Receptor Antagonist MK-801. *Science*, *251*(4989), 85–87. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1824728>
- Tsang, V. W. L., Wong, J. S. H., Westenberg, J. N., Ramadhan, N. H., Fadakar, H., Nikoo, M., Li, V. W., Mathew, N., Azar, P., Jang, K. L., & Krausz, R. M. (2024). Systematic review on intentional non-medical fentanyl use among people who use drugs. *Frontiers in Psychiatry*, *15*, 1347678. <https://doi.org/10.3389/FPSYT.2024.1347678/BIBTEX>
- Tutakhail, A., Boulet, L., Khabil, S., Nazari, Q. A., Hamid, H., & Coudoré, F. (2020). Neuropathology of Kynurenine Pathway of Tryptophan Metabolism. *Current Pharmacology Reports*, *6*(1), 8–23. <https://doi.org/10.1007/S40495-019-00208-2/TABLES/2>
- Ucha, M., Coria, S. M., Núñez, A. E., Santos-Toscano, R., Roura-Martínez, D., Fernández-Ruiz, J., Higuera-Matas, A., & Ambrosio, E. (2019). Morphine self-administration alters the expression of translational machinery genes in the amygdala of male Lewis rats. *Journal of Psychopharmacology*, *33*(7), 882–893. <https://doi.org/10.1177/0269881119836206>
- Ueland, H. O., Ulvik, A., Løvås, K., Wolff, A. S. B., Breivik, L. E., Stokland, A. E. M., Rødahl, E., Nilsen, R. M., Husebye, E., & Ueland, G. Å. (2023). Systemic Activation of the Kynurenine Pathway in Graves Disease With and Without Ophthalmopathy. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, *108*(6), 1290–1297. <https://doi.org/10.1210/clinem/dgad004>
- Ungless, M. A., Whistler, J. L., Malenka, R. C., & Bonci, A. (2001). Single cocaine exposure in vivo induces long-term potentiation in dopamine neurons. *Nature*, *411*(6837), 583–587. <https://doi.org/10.1038/35079077>
- United Nations Office on Drugs and Crime (UNODC). (2020). *Expansión del mercado de drogas sintéticas – Consecuencias en el control de precursores*. https://www.unodc.org/documents/scientific/Global_SMART_23_ES.pdf
- Upadhyay, J., Maleki, N., Potter, J., Elman, I., Rudrauf, D., Knudsen, J., Wallin, D., Pendse, G., McDonald, L., Griffin, M., Anderson, J., Nutile, L., Renshaw, P., Weiss, R., Becerra, L., & Borsook, D. (2010). Alterations in brain structure and functional connectivity in prescription opioid-dependent patients. *Brain*, *133*(7), 2098–2114. <https://doi.org/10.1093/BRAIN/AWQ138>
- Urbanik, L. A., Acharya, N. K., & Grigson, P. S. (2022). Acute treatment with the glucagon-like peptide-1 receptor agonist, liraglutide, reduces cue- and drug-induced fentanyl seeking in rats. *Brain Research Bulletin*, *189*, 155–162. <https://doi.org/10.1016/J.BRAINRESBULL.2022.08.023>
- Uwai, Y., & Honjo, E. (2013). Transport of xanthurenic acid by rat/human organic anion transporters OAT1 and OAT3. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, *77*(7), 1517–1521. <https://doi.org/10.1271/BBB.130178>
- Uwai, Y., Honjo, H., & Iwamoto, K. (2012). Interaction and transport of kynurenic acid via human organic anion transporters hOAT1 and hOAT3. *Pharmacological Research*, *65*(2), 254–260. <https://doi.org/10.1016/J.PHRS.2011.11.003>
- Valdez, C. A., Leif, R. N., & Mayer, B. P. (2014). An Efficient, Optimized Synthesis of Fentanyl and Related Analogs. *PLOS ONE*, *9*(9), e108250. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0108250>
- Valentino, R. J., & Volkow, N. D. (2018). Untangling the complexity of opioid receptor function. *Neuropsychopharmacology* *2018* *43*:13, *43*(13), 2514–2520. <https://doi.org/10.1038/s41386-018-0225-3>
- Van Hecke, O., Austin, S. K., Khan, R. A., Smith, B. H., & Torrance, N. (2014). Neuropathic pain in the general population: a systematic review of epidemiological studies. *Pain*, *155*(4), 654–662. <https://doi.org/10.1016/J.PAIN.2013.11.013>
- Vanderschuren, L. J. M. J., Di Ciano, P., & Everitt, B. J. (2005). Involvement of the dorsal striatum in cue-controlled cocaine seeking. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *25*(38), 8665–8670. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0925-05.2005>
- Vécsei, L., & Beal, M. F. (1990). Influence of kynurenine treatment on open-field activity, elevated plus-maze, avoidance behaviors and seizures in rats. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, *37*(1), 71–76. [https://doi.org/10.1016/0091-3057\(90\)90043-H](https://doi.org/10.1016/0091-3057(90)90043-H)

- Vengeliene, V., Cannella, N., Takahashi, T., & Spanagel, R. (2016). Metabolic shift of the kynurenine pathway impairs alcohol and cocaine seeking and relapse. *Psychopharmacology*, 233(18), 3449–3459. <https://doi.org/10.1007/s00213-016-4384-9>
- Vera-Portocarrero, L. P., Ossipov, M. H., Lai, J., King, T., & Porreca, F. (2011). Descending Facilitatory Pathways from the Rostroventromedial Medulla Mediate Naloxone-Precipitated Withdrawal in Morphine-Dependent Rats. *The Journal of Pain*, 12(6), 667–676. <https://doi.org/10.1016/J.JPAIN.2010.12.007>
- Verjee, Z. H. M. (1971). Tryptopthan metabolism in baboons: effect of riboflavin and pyridoxine deficiency. *International Journal of Biochemistry*, 2(12), 711–718. [https://doi.org/10.1016/0020-711X\(71\)90065-6](https://doi.org/10.1016/0020-711X(71)90065-6)
- Voigt, R. M., Riddle, J. L., & Napier, T. C. (2014a). Effect of fendiline on the maintenance and expression of methamphetamine-induced conditioned place preference in Sprague-Dawley rats. *Psychopharmacology*, 231(9), 2019–2029. <https://doi.org/10.1007/S00213-013-3347-7>
- Volkow, N. D. (2024). *To address the fentanyl crisis, greater access to methadone is needed* | National Institute on Drug Abuse (NIDA). <https://nida.nih.gov/about-nida/noras-blog/2024/07/to-address-the-fentanyl-crisis-greater-access-to-methadone-is-needed>
- Volkow, N. D., & Blanco, C. (2023). Fentanyl and Other Opioid Use Disorders: Treatment and Research Needs. *https://Doi.Org/10.1176/Appi.Ajp.20230273*, 180(6), 410–417. <https://doi.org/10.1176/APPI.AJP.20230273>
- Volkow, N. D., & Morales, M. (2015). The Brain on Drugs: From Reward to Addiction. *Cell*, 162(4), 712–725. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2015.07.046>
- Volkow, N. D., Tomasi, D., Wang, G. J., Logan, J., Alexoff, D. L., Jayne, M., Fowler, J. S., Wong, C., Yin, P., & Du, C. (2014). Stimulant-induced dopamine increases are markedly blunted in active cocaine abusers. *Molecular Psychiatry*, 19(9), 1037–1043. <https://doi.org/10.1038/MP.2014.58>
- Volkow, N. D., Wang, G. J., Fowler, J. S., Hitzemann, R., Angrist, B., Gatley, S. J., Logan, J., Ding, Y. S., & Pappas, N. (1999). Association of methylphenidate-induced craving with changes in right striato-orbitofrontal metabolism in cocaine abusers: implications in addiction. *The American Journal of Psychiatry*, 156(1), 19–26. <https://doi.org/10.1176/AJP.156.1.19>
- Volkow, N. D., Wang, G. J., Fowler, J. S., & Telang, F. (2008). Overlapping neuronal circuits in addiction and obesity: evidence of systems pathology. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 363(1507), 3191–3200. <https://doi.org/10.1098/RSTB.2008.0107>
- Volkow, N. D., Wang, G. J., Fowler, J. S., Tomasi, D., & Telang, F. (2011). Addiction: Beyond dopamine reward circuitry. In *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (Vol. 108, Issue 37, pp. 15037–15042). National Academy of Sciences. <https://doi.org/10.1073/pnas.1010654108>
- Vos, T., Abajobir, A. A., Abbafati, C., Abbas, K. M., Abate, K. H., Abd-Allah, F., Abdulle, A. M., Abebo, T. A., Abera, S. F., Aboyans, V., Abu-Raddad, L. J., Ackerman, I. N., Adamu, A. A., Adetokunboh, O., Afarideh, M., Afshin, A., Agarwal, S. K., Aggarwal, R., Agrawal, A., ... Murray, C. J. L. (2017). Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 328 diseases and injuries for 195 countries, 1990–2016: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *The Lancet*, 390(10100), 1211–1259. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)32154-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)32154-2)
- Walker, A. K., Wing, E. E., Banks, W. A., & Dantzer, R. (2019). Leucine competes with kynurenine for blood-to-brain transport and prevents lipopolysaccharide-induced depression-like behavior in mice. *Molecular Psychiatry*, 24(10), 1523. <https://doi.org/10.1038/S41380-018-0076-7>
- Wallace, M., White, A., Grako, K. A., Lane, R., Cato, A. (Jo), & Snodgrass, H. R. (2017). Randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-escalation study: Investigation of the safety, pharmacokinetics, and antihyperalgesic activity of 1-4-chlorokynurenine in healthy volunteers. *Scandinavian Journal of Pain*, 17, 243–251. <https://doi.org/10.1016/J.SJPAIN.2017.05.004>
- Walsh, S. L., Strain, E. C., & Bigelow, G. E. (2003). Evaluation of the effects of lofexidine and clonidine on naloxone-precipitated withdrawal in opioid-dependent humans. *Addiction (Abingdon, England)*, 98(4), 427–439. <https://doi.org/10.1046/J.1360-0443.2003.00372.X>
- Wang, G. J., Volkow, N. D., Fowler, J. S., Logan, J., Abumrad, N. N., Hitzemann, R. J., Pappas, N. S., & Pascani, K. (1997). Dopamine D2 receptor availability in opiate-dependent subjects before and after naloxone-precipitated withdrawal. *Neuropsychopharmacology*, 16(2), 174–182. [https://doi.org/10.1016/S0893-133X\(96\)00184-4](https://doi.org/10.1016/S0893-133X(96)00184-4)

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Wang, J., Li, M., Wang, P., Zha, Y., He, Z., & Li, Z. (2017). Inhibition of the lateral habenular CaMKII abolishes naloxone-precipitated conditioned place aversion in morphine-dependent mice. *Neuroscience Letters*, 653, 64–70. <https://doi.org/10.1016/J.NEULET.2017.05.027>
- Wang, J., Simonavicius, N., Wu, X., Swaminath, G., Reagan, J., Tian, H., & Ling, L. (2006). Kynurenic acid as a ligand for orphan G protein-coupled receptor GPR35. *The Journal of Biological Chemistry*, 281(31), 22021–22028. <https://doi.org/10.1074/JBC.M603503200>
- Wang, T. Y., Lee, S. Y., Hu, M. C., Chen, S. L., Chang, Y. H., Chu, C. H., Lin, S. H., Li, C. L., Wang, L. J., Chen, P. S., Chen, S. H., Huang, S. Y., Tzeng, N. S., Lee, I. H., Chen, K. C., Yang, Y. K., Hong, J. S., & Lu, R. B. (2017). More inflammation but less brain-derived neurotrophic factor in antisocial personality disorder. *Psychoneuroendocrinology*, 85, 42–48. <https://doi.org/10.1016/J.PSYNEUEN.2017.08.006>
- Wang, X., Loram, L. C., Ramos, K., De Jesus, A. J., Thomas, J., Cheng, K., Reddy, A., Somogyi, A. A., Hutchinson, M. R., Watkins, L. R., & Yin, H. (2012). Morphine activates neuroinflammation in a manner parallel to endotoxin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(16), 6325–6330. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1200130109>
- Watanabe, T., Nakagawa, T., Yamamoto, R., Maeda, A., Minami, M., & Satoh, M. (2003). Involvement of noradrenergic system within the central nucleus of the amygdala in naloxone-precipitated morphine withdrawal-induced conditioned place aversion in rats. *Psychopharmacology*, 170(1), 80–88. <https://doi.org/10.1007/S00213-003-1504-0>
- Wedam, E. F., Bigelow, G. E., Johnson, R. E., Nuzzo, P. A., & Haigney, M. C. P. (2007). QT-Interval Effects of Methadone, Levomethadyl, and Buprenorphine in a Randomized Trial. *Archives of Internal Medicine*, 167(22), 2469–2475. <https://doi.org/10.1001/ARCHINTE.167.22.2469>
- Welford, R. W. D., Vercauteren, M., Trébaul, A., Cattaneo, C., Eckert, D., Garzotti, M., Sieber, P., Segrestaa, J., Studer, R., Groenen, P. M. A., & Nayler, O. (2016). Serotonin biosynthesis as a predictive marker of serotonin pharmacodynamics and disease-induced dysregulation. *Scientific Reports 2016 6:1*, 6(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/srep30059>
- White, J. M., & Irvine, R. J. (1999). Mechanisms of fatal opioid overdose. *Addiction*, 94(7), 961–972. <https://doi.org/10.1046/J.1360-0443.1999.9479612.X>
- Wickström, R., Fowler, Å., Goiny, M., Millischer, V., Ygberg, S., & Schwieler, L. (2021). The Kynurenic Pathway is Differentially Activated in Children with Lyme Disease and Tick-Borne Encephalitis. *Microorganisms*, 9(2), 1–11. <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS9020322>
- Wise, R. A., & Rompre, P. P. (1989). Brain dopamine and reward. *Annual Review of Psychology*, 40, 191–225. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.PS.40.020189.001203>
- Wolf, M. E., & Ferrario, C. R. (2010). AMPA receptor plasticity in the nucleus accumbens after repeated exposure to cocaine. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 35(2), 185. <https://doi.org/10.1016/J.NEUBIOREV.2010.01.013>
- Wright, V. L., Georgiou, P., Bailey, A., Heal, D. J., Bailey, C. P., & Wonnacott, S. (2019). Inhibition of alpha7 nicotinic receptors in the ventral hippocampus selectively attenuates reinstatement of morphine-conditioned place preference and associated changes in AMPA receptor binding. *Addiction Biology*, 24(4), 590–603. <https://doi.org/10.1111/ADB.12624>
- Wu, W., Bush, K. T., & Nigam, S. K. (2017). Key Role for the Organic Anion Transporters, OAT1 and OAT3, in the in vivo Handling of Uremic Toxins and Solutes. *Scientific Reports*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/S41598-017-04949-2>
- Yashiro, K., & Philpot, B. D. (2008). Regulation of NMDA receptor subunit expression and its implications for LTD, LTP, and metaplasticity. *Neuropharmacology*, 55(7), 1081–1094. <https://doi.org/10.1016/J.NEUROPHARM.2008.07.046>
- Yi, H., Iida, T., Liu, S., Ikegami, D., Liu, Q., Iida, A., Lubarsky, D. A., & Hao, S. (2017). IL-4 mediated by HSV vector suppresses morphine withdrawal response and decreases TNF α , NR2B, and pC/EBP β in the periaqueductal gray in rats. *Gene Therapy 2017 24:4*, 24(4), 224–233. <https://doi.org/10.1038/gt.2017.11>
- Yong, R. J., Mullins, P. M., & Bhattacharyya, N. (2022). Prevalence of chronic pain among adults in the United States. *Pain*, 163(2), E328–E332. <https://doi.org/10.1097/J.PAIN.0000000000002291>
- You, Z. B., Bi, G. H., Galaj, E., Kumar, V., Cao, J., Gadiano, A., Rais, R., Slusher, B. S., Gardner, E. L., Xi, Z. X., & Newman, A. H. (2019). Dopamine D3R antagonist VK4-116 attenuates oxycodone self-administration and reinstatement without compromising its antinociceptive effects. *Neuropsychopharmacology*, 44(8), 1415–1424. <https://doi.org/10.1038/s41386-018-0284-5>

- Yu, P., Prospero, N. A. Di, Sapko, M. T., Cai, T., Chen, A., Melendez-Ferro, M., Du, F., William O. Whetsell, Jr., Guidetti, P., Schwarcz, R., & Tagle, D. A. (2004). Biochemical and Phenotypic Abnormalities in Kynurenine Aminotransferase II-Deficient Mice. *Molecular and Cellular Biology*, *24*(16), 6919. <https://doi.org/10.1128/MCB.24.16.6919-6930.2004>
- Yue, K., Kopajtic, T. A., & Katz, J. L. (2018). Abuse liability of mitragynine assessed with a self-administration procedure in rats. *Psychopharmacology*, *235*(10), 2823–2829. <https://doi.org/10.1007/S00213-018-4974-9/FIGURES/2>
- Zador, F., Samavati, R., Szlavicz, E., Tuka, B., Bojnik, E., Fulop, F., Toldi, J., Vecsei, L., & Borsodi, A. (2014). Inhibition of opioid receptor mediated G-protein activity after chronic administration of kynurenic acid and its derivative without direct binding to opioid receptors. *CNS & Neurological Disorders Drug Targets*, *13*(9), 1520–1529. <https://doi.org/10.2174/1871527314666141205164114>
- Zaitsu, K., Miyawaki, I., Bando, K., Horie, H., Shima, N., Katagi, M., Tatsuno, M., Bamba, T., Sato, T., Ishii, A., Tsuchihashi, H., Suzuki, K., & Fukusaki, E. (2014). Metabolic profiling of urine and blood plasma in rat models of drug addiction on the basis of morphine, methamphetamine, and cocaine-induced conditioned place preference. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *406*(5), 1339–1354. <https://doi.org/10.1007/S00216-013-7234-1>
- Zakhary, G., Sherchan, P., Li, Q., Tang, J., & Zhang, J. H. (2020). Modification of kynurenine pathway via inhibition of kynurenine hydroxylase attenuates surgical brain injury complications in a male rat model. *Journal of Neuroscience Research*, *98*(1), 155–167. <https://doi.org/10.1002/JNR.24489>
- Zanni, G., DeSalle, M. J., Deutsch, H. M., Barr, G. A., & Eisch, A. J. (2020). Female and male rats readily consume and prefer oxycodone to water in a chronic, continuous access, two-bottle oral voluntary paradigm. *Neuropharmacology*, *167*(September 2019), 107978. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2020.107978>
- Zappettini, S., Grilli, M., Olivero, G., Chen, J., Padolecchia, C., Pittaluga, A., Tomé, A. R., Cunha, R. A., & Marchi, M. (2014). Nicotinic $\alpha 7$ receptor activation selectively potentiates the function of NMDA receptors in glutamatergic terminals of the nucleus accumbens. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *8*(OCT), 111090. <https://doi.org/10.3389/FNCEL.2014.00332>
- Zhan, J., Jordan, C. J., Bi, G. hua, He, X. hu, Gardner, E. L., Wang, Y. L., & Xi, Z. X. (2018). Neuropharmacology genetic deletion of the dopamine D3 receptor increases vulnerability to heroin in mice. *Neuropharmacology*, *141*, 11–20. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2018.08.016>
- Zhang, P., Huang, H., Gao, X., Jiang, J., Xi, C., Wu, L., Fu, Y., Lai, J., & Hu, S. (2021). Involvement of Kynurenine Metabolism in Bipolar Disorder: An Updated Review. *Frontiers in Psychiatry*, *12*, 677039. <https://doi.org/10.3389/FPSYT.2021.677039>
- Zhang, S., Collier, M. E. W., Heyes, D. J., Giorgini, F., & Scrutton, N. S. (2021). Advantages of brain penetrating inhibitors of kynurenine-3-monooxygenase for treatment of neurodegenerative diseases. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *697*, 108702. <https://doi.org/10.1016/J.ABB.2020.108702>
- Zheng, X., Zhang, A., Binnie, M., McGuire, K., Webster, S. P., Hughes, J., Howie, S. E. M., & Mole, D. J. (2019). Kynurenine 3-monooxygenase is a critical regulator of renal ischemia-reperfusion injury. *Experimental & Molecular Medicine*, *51*(2). <https://doi.org/10.1038/S12276-019-0210-X>
- Zhu, H., Zhuang, D., Lou, Z., Lai, M., Fu, D., Hong, Q., Liu, H., & Zhou, W. (2021). Akt and its phosphorylation in nucleus accumbens mediate heroin-seeking behavior induced by cues in rats. *Addiction Biology*, e13013. <https://doi.org/10.1111/adb.13013>
- Zong, L., Ge, M., Wang, J., Kuang, D., Wei, H., Wang, Z., Hu, Z., Zhao, C., Jin, Q., Chen, M., & Wang, C. (2024). Causal association between kynurenine and depression investigated using two-sample mendelian randomization. *Scientific Reports 2024 14:1*, *14*(1), 1–7. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-52442-4>
- Zunszain, P. A., Anacker, C., Cattaneo, A., Choudhury, S., Musaelyan, K., Myint, A. M., Thuret, S., Price, J., & Pariante, C. M. (2012). Interleukin-1 β : a new regulator of the kynurenine pathway affecting human hippocampal neurogenesis. *Neuropsychopharmacology : Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, *37*(4), 939–949. <https://doi.org/10.1038/NPP.2011.277>
- Zweifel, L. S., Parker, J. G., Lobb, C. J., Rainwater, A., Wall, V., Fadok, J. P., Darvas, M., Kim, M. J., Mizumori, S. J. Y., Paladini, C. A., Phillips, P. E. M., & Palmiter, R. D. (2009). Disruption of NMDAR-dependent burst firing by dopamine neurons provides selective assessment of phasic dopamine-dependent behavior. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *106*(18), 7281–7288. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0813415106>

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Zwilling, D., Huang, S. Y., Sathyaikumar, K. V., Notarangelo, F. M., Guidetti, P., Wu, H. Q., Lee, J., Truong, J., Andrews-Zwilling, Y., Hsieh, E. W., Louie, J. Y., Wu, T., Scearce-Levie, K., Patrick, C., Adame, A., Giorgini, F., Moussaoui, S., Laue, G., Rassoulpour, A., ... Muchowski, P. J. (2011). Kynurenine 3-monooxygenase inhibition in blood ameliorates neurodegeneration. *Cell*, *145*(6), 863. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2011.05.020>

