

BASES MOLECULARES DA TOLERÂNCIA AOS OPIÓIDES

Inês Nunes*, Carla Santos** e M. Soares Fortunato***

Resumo

Apesar dos opióides serem amplamente utilizados, de forma eficaz, no tratamento da dor, também causam intensa dependência.

Este trabalho foca as alterações adaptativas que ocorrem nas funções celular e sináptica, induzidas pelo tratamento crónico com opióides. Os passos iniciais da acção opióide são mediados pela activação de receptores acoplados a proteínas G. Os receptores opióides, tal como outros receptores acoplados a proteínas G, activam e regulam múltiplas vias de segundos mensageiros associadas ao acoplamento de efectores, ao tráfego de receptores e à sinalização nuclear. Estes mecanismos são críticos para a compreensão dos eventos iniciais que conduzem à tolerância e à dependência aos opióides.

A compreensão clara dos mecanismos moleculares da tolerância e dependência opióides ajudará a melhorar o tratamento de pacientes com dor aguda ou crónica, ou a recuperação de toxicodependentes.

Palavras-chave: *Opióides; Dependência; Receptores opióides; Dessensibilização; Regulação negativa; Regulação positiva; Supersensibilização.*

I. INTRODUÇÃO

A exposição prolongada a opióides resulta frequentemente da sua aplicação clínica ou do seu abuso. Apesar dos opióides serem eficazmente utilizados no tratamento da dor, são igualmente causadores de intensa dependência.

Nas últimas três décadas, foram desenvolvidas investigações dinâmicas utilizando ligandos, linhagens celulares e modelos animais diferentes, concluindo-se que realmente existe uma correlação entre os eventos bioquímicos e as alterações de comportamento que resultam da tolerância e dependência aos opióides.

As repetidas administrações de substâncias opióides geram mecanismos adaptativos como resultado de alterações a curto e médio prazo que ocorrem nos neurónios sensíveis aos opióides e em redes neuronais. Um desses mecanismos é o desenvolvimento de tolerância às substâncias opióides, culminando na necessidade de ingestão de doses mais elevadas para a obtenção do mesmo efeito.

* Aluna da FMUP, Faculdade de Medicina da Universidade do Porto.

** Assistente de Fisiologia FMUP.

*** Regente de Fisiologia FMUP.

As alterações a longo prazo, induzidas por tratamento opióide crônico, são expressas na ausência da ingestão da substância opióide em questão, indicando adaptações de longa duração no funcionamento de sistemas neuronais específicos. É intrigante que os mecanismos que parecem ser responsáveis por estes processos adaptativos, sejam remanescentes dos mecanismos envolvidos na plasticidade “normal”, como a *long-term potentiation* (LTP) e a *long-term depression* (LTD), que se pensa estarem na base da memória celular.

Os passos iniciais da acção opióide são mediados pela activação de receptores ligados a Proteínas G. Tal como todos os receptores ligados a proteínas G, os receptores opióides activam e regulam múltiplas vias de segundos mensageiros, em associação com o acoplamento de efectores, o tráfego de receptores e a sinalização nuclear. Estes passos iniciais são críticos para a compreensão dos eventos precoces que levam à tolerância e dependência opióides.

A activação de receptores opióides em células virgens leva à inibição neuronal, causada por múltiplos efectores, incluindo a inibição da adenil-ciclase (AC) e dos canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem, assim como a estimulação de canais rectificadores do influxo de K^+ .

Em modelos celulares, a exposição crónica a agonistas opióides resulta em inúmeras alterações adaptativas como: regulação negativa (*down-regulation*) dos receptores opióides, internalização e desacoplamento das proteínas G inibitórias. Estes processos parecem estar relacionados com a dessensibilização dos receptores opióides. Outra resposta adaptativa à exposição sustentada a opióides é a super-

sensibilização do sistema de transdução de sinal dependente do AMPc. Estas alterações adaptativas contribuem para as manifestações clínicas da tolerância e dependência opióides.

As adaptações celular e molecular que se seguem a longas exposições a opióides resultam da fosforilação de proteínas de receptores opióides, suas proteínas G acopladas e inúmeras proteínas efectoras com elas relacionadas. As enzimas que produzem estes efeitos incluem cínases dependentes de segundos mensageiros (Proteína cínase C- PKC; Proteína cínase dependente do AMPc- PKA; Proteína cínase dependente do cálcio/calmodulina II- CaMKII; Cínases receptoras acopladas a Proteínas G- GRKs e Proteína cínase activada pelos mitogénios- MAPKs), que desempenham importantes papéis na regulação da transdução do sinal opióide (Quadro 1).

QUADRO 1 - ADAPTAÇÕES CELULARES INDUZIDAS PELO TRATAMENTO CRÔNICO COM OPIÓIDES

- A) Dessensibilização dos receptores opióides
- B) *Up-regulation* da via do AMPc
- C) *AMPC response element-binding protein* (CREB)
- D) Supersensibilização da Adenil-ciclase
- E) Acoplamento de Proteínas G Excitatórias aos receptores opióides
- F) Efeitos dos Sistemas Dependentes de Proteínas Cínases

Este trabalho foca, então, as alterações adaptativas, ao nível das funções celulares e sinápticas, induzidas pelo tratamento crónico com substâncias opióides.

II. PASSOS INICIAIS DA ACÇÃO OPIÓIDE

A. Opióides, receptores opióides e ligandos

Os opióides endógenos, as famílias das encefalinas, dinorfinas e endorfinas, são peptídeos, existindo uma razoável correspondência entre estas três famílias principais de peptídeos opióides e os três receptores em que estas actuam⁽²⁵⁾. No entanto, nenhum peptídeo endógeno é específico para nenhum dos receptores⁽⁸⁾.

As três principais famílias de opióides derivam de diferentes precursores, encontrando-se distantes os propeptídeos para as *endorfinas*, *encefalinas* e *dinorfinas*⁽⁸⁾ (Quadro 2).

Depois da descoberta de peptídeos opióides endógenos, múltiplos receptores opióides foram confirmados funcionalmente, usando preparações farmacológicas isoladas. Destes estudos, três principais tipos de receptores foram identificados: μ (mu); δ (delta) e κ (kappa). Existe cerca de 60% de

homologia na sequência entre os receptores μ , δ e κ . Cada tipo foi ainda subdividido em inúmeros subtipos com base em estudos farmacológicos e fisiológicos.

Ocorreu um período de tempo considerável entre a definição da família dos receptores opióides e a descoberta de mais um receptor (*opioid receptor-like 1* – ORL(1)⁽³⁵⁾), o que aponta para mecanismos inerentes de regulação pós-translacional, dimerização de receptores e mesmo interações com proteínas acessórias.

A distribuição anatómica e celular dos receptores opióides é importante para a identificação de sistemas neuronais e redes locais envolvidas na acção inicial de drogas, e subsequente desenvolvimento de adaptações resultantes do uso contínuo das mesmas. A distribuição dispersa dos receptores indica que os opióides têm potencial para afectar inúmeros sistemas, tanto *nervosos* como *hormonais* (neuro-eixo, tecido parácrino e exócrino).

Os receptores μ e κ parecem estar amplamente distribuídos ao longo das membranas plasmáticas (soma, dendritos e terminais nervosos). Os receptores δ encontram-se frequentemente dentro das células, associados a vesículas⁽³⁸⁾. Os receptores estão geralmente em áreas pré-sinápticas⁽³⁰⁾.

A actividade dependente da redistribuição, tanto de receptores como de receptores κ das vesículas para as membranas plasmáticas, mostra que a localização dos receptores não é estática, variando consideravelmente com a actividade⁽³⁷⁾.

B. Segundos Mensageiros/Efectores e respectivas acções

Os receptores opióides pertencem à superfamília de receptores com *sete domínios transmembranares*, que produzem os

QUADRO 2

Opióides Endógenos:

- encefalinas
- endorfinas
- dinorfinas

Principais tipos de receptores opióides:

- μ (mu)
- δ (delta)
- κ (kappa)

↓ localização difusa dos receptores

- **receptores μ e κ** → distribuídos ao longo das membranas plasmáticas;
- **receptores δ** → dentro das células associados a vesículas.

seus efeitos celulares via acoplamento a proteínas G. No caso específico dos receptores opióides, cada receptor é acoplado a *Proteínas Gi/Go sensíveis à toxina pertussis (PTX)*⁽²⁶⁾, apesar de existirem mais de vinte tipos de proteínas G.

As acções descritas vulgarmente como sendo efectuadas pelos opióides, através da ligação efector-receptor (ligados a proteínas G) são: a inibição da adenil-ciclase, a activação da conductância do potássio – correntes rectificadoras do influxo de K^+ – ($I_{K_{ir}}$), a inibição da conductância do Ca^{2+} ($I_{Ca^{2+}}$) e, também, a inibição da libertação de neurotransmissor. Observações mais recentes estendem as acções dos opióides à activação da proteína cínase C (PKC), à libertação do Ca^{2+} de reservas intracelulares, à activação da cascata ligada à MAPK (*Mitogen activated protein kinase*) e à realização do tráfego de receptores.

I. Inibição da Adenil-ciclase

Durante muito tempo nada se soube acerca da inibição da adenil-ciclase pelos opióides. Dois efeitos foram identificados: um deles é mediado pela modulação de uma *corrente dependente de voltagem* (I_h), também designada de *pacemaker current*. Esta corrente catiónica não selectiva é activada a potenciais hiperpolarizados, para causar uma corrente de entrada que faz disparar o potencial de membrana até ao seu limiar. A dependência de voltagem desta corrente é regulada pelo AMPc, sendo activada a potenciais menos negativos quando os níveis de AMPc se encontram elevados. Os opióides modulam a dependência de voltagem para potenciais mais negativos, através da redução do AMPc intracelular. Assim, obtém-se uma dimi-

nuição da amplitude da corrente de entrada que conduz à actividade espontânea, diminuindo a excitabilidade (causada por agentes de mediação da hiperalgesia).

O segundo efeito causado pela inibição da adenil-ciclase é a *inibição da libertação de transmissor*, que se encontra dependente da activação da adenil-ciclase⁽⁷⁾.

A inibição da adenil-ciclase está implicada na regulação, através de opióides, de mecanismos celulares, que incluem níveis de controlo da expressão génica, assim como a modulação da actividade de fosfatases e de cínases celulares.

II. Efeito da Condutância do Potássio

Os opióides activam três tipos de condutância de potássio. A mais frequentemente observada é a *G-protein-activated inwardly rectifying conductance* (GIRK). Todos os receptores opióides activam esta condutância. A via do segundo mensageiro está circunscrita à membrana, sendo mediada pela proteína G sensível à toxina pertussis, presumindo-se que a condutância de K^+ seja activada pelas subunidades β/γ .

O final da corrente GIRK depende do agonista aplicado. A taxa de recuperação é lenta, quando existe grande afinidade por parte dos agonistas; sugere-se que a não ligação ao receptor é o passo limitante para a desactivação.

Numerosos testes experimentais foram realizados, tendo sido concluído que os canais GIRK são importantes efectores na analgesia induzida, tanto pelos opióides como pelo etanol, sendo o único mecanismo que foi demonstrado *in vivo*⁽¹⁶⁾.

III. Inibição da Condutância do Cálcio

Existem inúmeros exemplos de inibição de correntes de cálcio pela activação de todos os subtipos de receptores opióides.

A inibição do elevado limiar das correntes de cálcio pelos opióides, em comum com outros receptores ligados à proteína G sensíveis à toxina pertussis: 1) é delimitada às membranas; 2) é mediada pelas subunidades β/γ das proteínas G; 3) diminuída a activação da corrente, a inibição é imediatamente maior logo após ocorrer o potencial de acção; 4) ocorre redução da inibição após despolarização de potenciais positivos⁽³⁷⁾.

- O aumento da condutância do K^+ e a diminuição da condutância do Ca^{2+} , servem ambos para reduzir a excitabilidade da membrana.

IV. Inibição da Libertação do Transmissor

Resulta da activação de todos os subtipos de receptores. Trabalhos recentes sugerem que: a) sob determinadas condições, a inibição da adenil-ciclase pode também conduzir a uma diminuição da libertação do transmissor; b) a inibição directa da maquinaria de libertação do transmissor independente das condutâncias do K^+ e do Ca^{2+} , também foi descrita.

Dependendo do local, os opióides inibem a libertação de transmissores excitatórios ou inibitórios. A inibição opióide da libertação de GABA, em circuitos locais, foi amplamente demonstrada, sendo considerada como *um efeito excitatório indirecto* ou *desinibitório* dos opióides. Também importante é o facto da libertação de transmissor ser o resultado de séries comple-

tas de eventos, com numerosas interacções proteína-proteína, existindo diversos locais de potencial regulação.

Os receptores opióides são apenas um dos vastos receptores ligados a proteínas G que modificam a libertação de transmissor.

V. Activação da Proteína Cínase C (PKC)

Um aumento das correntes de N-metil-D-aspartato (NMDA), mediadas pelo glutamato, de acção prolongada e selectivas, foi observado pela activação de receptores μ -opióides, em secções cerebrais do núcleo do trigémio⁽⁶⁾. Este aumento foi mimetizado por ésteres de forbol e bloqueado pelo peptídeo inibidor da PKC. Concluiu-se, então, que os opióides activam a PKC, que seguidamente faz aumentar a condutância despoletada por receptores agonistas NMDA.

A activação da PKC pelos opióides parece ser o resultado da activação da Fosfolípase C (PLC) e/ou da Fosfolípase A2 (PLA2). Supõe-se que esta activação resulte de uma interacção com as subunidades β/γ das proteínas G sensíveis à toxina pertussis⁽¹²⁾. Uma via semelhante parece mediar a libertação de Ca^{2+} de armazenamentos sensíveis ao IP3 (inositol 1,4,5- trifosfato).

VI. Libertação do Ca^{2+} de Armazenamentos Internos

Diversos estudos experimentais concluíram que, para além do Ca^{2+} extracelular (que entra na célula através da membrana – *fonte primária*), outra fonte de cálcio citosólico resulta da libertação de armazenamentos intracelulares.

A activação opióide da Fosfolípase C

resulta de uma interação com as subunidades β/γ das proteínas G sensíveis à toxina pertussis, e subsequente produção de IP3 e de DAG (diacilglicerol) que, respectivamente, liberta o Ca^{2+} armazenado e activa a PKC.

No entanto, o mecanismo sinalizador para esta acção ainda não foi descrito.

VII. Tráfego de Receptores

Tal como no caso da maior parte dos receptores ligados a proteínas G, os receptores opióides não são estáticos e circulam de e para a membrana plasmática.

Receptores opióides foram encontrados em vesículas localizadas em terminais nervosos de neurónios contendo vasopressina, sendo translocados para a membrana plasmática após estímulo fisiológico⁽³⁴⁾. Uma hora após o estímulo, os receptores desapareceram da membrana

plasmática e reapareceram no compartimento vesicular. Assim, o “pool” de receptores encontrados nas membranas vesiculares resulta da síntese de novo e da reciclagem.

O tráfego de receptores, iniciado após ligação a agonistas e internalização através da via endossômica, tem a ver com a dessensibilização e com o início da sinalização nuclear. Os eventos implicados na internalização baseiam-se primariamente no modelo dos β -receptores: 1) após ocupação do agonista, 2) uma cínase de receptores (BARK2) fosforila o receptor, 3) desacoplando a Proteína G e 4) aumentando a afinidade do receptor para a Arrestina. Assim, despoleta-se uma série de eventos, incluindo a ligação da dinemina ao complexo, transportando-o para *clathrin-coated pits* e, mais tarde, para o compartimento endossômico⁽³⁶⁾ (Fig. 1).

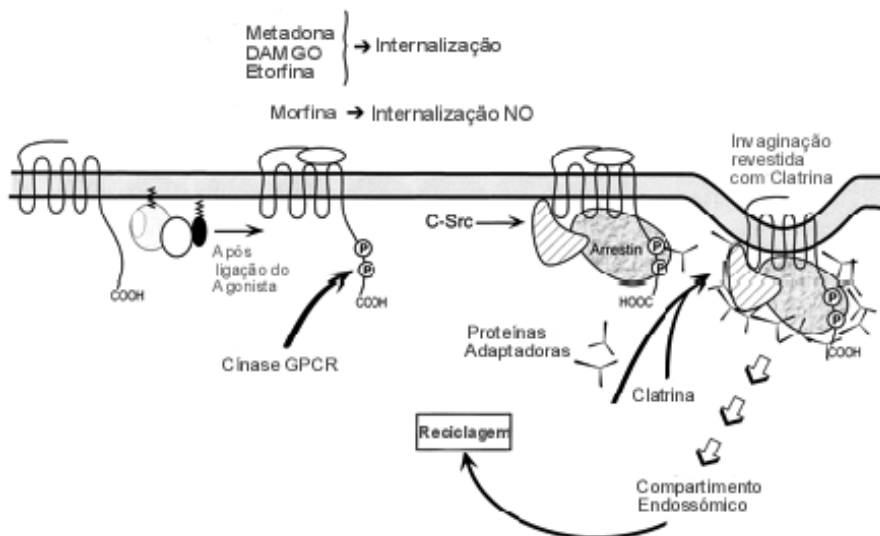


Figura 1 – Sequência de eventos que conduzem à Internalização de Receptores.

Alguns agonistas opióides são capazes de activar a via. O receptor opióide activado é fosforilado por uma cínase receptora associada à Proteína G. A afinidade de interacção entre este complexo e a arrestina é aumentada. O complexo ligado à arrestina recruta, então, proteínas adaptadoras c-Src (complexo AP-2), que ligam a arrestina à clatrina, promovendo a endocitose⁽³⁷⁾.

A cauda terminal-COOH dos receptores opióides, tal como nos outros receptores associados a proteínas G, regula a extensão e a eficiência da internalização. A morfina, por exemplo, é um agonista que não provoca internalização. A metadona, tal como a morfina, é um agonista parcial; no entanto, resulta numa eficiente internalização. A morfina actua de forma diferente nos receptores μ e κ , já que nestes últimos provoca internalização. O que significa, portanto, que a cauda terminal-COOH do receptor μ impede a internalização⁽⁴⁾.

A incapacidade da morfina para causar internalização, na maior parte das circunstâncias, é um facto importante na eventual compreensão dos efeitos celulares e sinápticos do tratamento crónico com morfina. Partindo do princípio de que a internalização de receptores pode ser o mecanismo que enceta o *turnover* de receptores e a ressensibilização, a incapacidade da morfina na mediação desta resposta básica pode culminar na activação crónica do receptor.

VIII. Sinalização Celular

Recentemente, o acoplamento de receptores opióides à via da MAPK (*mitogen activated protein kinase*) foi exaustivamente caracterizado. Existem três vias gerais que se seguem à activação de proteínas Gi/Go que eventualmente convergem para a via da MAPK e que medeiam a sinalização celular: 1) as subunidades β/γ das proteínas G são libertadas do receptor activado, e activam a cínase do fosfatidil-inositol-3 (PI3K), a qual, através de uma série de passos fosforilativos activa a MAPK; 2) a fosforilação e a internalização de receptores em *clathrin-coated pits* activa a via de si-

nalização da MAPK; 3) a MAPK também pode ser activada através da PKA no SNC⁽⁴⁾. Isto pode não ser importante durante a administração aguda de opióides, mas poderá ser facilitado com a *up-regulation* do AMPc, no tratamento crónico. Uma vez activada, a MAPK pode fosforilar alvos no citoplasma ou ser translocada para o núcleo, afectando a regulação de numerosos factores de transcrição (CREB, RNA polimerase II, Elk-1...) (Fig. 2).

III. ADAPTAÇÕES CELULARES INDUZIDAS PELO TRATAMENTO CRÓNICO COM OPIÓIDES

A. Dessensibilização dos receptores opióides

A dessensibilização é definida como a perda progressiva de função dos receptores sob exposição continuada a um agonista.

Os efeitos de um agonista que dessensibiliza o seu receptor é designada *dessensibilização homóloga* (inibição da AC (adenil-cíclicase) pelos receptores δ -opióides⁽²²⁾), enquanto que a dessensibilização de receptores co-expressos é denominada *dessensibilização heteróloga* (acoplamento de receptores μ -opióides a correntes de Ca^{2+} ou a correntes de $\text{K}^{+(19,20)}$).

A dessensibilização dos receptores opióides segue-se à fosforilação mediada por diferentes proteína cínases (como a PKA, a CaMKII, a PKC...). Inúmeros estudos demonstram o paralelismo existente entre a fosforilação de receptores opióides e a dessensibilização induzida por agonistas.

As relações entre a dessensibilização dos receptores e a tolerância opióide são

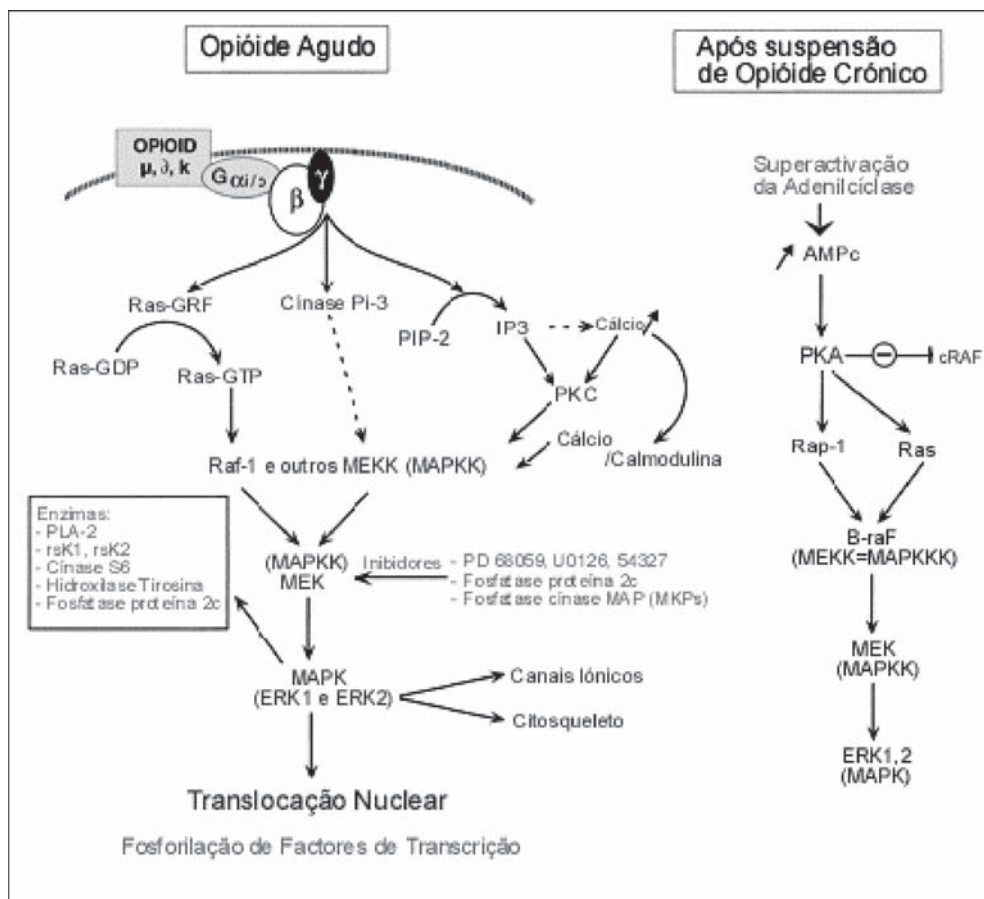


Figura 2 – Inúmeras vias podem conduzir à activação pelos opióides da cascata de transdução ERK (*extracellular signal-related kinase*)/ MAPK (*mitogen activated protein kinase*), em situações de tratamento agudo ou crônico. Existem três vias de transdução implicadas na activação da cascata ERK/MAPK, durante a aplicação aguda de opióides. A libertação de subunidades β/γ pode 1) estimular a Fosfolípase C e provocar a libertação de Ca^{2+} de armazenamentos internos e a produção de Diacilglicerol que, por sua vez, activa a PKC; 2) recrutar proteínas membranares como a Ras-GRF; e 3) activar a cinase do fosfatidilinositol-3 (*PI3-kinase*). Após o final do tratamento prolongado com opióides, a superactivação da AC pode gerar a activação da cascata ERK/MAPK, através da elevação intracelular de AMPc e da activação da PKA. PIP2, fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato; IP3, inositol 1,4,5-trifosfato; PKC, proteína cinase C⁽³⁷⁾.

controversas. A *morfina* claramente induz tolerância, falhando na dessensibilização de receptores μ (como já foi referido), causando supersensibilização da AC, após tratamento crônico. A *metadona* pode inibir os efeitos crônicos da morfina, através da

dessensibilização dos receptores μ -opióides.

Os mecanismos de dessensibilização dos receptores opióides incluem: *down-regulation*, internalização e desacoplamento de receptores opióides das protef-

nas G adjacentes. Estes mecanismos deverão ser dependentes do tráfego intracelular dos receptores opióides, regulado por proteína cínases.

1. Down-regulation dos Receptores Opióides

A alteração no número e na afinidade dos receptores oferece-nos um mecanismo atractivo para explicar a perda de capacidade de resposta, tão característica da tolerância. A *down-regulation* dos receptores opióides é caracterizada por uma perda generalizada de receptores, tanto dos da superfície celular como dos intracelulares.

A base molecular da *down-regulation* dos receptores opióides ainda não está definida; no entanto, a fosforilação pelas GRKs ou cínases responsáveis pelo AMPc deverão apresentar um papel significativo na *down-regulation* dos receptores.

Muitas correntes sugerem que a *down-regulation* é agonista-selectiva e dependente da eficácia intrínseca dos agonistas. No entanto, a *down-regulation* não parece ser um factor essencial no desenvolvimento da tolerância⁽³⁾.

2. Internalização de Receptores Opióides

Ao contrário do processo de *down-regulation*, a internalização de receptores não está associada ao transporte de complexos ligando-receptor para lisossomas, já que ocorre na ausência de decréscimo na densidade de receptores⁽¹⁸⁾.

A rápida internalização de receptores deverá desempenhar um papel importante na recuperação funcional pela promoção da dissociação receptor/ligando. Concomitantemente, a endocitose de recep-

tores dessensibilizados é requerida para a desfosforilação, e subsequente ressensibilização para recuperar a sensibilidade ao ligando.

Tal como os ligandos peptídicos endógenos, a *etorfina* e a *diidroetorfina* estimulam a internalização dos receptores μ , enquanto que a *morfina* activa os receptores sem causar a sua internalização⁽¹⁾. Por isso, quando a diidroetorfina é utilizada como analgésico, provoca menos tolerância e dependência do que a morfina⁽³³⁾.

Assim, tal como já foi referido, no tratamento crónico com morfina, a activação de receptores opióides sem internalização provoca distúrbios importantes na homeostasia neuronal, contribuindo para a fisiopatologia da tolerância e dependência.

3. Uncoupling dos Receptores Opióides das Proteínas G

A *down-regulation* e a internalização dos receptores não podem explicar totalmente o fenómeno da tolerância opióide. Como alternativa averiguou-se o papel da alteração do acoplamento das proteínas G aos receptores.

Existem locais de fosforilação potencial nos resíduos de serina e treonina, na terceira ansa intracelular e no terminal carboxilo dos receptores opióides.

O mecanismo pelo qual existe desacoplamento (*uncoupling*) de receptores, através da GRK, inicia-se a partir de uma alteração conformacional no receptor, após ligação ao agonista. Isto conduz à activação da proteína G, sendo que as subunidades β/γ livres da proteína G facilitam a translocação da GRK para a membrana plasmática. Verifica-se então a fosforilação dos resíduos serina/treonina, na terceira

ansa intracelular e no terminal carboxilo (ver acima).

Novamente, a proteína celular arrestina, que possui elevada afinidade para o receptor fosforilado, move-se a partir do citoplasma, ligando-se àquele, dando lugar ao *Complexo receptor fosforilado-arrestina*. Este mecanismo provoca o desacoplamento da proteína G, tornando o receptor incapaz de transduzir sinal. A fosforilação do receptor isolado não reduz significativamente a sua capacidade de activar proteínas G.

Os mecanismos que se encontram inerentes à aplicação aguda vs crónica, que induzem o desacoplamento das proteínas G, podem ser diferentes. Enquanto que a fosforilação mediada pela PKA causa desacoplamento dos receptores opióides das proteínas G após tratamento crónico, a fosforilação mediada pela PKC ocorre no seguimento da terapia opióide aguda⁽²⁵⁾.

Apesar de amplamente relacionadas, as manifestações clínicas da tolerância e dependência aos opióides não podem ser explicadas simplesmente por alterações no número, estrutura e função dos receptores. Grandes alterações nos mecanismos de transdução de sinal também ocorrem, como a *up-regulation* da via do AMPc, que se encontra classicamente associada a fenómenos clínicos e experimentais de tolerância e dependência aos opióides.

B. *Up-regulation* da Via do AMPc

Administrados de forma aguda, os opióides inibem a actividade da adenil-ciclase. No entanto, após tratamento crónico com morfina em linhagens de célu-

las não neuronais, existia uma *up-regulation* da cascata da adenil-ciclase, apesar da presença continuada de agonista. Após a remoção da morfina, a actividade da adenil-ciclase aumentou acima do normal. Este parece ser um importante componente do *Síndrome de Privação*.

A *up-regulation* do AMPc envolve concentração aumentada de adenil-ciclase e, potencialmente, de outros componentes da via de transdução do sinal. Paralelamente, a *up-regulation* da via do AMPc opõe-se à inibição opióide aguda desta via, resultando numa das formas que explicam a tolerância fisiológica.

A cascata do AMPc é conhecida por apresentar potentes efeitos na libertação de neurotransmissor, tanto nas sinapses inibitórias como nas excitatórias, no SNC⁽²⁵⁾. A *up-regulation* da via do AMPc pode ser um dos mecanismos que explicam os comportamentos motivacionais dos opióides⁽³⁶⁾.

C. AMPc response element-binding protein (CREB)

A administração crónica de opióides, de forma selectiva, provoca *up-regulation* de duas formas de adenil-ciclase (tipos I e VIII) nos neurónios do LC (*Locus Coeruleus*)⁽²⁷⁾.

A *up-regulation* da adenil-ciclase tipo VIII parece ser mediada pelo CREB (*AMPc response element binding protein*), um dos mais importantes factores de transcrição do AMPc, no cérebro. Para além do CREB, deverão existir inúmeros factores que regulam a *up-regulation* da adenil-ciclase⁽⁴⁾.

D. Supersensibilização da Adenil-cí-clase

Recentemente foram propostos mecanismos de acção dos opióides que incluem a *supersensibilização da AC*, bem como os efeitos estimuladores directos dos receptores opióides.

Estudos efectuados concluíram que o tratamento crónico com morfina leva a uma acumulação marcada de AMPc, enquanto que a capacidade da morfina para inibir a produção de AMPc é a mesma antes e após o tratamento.

A *up-regulation* da via do AMPc resulta de uma supersensibilização, mais do que da inibição da AC pela dessensibilização dos receptores opióides⁽²⁵⁾.

A exposição crónica da célula COS-7 a opióides, juntamente com receptores μ e AC, induz a supersensibilização das isoformas AC I, II, V e VIII (ocorrem predominantemente no cérebro)⁽²⁾. A supersensibilização da AC II é particularmente significativa após exposição crónica a opióides. A supersensibilização da AC após exposição opióide crónica necessita de elevadas concentrações de agonista para atingir os níveis de AMPc pré-tratamento, o que deverá ser o mecanismo primário inerente à tolerância opióide⁽²⁵⁾.

A estimulação de proteínas G, via activação de receptores opióides, liberta subunidades β/γ das proteínas G que, por sua vez, estimulam a actividade da AC; este efeito estimulante é acentuado pela fosforilação de isoformas da AC, conduzindo à supersensibilização da mesma. Assim se conclui que os dímeros β/γ das proteínas G apresentem um papel fulcral na supersensibilização da AC.

A activação persistente dos receptores

opióides conduz a um aumento da fosforilação da AC II mediada pela PKC, que aumenta significativamente a resposta dos isómeros AC II às subunidades β/γ das proteínas Gs. Este efeito contribui para uma mudança no predomínio de receptores opióides inibitórios em relação aos excitatórios, regulando, assim, a AC durante uma exposição opióide prolongada.

E. Acoplamento de Proteínas G Excitatórias aos Receptores Opióides

Tal como foi sugerido anteriormente, um aumento na acumulação de AMPc pode ser devido à capacidade dos receptores opióides para estimular a AC directamente, via proteína Gs.

O tratamento crónico com opióides altera o equilíbrio entre os receptores opióides ligados a proteínas G inibitórias (Gi) e excitatórias (Gs), com efeitos excitatórios mais pronunciados decorrido algum tempo de exposição aos opióides.

Os receptores opióides são sujeitos a uma alteração conformacional, que modifica o seu acoplamento a proteínas Gi para Gs, convertendo-os de um *estado inibitório* para um *estado excitatório*⁽²⁵⁾.

Uma *up-regulation* dos efeitos excitatórios dos opióides durante o tratamento crónico com agonistas deverá desempenhar um papel preponderante na modulação da analgesia, tolerância e dependência opióides. O bloqueio dos efeitos excitatórios dos opióides pode diminuir o desenvolvimento de tolerância. A *etorfina* e a *diidroetorfina* actuam como antagonistas da via de transdução do sinal mediada por proteínas Gs – aumentam o potencial inibitório da morfina e de outros agonis-

tas, atenuando o desenvolvimento de tolerância opióide.

F. Efeitos dos Sistemas Dependentes de Proteínas Cínases

Como já foi descrito, o estado de fosforilação/desfosforilação dos receptores opióides e de outras proteínas de transdução do sinal é um determinante crucial dos mecanismos subjacentes à dessensibilização dos receptores opióides e à *up-regulation* da via do AMPc.

1. Proteína Cínases dependentes do Segundo Mensageiro:

1.1. Proteína Cínase C (PKC):

A fosforilação dos receptores opióides, proteína Gi e AC, pela PKC está envolvida na dessensibilização, internalização e *down-regulation* dos receptores opióides, assim como na supersensibilização da actividade da AC.

A exposição crónica à morfina causa fosforilação da AC, mediada pela PKC, e alteração de um estado predominantemente inibitório para um estado excitatório do receptor opióide, que se encontra ligado à via da AC. Esta exposição estimula a actividade da PKC citosólica e da membrana.

1.2. Proteína cínase dependente do cálcio/calmodulina II (CaMKII):

Um papel significativo para a CaMKII foi recentemente demonstrado na dessensibilização e sensibilização dos receptores opióides.

A dessensibilização induzida por agonista resulta da fosforilação dos receptores

μ , mediada pela CaMKII (na terceira ansa intracelular). A CaMKII fosforila o *AMPC response element-binding protein* (CREB) e medeia a activação da MAPK, cujos papéis se encontram já amplamente descritos⁽³¹⁾.

Os mecanismos através dos quais a CaMKII contribui para a tolerância opióide são ainda especulativos.

1.2. Proteína cínase dependente do AMPc (PKA)

A fosforilação de receptores, canais iónicos e proteínas intracelulares mensageiras, através da PKA, está implicada na neuroadaptação, induzida pela exposição crónica a opióides.

Uma *up-regulation* do nível de AMPc durante o tratamento opióide crónico leva à activação da PKA. Esta activação da PKA leva à fosforilação de receptores μ , que por sua vez se desligam das proteínas Gi⁽¹⁵⁾. A PKA também fosforila canais de cálcio dependentes do ligando e receptores NMDA⁽¹³⁾, que se encontram igualmente envolvidos no desenvolvimento de tolerância e dependência opióides.

Acredita-se que o sistema mesolímbico dopaminérgico desempenhe algum papel nos estados motivacionais e no reforço de muitas das acções das drogas⁽²¹⁾. A *up-regulated* AMPc modula estes efeitos através da fosforilação dos receptores dopaminérgicos D1 pela PKA, assim como, da fosforilação de canais de sódio dependentes de voltagem, e da proteína CREB. A CREB encontra-se envolvida na LTP e noutros modelos celulares de aprendizagem e memória que exploram a neuroplasticidade inerente à ingestão de drogas.

Assim se conclui que, uma *up-regulation* da actividade da PKA por drogas, em de-

terminadas regiões cerebrais, pode contribuir para o desenvolvimento da dependência opióide e da toxicodependência.

2. Proteínas G acopladas a Cínases Receptoras (GRKs)

O tráfego intracelular dos receptores opióides mediado pelas GRKs (*G protein coupled receptor kinases*) desempenha um papel fundamental na regulação da função dos receptores. As GRKs e a β -arrestina são os determinantes moleculares da dessensibilização e ressensibilização dos receptores. Existem fortes correlações entre a fosforilação dos receptores μ mediada pela GRK, a captura pela β -arrestina e a dessensibilização dos receptores, o que sugere que os GRKs são fulcrais na regulação dos receptores μ ⁽⁵⁾.

A tolerância opióide, causada pela exposição crónica à morfina, aumenta a expressão da GRK2 no LC. A superexpressão da GRK2 conduz a uma limitação da função dos receptores, a qual é uma mera característica da dessensibilização dos receptores, na tolerância opióide.

A capacidade dos diferentes agonistas opióides, na regulação diferencial da internalização e dessensibilização dos receptores μ , prende-se com a sua capacidade de promoção da fosforilação do receptor, efectuada pela GRK2. Isto ajudará a explicar as diferentes propriedades analgésicas dos opióides e os distintos mecanismos de tolerância opióide.

3. Proteína cínase activada pelos mitogéneos (MAPK)

Os efeitos a longo prazo dos opióides deverão ser mediados pela via MAPK, devido ao acoplamento funcional dos recep-

tores opióides às MAPKs⁽²⁴⁾. Estas são também conhecidas como ERKs (cínases reguladas por sinais extracelulares): constituem uma família de proteínas cínases serina/treonina que desempenham importantes papéis na transdução de sinal das tirosina cínases dos receptores mitogénicos, proteínas Ras e Raf. As MAPKs regulam as proteínas do citosqueleto, fosfolípase A2 e factores de transcrição como o Fos B, C-Jun, C-Myc, ATF2 e ERK1.

As MAPKs parecem igualmente relacionar-se com a dessensibilização e internalização dos receptores μ e δ . A activação da MAPK, por sua vez, é dependente da activação das proteínas Gi e G0 (mediada por opióides), via libertação de subunidades G β/γ , que estimulam directamente a sua actividade.

O aumento na actividade da MAPK, mediado por receptores opióides, está igualmente relacionado com a regulação da PKC e da tirosina cínase. Recentemente, descobriu-se que as GRKs também activam ERKs, via complexos de adesão focal, assim como através da sequestração de receptores opióides e sua dessensibilização (Fig. 3).

A importância relativa destas interacções ainda não foi descoberta; no entanto, o papel das MAPKs no desenvolvimento da tolerância opióide é evidente.

IV. CONCLUSÃO

A compreensão dos efeitos agudos e crónicos da terapêutica opióide expandiu-se significativamente, nos últimos 25 anos.

Após a descoberta dos três maiores ti-

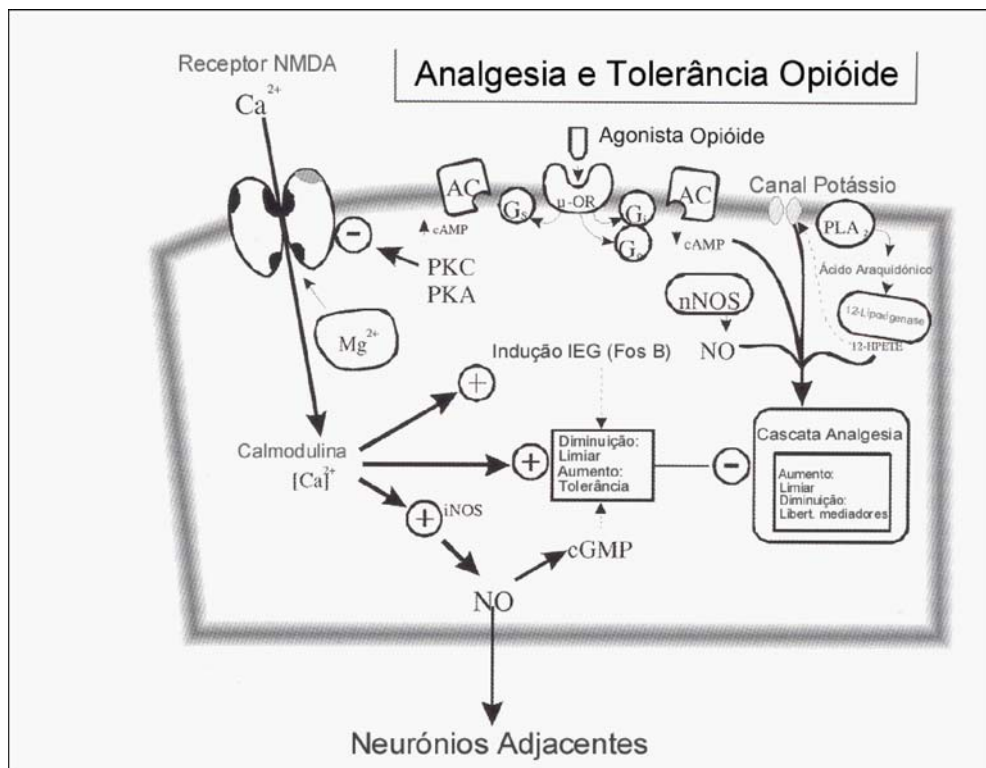


Fig. 3 – Representação diagramática dos mecanismos neuronais inerentes à analgesia e tolerância opióides. Os mecanismos inerentes à cascata da analgesia aumentam o potencial de repouso da membrana celular, reduzem a duração do potencial de acção (APD- *action potential duration*) e diminuem a libertação de neurotransmissor, enquanto que os mecanismos subjacentes à tolerância opióide produzem efeitos opostos⁽²⁵⁾.

pos de receptores opióides, foram classicamente descritos quatro dos seus efeitos: a inibição da adenil-ciclase, a activação da condutância do K^+ , a inibição da condutância do Ca^{2+} e a inibição da libertação do transmissor.

Actualmente, está perfeitamente esclarecido que a tolerância e a dependência opióides se encontram associadas à *up-regulation* da via do AMPc e à alteração do acoplamento dos receptores opióides a proteínas G excitatórias.

Conclui-se, portanto, que existem nu-

meros alvos potenciais de adaptação, na cascata efector-receptor, após exposição crónica a substâncias opióides.

Observações clínicas dos efeitos da morfina, etorfina e de outros opióides concluíram que existe uma acção diferente destas substâncias no desenvolvimento da tolerância opióide.

Uma compreensão detalhada dos eventos celulares e moleculares subjacentes ao desenvolvimento da tolerância opióide irá conduzir ao desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas, no sentido

de evitar o desenvolvimento de dependência e tolerância opióides.

Agradecimentos

A aluna agradece à Dra. Sandra Rebelo (Instituto de Embriologia e Histologia da Faculdade de Medicina da U.P.) pelo tempo dispendido na pesquisa de bibliografia, e a todos os responsáveis pela Consulta da Dor do Hospital de S. João, em especial à Dra. Armanda Gomes, pela disponibilidade com que a acolheram.

Abstract

Although opioids are highly effective for the management of pain, they are also known to cause addiction.

This work focuses on the adaptive changes in cellular and synaptic functions induced by chronic opioid clinical therapy or drug abuse. The initial steps of opioid action are mediated through the activation of G protein-linked receptors. Opioid receptors, as is true for all G protein-linked receptors, activate and regulate a cascade of second messenger pathways associated with effector coupling, receptor trafficking and nuclear signaling. These mechanisms are critical for the understanding of the supersensitization of AC (Adenyl Cyclase), which contribute to the development of opioid tolerance and addiction.

A clear understanding of molecular mechanisms of opioid tolerance and dependence will help to improve the management of patients suffering from acute or chronic pain or drug dependence and addiction.

Key-words: *Opioids; Addiction; Opioid receptors; Desensitization; Down-regulation; Up-regulation; Supersensitization.*

BIBLIOGRAFIA

- JR Arden, V Segredo, Z Wang, J Lameh, W Sadee. Phosphorilation and agonist-specific intracellular trafficking of an epitope-tagged m-opioid receptor expressed in HEK 293 cells. *J Neurochem* 1995; 65: 1636-1645.
- T Avidor-Reiss, I Nevo, R Levy, T Pfeuffer, Z Vogel. Chronic opioid treatment induces adenylyl cyclase V superactivation. *J Biol Chem* 1997; 272: 5040-5047.
- Y Baumhaker, M Gafni, O Keren, Y Sarne. Selective and interactive down-regulation of m and d-opioid receptors in human neuroblastoma SK-N-SH cells. *Mol Pharmacol* 1993; 44: 461-467.
- SL Borgland. Acute opioid receptor desensitization and tolerance: is there a link?. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2001; 28: 147-54.
- R Capeyrou, J Riond, M Corbani, JF Lepage, B Bertin, LJ Emorine. Agonist-induced signaling and trafficking of the m-opioid receptor: role of serine and threonine residues in the third cytoplasmic loop and C terminal domain. *FEBS Lett* 1997; 415: 200-205.
- L Chen, LYM Huang. Sustained potentiation of NMDA receptor-mediated glutamate responses through activation of protein kinase C by a m-opioid. *Neuron* 1991; 7: 319-326.
- B Chieng, JT Williams. Increased opioid inhibition of GABA release in nucleus accumbens during morphine withdrawal. *J Neurosci* 1998; 18: 7033-7039.
- AH Dickenson. Mechanisms of the analgesic actions of opiates and opioids. *Brit Med Bull* 1991; 47: 690-702.
- A Dray. Neurogenic mechanisms and neuropeptides in chronic pain. *Progress in Brain Res* 1996; 110: 85-94.
- A Duttaroy, BC Yoburn. The effect of intrinsic efficacy on opioid tolerance. *Anesthesiology* 1995; 82: 1226-1236.
- J Elliott, L Guo, JR Traynor. Tolerance to m-opioid agonists in human neuroblastoma SH-SY5Y cells as determined by changes in guanosine-5'-O-(3²⁵S)thio)triphosphate binding. *Br J Pharmacol* 1997; 121: 1422-1428.
- K Fukuda, S Kato, H Morikawa, T Shoda, K Mori. Functional coupling of the delta, mu and kappa-opioid receptors to mitogen-activated protein kinase and arachidonate release in Chinese hamster ovary cells. *J Neurochem* 1996; 67: 1309-1316.
- ME Fundytus, TJ Coderre. Opioid tolerance and dependence. *Pain Forum* 1999; 8: 3-13.
- S Grond, TF Meert, H Noorduin. Safety and tolerability of opioid analgesia: a comparable class profile?. *Pain Rev* 2001; 8: 103-111.
- H Harada, H Ueda, Y Wada, T Katada, M Ui, M Satoh. Phosphorilation of mu-opioid receptors- a putative mechanism of selective uncoupling of receptor-Gi interaction, measured with low-Km GTPase and nucleotide-sensitive agonist binding. *Neurosci Lett* 1989; 100: 221-226.
- K Ikeda, T Kobayashi, T Kumanishi, R Yano, I Sora, H Niki. Molecular mechanisms of analgesia induced by opioids and ethanol: is the GIRK channel one of the keys?. *Neurosci Res* 2002; 44 (2): 121-131.
- R Kanjhan. Opioids and Pain. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1995; 226-7: 397-403.
- DE Keith, S Murray, P Zaki, P Chu et al. *Soc Neurosci* 1995; Abstr. 21 1353.
- C Kennedy, G Henderson. m-Opioid receptor inhibition of calcium current: development of homologous tolerance in single SH-SY5Y cells after chronic exposure to morphine. *Mol Pharmacol* 1991; 40: 1000-1005.
- C Kennedy, G Henderson. Chronic exposure to morphine does not induce dependence at the level of the calcium channel current in human SH-SY5Y cells. *Neuroscience* 1992; 49: 937-944.

21. GF Koob. Drugs of abuse: anatomy, pharmacology and function of reward pathways. *Trends Pharmacol Sci* 1992; 13: 177-184.
22. PY Law, DS Hom, HH Loh. Opioid receptor down-regulation and desensitization in neuroblastoma x glioma NG108-15 hybrid cells are two separate cellular adaptation processes. *Mol Pharmacol* 1983; 24: 413-424.
23. LY Li, KJ Chang. The stimulatory effect of opioids on mitogen-activated protein kinase in Chinese hamster ovary cells transfected to express m-pioid receptor. *Mol Pharmacol* 1996; 50: 599-602.
24. H Liu, PW Mantyh, AI Basbaum. NMDA- receptor regulation of substance P release from primary afferent nociceptors. *Nature* 1997; 386: 721-724.
25. JG Liu, KJ Anand. Protein kinases modulate the cellular adaptations associated with opioid tolerance and dependence. *Brain Res Rev.* 2001; 38 1-2: 1-19.
26. E Mann. Chronic pain and opioids: dispelling myths and exploring facts. *Prof Nurse.* 2003. 187;: 408-411.
27. I Matusuoka, R Maldonado, N Defer, F Noel, J Hanoune, BP Roques. Chronic morphine administration causes region-specific increase of brain type VIII adenylyl cyclase mRNA. *Eur J Pharmacol* 1994; 268: 215-21.
28. H McQuay. Opioids in pain management. *Lancet* 1999; 353: 2229-2232.
29. E Moysé, D Marcel, K Leonard, A Beaudet. Electron microscopic distribution of um opioid receptors on noradrenergic neurons of the locus ceruleus. *Eur J Neurosci* 1997; 9: 128-139.
30. MM Muthalif, IF Benter, MR Uddin, KU Malik. Calcium/ calmodulin-dependent protein kinase II mediates activation of mitogen-activated protein kinase and cytosolic phospholipase A2 in norepinephrine-induced arachidonic acid release in rabbit aortic smooth muscle cells. *J Biol Chem* 1996; 271: 30149-30157.
31. EJ Nestler, BT Hope, KL Widnell. Drug addiction: a model for the molecular basis of neural plasticity. *Neuron* 1993; 11: 995-1006.
32. EJ Nestler, GK Aghajanian. Molecular and Cellular Basis of Addiction. *Science* 1997; 278: 58-63.
33. BY Qin, DX Wang, M Huang. The application of dihydroetorphine to detoxification of heroin addicts. *Regul Pept* 1994; 1 Supp: S293-S294.
34. SJ Shuster, M Riedl, X Li, L Vulchanova, R Elde. Stimulus-dependent translocation of opioid receptors to the plasma membrane. *J Neurosci* 1999; 19: 2658-2664.
35. CL Stucky, MS Gold, X Zhang. Mechanisms of pain. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001; 9821: 11845-6.
36. TR Tölle, A Berthele, J Schadrack, W Zieglgänsberger. Involvement of glutamatergic neurotransmission and protein kinase C in spinal plasticity and the development of chronic pain. *Progress in Brain Research.* 1996; 110: 193-206.
37. JT Williams, MJ Christie, O Manzoni. Cellular and synaptic adaptations mediating opioid dependence. *Physiol Ver* 2001; 811;: 299-343.
38. X Zhang, L Bao, U Arvidsson, R Elde, T Hokfelt. Localization and regulation of the d-opioid receptor in dorsal root ganglia and spinal cord of the rat and monkey: evidence for association with the membrane of large dense-core vesicles. *Neuroscience* 1998; 82: 1225-1242.