



UNIVERSIDAD DE MURCIA
Facultad de Medicina
Departamento de Farmacología



**Caracterización de los cambios
celulares y moleculares en el eje del
estrés durante la dependencia de
morfina**

Cristina Núñez Parra
2008

Memoria presentada para optar al grado de doctor con
“Mención de Doctorado Europeo”



La Tesis Doctoral titulada "Caracterización de los cambios celulares y moleculares en el eje del estrés durante la dependencia de morfina" es un compendio de trabajos previamente publicados.

Los artículos que constituyen el cuerpo de esta Tesis son los siguientes:

- ◆ Núñez C, Földes A, Laorden ML, Milanés MV, Kovács KJ (2007)
Activation of stress-related hypothalamic neuropeptide gene expression during morphine withdrawal
J Neurochem **101**: 1060-71

- ◆ Núñez C, Castells MT, Laorden ML, Milanés MV (2008)
Regulation of extracellular signal-regulated kinases (ERKs) by naloxone-induced morphine withdrawal in the brain stress system
N-S Arch Pharmacol **378**: 407-20

- ◆ Núñez C, Laorden ML, Milanés MV (2007)
Regulation of serine (Ser)-31 and Ser40 tyrosine hydroxylase phosphorylation during morphine withdrawal in the hypothalamic paraventricular nucleus and nucleus tractus solitarius-A₂ cell group: role of ERK_{1/2}
Endocrinology **148**: 5780-93.

- ◆ Núñez C, Földes A, Pérez-Flores D, García-Borrón JC, Laorden ML, Kovács KJ, Milanés MV (2009)
Elevated glucocorticoid levels are responsible for induction of tyrosine hydroxylase mRNA expression, phosphorylation, and enzyme activity in the nucleus of the solitary tract during morphine withdrawal
Endocrinology **150**: 3118-27



Cristina Núñez Parra



UNIVERSIDAD DE MURCIA
Facultad de Medicina
Departamento de Farmacología

M. Victoria Milanés Maquilón, Catedrática de Farmacología y **M. Luisa Laorden Carrasco**, Catedrática de Farmacología, del Departamento de Farmacología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Murcia,

CERTIFICAN:

Que la presente Tesis Doctoral titulada "**Caracterización de los cambios celulares y moleculares en el sistema cerebral del estrés durante la dependencia de morfina**", constituye el trabajo de investigación realizado bajo nuestra dirección, en el Grupo Farmacología Celular y Molecular de la Facultad de Medicina, por Dña. Cristina Núñez Parra desde el año 2002. Este trabajo pertenece al ámbito de la Neurofarmacología. Mediante distintas técnicas experimentales, se profundiza en el estudio de diferentes vías de señalización intracelular implicadas en los efectos observados en el sistema del estrés durante la dependencia de morfina.

Esta Tesis Doctoral reúne la calidad y el rigor científico necesarios para ser defendida en la Universidad de Murcia como requisito para que Dña. Cristina Núñez Parra aspire al Grado de Doctor y a la "**Mención de Doctorado Europeo**".

Murcia, 4 de Junio 2008

M. Victoria Milanés Maquilón



M. Victoria Milanés
Catedrática de Farmacología
Facultad de Medicina
Universidad de Murcia

M. Luisa Laorden Carrasco



M. Luisa Laorden
Catedrática de Farmacología
Facultad de Medicina
Universidad de Murcia



UNIVERSIDAD DE MURCIA
Facultad de Medicina
Departamento de Farmacología

M^a Luisa Laorden Carrasco, Catedrática de Farmacología de la Universidad de Murcia y Directora del Departamento de Farmacología,

HACE CONSTAR:

Que la Tesis Doctoral como Compendio de Publicaciones y con Mención de Doctorado Europeo titulada "**Caracterización de los cambios celulares y moleculares en el sistema cerebral del estrés durante la dependencia de morfina**" que presenta Doña Cristina Núñez Parra, ha sido realizada bajo la dirección de M^a Victoria Milanés Maquilón y M^a Luisa Laorden Carrasco y que el Departamento de Farmacología ha dado su conformidad para que se presente ante la Comisión de Doctorado.

En Murcia, a 4 de Junio de 2008

M. Luisa Laorden Carrasco

María Luisa Laorden Carrasco
Directora del Departamento



UNIVERSIDAD
DE MURCIA

VICERRECTORADO DE ESTUDIOS



D.^a CRISTINA NÚÑEZ PARRA

Vista la solicitud presentada el día 28 de abril de 2008 por D.^a Cristina Núñez Parra, con DNI número 34834697, sobre autorización para presentación de tesis doctoral como compendio de publicaciones con carácter previo a la tramitación de la misma en la Universidad de Murcia, le comunico que la Comisión de General de Doctorado, vistos:

- El informe previo del Departamento de Farmacología, responsable de la autorización de la tesis doctoral en fase de elaboración, de esta Universidad, y
- El visto bueno de la Comisión de Grupo de Áreas de Ciencias de la Salud,

resolvió, en su sesión de 15 de mayo de 2008, **ACCEDER** a lo solicitado por el interesado pudiendo, por lo tanto, presentar su tesis doctoral en la modalidad de compendio de publicaciones.

Lo que en cumplimiento del artículo 58 de la vigente Ley 30/1992, de Régimen Jurídico de las Administraciones Públicas y del Procedimiento Administrativo Común, de 26 de noviembre, se **notifica** a D.^a Cristina Núñez Parra, significándole que contra esta resolución, que pone fin a la vía administrativa, se podrá interponer potestativamente ante el mismo órgano que la ha dictado, recurso de reposición, en el plazo de un mes a contar desde el día siguiente a su notificación, de acuerdo con lo dispuesto en el art. 116 de la citada Ley.

Si no hiciera uso del recurso de reposición podrá interponer recurso contencioso-administrativo, en el plazo de dos meses desde la notificación de este acuerdo, en la forma establecida en la Ley 29/1998, de 13 de julio, reguladora de dicha Jurisdicción.

Murcia, 15 de mayo de 2008

Vicerrectora de Estudios y

Presidenta de la Comisión General de Doctorado



Concepción Palacios Bernal

El presente trabajo experimental ha dado lugar a las siguientes Comunicaciones a Congresos:

- **Sixth IBRO Congress of Neuroscience (Praga, 2003)**
Núñez C, Földes A, Tökési V, Laorden ML, Milanés MV, Kovács KJ.
Transcriptional responses to naloxone-precipitated morphine withdrawal in the hypothalamic paraventricular nucleus
- **European Opioid Conference (Visegrad, 2004)**
Núñez C, Laorden ML, Milanés MV
Regulation of tyrosine hydroxylase phosphorylation at Ser³¹ and Ser⁴⁰ in the hypothalamic paraventricular nucleus (PVN) during morphine withdrawal
- **Congress of the Federation of the European Pharmacological Societies (EPHAR) (Oporto, 2004)**
Núñez C, Laorden ML, Milanés MV
Activation of extracellular signal-regulated kinases_{1/2} (ERK_{1/2}) in the hypothalamic paraventricular nucleus (PVN) in morphine withdrawn rats
- **XI Congreso de la Sociedad Española de Neurociencia (Torremolinos, 2005)**
Núñez C, Laorden ML, Milanés MV
Regulación de la fosforilación de Tirosina Hidroxilasa (TH) en el Núcleo del Tracto Solitario (NTS) durante el síndrome de abstinencia a morfina
- **European Opioid Conference (Salamanca, 2006)**
Núñez C, Laorden ML, Milanés MV
Tyrosine Hydroxylase (TH) activation by ERK_{1/2} in the hypothalamic paraventricular nucleus (PVN) during morphine withdrawal
- **5th Forum of European Neuroscience (Viena, 2006)**
Núñez C, Laorden ML, Milanés MV
Regulation of Fos expression by ERK_{1/2} in the hypothalamic paraventricular nucleus (PVN) during morphine withdrawal
- **European Opioid Conference (Ferrara, 2008)**
Núñez C, Földes A, Kovács KJ, Laorden ML, Milanés MV
Effects of adrenalectomy on tyrosine hydroxylase gene expression in nucleus tractus solitarius-A₂ cell group during morphine withdrawal
- **6th Forum of European Neuroscience (Ginebra, 2008)**
Núñez C, Földes A, Markus V, Pérez-Flores D, Kovács KJ, Laorden ML, Milanés MV
Regulatory role of glucocorticoids on tyrosine hydroxylase (TH) phosphorylation and activity in nucleus tractus solitarius (NTS)-A₂ cell group and hypothalamic paraventricular nucleus (PVN) during morphine withdrawal

Cristina Núñez Parra ha sido beneficiaria de una **Beca de Colaboración** para la investigación, otorgada por la Universidad de Murcia por Resolución de 19 de diciembre de 2002, con cargo al **Proyecto para la Investigación en Red de Enfermedades Neurológicas. Drogodependencias (Instituto de Salud Carlos III)**. Posteriormente, desde Mayo de 2004 hasta Abril de 2008 ha disfrutado de una **Beca Predoctoral de Formación de Personal Investigador (FPI)**, otorgada por el **Ministerio de Educación y Ciencia** por Resolución de 13 de Mayo de 2004, asociada al Proyecto de Investigación SAF2003-00756. En 2007 (Febrero-Marzo) obtuvo una **Beca para estancias breves en el Extranjero, Ministerio de Educación y Ciencia**.

Durante el bienio 2002-2004 se realizaron los Cursos de Doctorado en el Programa “Ciencias Biomédicas Experimentales” de la Universidad de Murcia, con la obtención del Diploma de Estudios Avanzados (DEA).

Durante la realización de esta Tesis Doctoral se han llevado a cabo trabajos en colaboración con el Grupo de la Dra. Krisztina Kovács, Laboratory of Molecular Neuroendocrinology, Institute of Experimental Medicine, Academy of Sciences, Budapest, Hungría. Para el desarrollo de los mismos, se han realizado cinco estancias en dicho laboratorio, de un mes cada una, entre los años 2002-2008 (en el marco de un Proyecto de colaboración aprobado en la **9ª Comisión Mixta de Cooperación Científico-Técnica Hispano-Húngara, Ministerio de Asuntos Exteriores** y de una **Acción Integrada de Investigación Científica y Tecnológica entre España y Hungría**, Resolución de 14 de Marzo de 2006) mas otra estancia de dos meses en 2007 gracias a la obtención de una **Beca para estancias breves en el Extranjero**, otorgada por el Ministerio de Educación y Ciencia (Resolución de 12 de Abril de 2007).

La presente Tesis Doctoral ha sido financiada con las siguientes ayudas:

- Proyecto SAF/FEDER2003-00756, Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología, MEC:
Cambios adaptativos celulares y moleculares asociados con la dependencia de opioides
- Proyecto PI-52/00806/FS/01, Fundación Séneca, Consejería de Educación de Murcia:
Cambios adaptativos de la expresión genética en diferentes áreas del cerebro durante la tolerancia/dependencia a morfina
- Ministerio de Asuntos Exteriores, Subdirección General de Relaciones Científicas Internacionales. Proyecto bilateral hispano-húngaro:
Modificaciones en la expresión genética en sistema nervioso central durante la dependencia de morfina
- Investigación en Red de Enfermedades Neurológicas (Red CIEN). Instituto de Salud Carlos III:
Drogodependencias
- Proyecto HH2005-005 (Acciones Integradas), Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología:
Neuroendocrine, autonomic and metabolic changes in morphine dependent rats
- Proyecto SAF/FEDER2006/00331, Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología, MEC:
Cambios adaptativos en el eje del estrés asociados con la dependencia de morfina. Vías de señalización y expresión génica
- Proyecto SAF/FEDER2007/62758, Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología, MEC:
Implicación del CRF extrahipotalámico en la tolerancia/dependencia de morfina
- Proyecto PI-52/00806/FS/01, Fundación Séneca, Consejería de Educación de Murcia:
Implicación del CRF extrahipotalámico en la tolerancia/dependencia de morfina

Agradecimientos

En primer lugar deseo expresar mi agradecimiento a mis Directoras de Tesis, la Dra. M^a Victoria Milanés y la Dra. M^a Luisa Laorden, que no sólo me han enseñado ciencia durante el largo periodo que ha supuesto la realización de esta Tesis Doctoral, sino que su implicación conmigo ha ido mucho más allá desde el momento en que empecé a trabajar con ellas. Han sido un pilar fundamental en que apoyarme durante esta etapa de mi vida que, sobre todo en sus inicios, no fue fácil para mí a nivel personal. Ellas han intentado comprenderme en todo momento, y por ello les estaré siempre agradecida.

De Marivi admiro su labor investigadora, su pasión por la ciencia, y su tesón. Ha sido un ejemplo a seguir para mí. Ella, aparte de mi formación científica, también me ha enseñado que lo que parece imposible, con esfuerzo se puede hacer realidad, en la investigación, y también en la vida. Durante estos años he compartido con ella numerosos momentos que nunca voy a olvidar. Por todo ello, muchísimas gracias.

A Luisi tengo que darle las gracias, en primer lugar, por abrirme las puertas a la investigación, confiando en mí casi sin conocerme. Ella me ha enseñado a enfocar la ciencia de otro modo, sabiendo aligerar el peso que a veces ha supuesto la realización de esta Tesis y alentándome siempre en las ocasiones de desánimo. Son muchos también los momentos inolvidables compartidos con ella, y por tanto, mi más sincera gratitud.

I would like to express my gratitude to Dr. Krisztina Kovács. She gave me the chance to go to her lab in 2002, my first time in a lab abroad, and the experience was so good that I have come back a lot of times. There I have learnt many things. Without her help, a big part of this work would have been

impossible. She and all her group have done that all the time I have spent in Budapest, in the lab and away from it, I would feel as if I were at home, really. So, thanks so much to all of them: Anna, Ádám, Ildi, Balász, Vera, Otto, Mjiki, Kira, Szila... También muchísimas gracias a Antonia, una chica luchadora, con una historia impresionante, y con la que he pasado momentos divertidísimos en Budapest.

No me puedo olvidar de M^a Teresa Castells, a la que he llamado pidiendo ayuda en innumerables ocasiones durante la realización de esta Tesis y siempre ha tenido un rato para dedicarme con una sonrisa. Las mañanas en el SACE analizando resultados han sido mucho más llevaderas oyendo sus carcajadas de fondo. Trabajar con ella ha sido todo un placer, y también ha sido muy placentero el tiempo de ocio que hemos compartido.

Muchísimas gracias al Profesor José Carlos García-Borrón por su amabilidad y su inestimable ayuda cada vez que lo he necesitado.

Mi gratitud también a mis compañer@s. A Ana y Pilar, las cuales han estado siempre a mi lado. Ellas han sido quienes en realidad me han acompañado en cada paso que he dado durante todo este tiempo, brindándome su ayuda, y lo más importante de todo, su amistad. A Fátima, que desde que llegó al departamento también me ha ayudado, colaborando estrechamente conmigo, y ha completado el grupo de "las chicas". Y a Javi, que este último año ha estado ahí amenizando las largas horas de trabajo.

Muchas gracias a todos los miembros del Departamento de Farmacología que, de una manera u otra, han contribuido a que este trabajo haya podido salir adelante.

A Maria José, porque siempre ha estado conmigo, sacando tiempo para mí de donde muchas veces no lo ha tenido. Por soportarme, por permitirme casi lo inaceptable. En definitiva, por ser mi amiga incondicional. Muchísimas gracias, a ella y a su familia.

Muchísimas gracias a mis padres, que me han apoyado siempre en el largo periodo de realización de esta Tesis Doctoral, a pesar de que soy consciente del esfuerzo que les ha costado a veces. Este trabajo no podría haber sido posible sin ellos. Y muchísimas gracias a mi hermano que también ha estado conmigo cada vez que lo he necesitado.

Por último, no puedo acabar esta sección sin dedicarle un recuerdo muy especial a mi abuela, que se sentiría muy orgullosa de mí en este momento.



A mis padres

ABREVIATURAS

AC: Adenilato ciclasa

ACTH: Hormona adrenocorticotropa / Corticotropina

AMG: Amígdala

AMPc: Adenosín-monofosfato cíclico

AP-1: Activator protein-1

AVP: Arginina-Vasopresina

PKA: Proteín kinasa A

BLA: Amígdala basolateral

BSA: Albúmina de suero bovino

BH₄: Tetrahidrobiopterina

BNST: Núcleo de la estría terminal

CAMK: Proteín kinasas dependientes de Calcio-Calmodulina

CeA: Núcleo central de la amígdala

CRE: Elemento de respuesta al AMPc

CREB: Proteína de unión a CRE

CRF: Factor liberador de corticotropina

CRFR: Receptor de CRF

CPP: Preferencia condicionada de lugar

DA: Dopamina

DMSO: Dimetilsulfóxido

ERKs: Proteín kinasas reguladas por señales extracelulares

GABA: Ácido γ -aminobutírico

GC: Glucocorticoides

GR: Receptor de GC

GRE: Elemento de respuesta a GC

HHA: Hipotálamo-hipófisis-adrenal

hnRNA: RNA heteronuclear

IEG: Genes de expresión inmediata

KO: Knock-out

KPBS: Tampón fosfato sódico-potásico

LC: Locus coeruleus

MHPG: 3-metoxi-4-hidroxi-feniletilenglicol

MAPK: Proteín kinasas activadas por mitógenos

mRNA: RNA mensajero

NA: Noradrenalina

NAc: Núcleo accumbens

NPY: Neuropeptido Y

NTS: Núcleo del tracto solitario

OT: Oxitocina

PBS: Tampón fosfato sódico

pERK_{1/2}: ERK_{1/2} fosforilada

PET: Tomografía de emisión de positrones

PFC: Córtex prefrontal

PKC: Proteín kinasa C

PVN: Núcleo paraventricular

PVDF: Fluoruro de polivinilideno

SDS: Dodecil sulfato sódico

Ser: Serina

SNC: Sistema nervioso central

SON: Núcleo supraóptico

TBST: Tampón Tris-salino-tween 20

TH: Tirosina Hidroxilasa

TH pSer31: TH fosforilada en la Ser31

TH pSer40: TH fosforilada en la Ser40

THC: Tetrahidrocannabinol

VTA: Área tegmental ventral

VLM: Área ventrolateral del bulbo

ÍNDICE

I. Compendio de Artículos	<p>I.1 Activation of stress-related hypothalamic neuropeptide gene expression during morphine withdrawal</p> <p>I.2 Regulation of extracellular signal-regulated kinases (ERKs) by naloxone-induced morphine withdrawal in the brain stress system</p> <p>I.3 Regulation of Ser31 and Ser40 TH phosphorylation during morphine withdrawal in the hypothalamic PVN and NTS-A₂ cell group</p> <p>I.4 Elevated glucocorticoid levels are responsible for induction of tyrosine hydroxylase mRNA expression, phosphorylation, and enzyme activity in the nucleus of the solitary tract during morphine withdrawal</p>
II. Introducción.....	1
1. Neurobiología de la adicción.....	3
1.1. Mecanismos celulares y moleculares.....	4
1.1.1. Vías de señalización intraneuronal.....	5
1.1.2. Factores de transcripción y expresión génica.....	7
2. Circuitos neuronales implicados en la adicción.....	11
2.1. Vía mesocorticolímbica.....	14
2.2. Sistema cerebral del estrés.....	19
2.2.1. Sistema del CRF hipotalámico.....	20
2.2.2. Sistema del CRF extrahipotalámico.....	23
1.3. Vías Noradrenérgicas.....	25
I.2 Estrés y Adicción.....	29
III. Objetivos.....	35

IV. Material y Métodos.....	41
1. Animales y tratamientos.....	43
2. Adrenalectomía.....	44
3. Inmunocitoquímica.....	44
4. Hibridación <i>in situ</i>	46
5. Análisis de imagen.....	47
6. Western-blot.....	49
7. Medida de la actividad TH.....	49
8. Radioinmunoanálisis de corticosterona y ACTH.....	50
9. Análisis estadístico.....	50
V. Resultados.....	51
VI. Discusión.....	57
VII. Conclusiones.....	79
VIII. Bibliografía.....	85
IX. Memoria en Inglés: Cellular and molecular changes in stress-responsive system during morphine dependence.....	103
X. Anexo.....	189

I. COMPENDIO DE ARTÍCULOS

**I.1. ACTIVATION OF STRESS-RELATED
HYPOTHALAMIC NEUROPEPTIDE GENE
EXPRESSION DURING MORPHINE
WITHDRAWAL**

[Activation of stress-related hypothalamic neuropeptide gene expression during morphine withdrawal.](#)

Nunez C, Földes A, Laorden ML, Milanes MV, Kovács KJ.

J Neurochem. 2007 May;101(4):1060-71.

<http://www3.interscience.wiley.com/journal/118483906/abstract?CRETRY=1&SRETRY=0>

**I.2. REGULATION OF EXTRACELLULAR
SIGNAL-REGULATED KINASES (ERK_s) BY
NALOXONE-INDUCED MORPHINE
WITHDRAWAL IN THE BRAIN STRESS
SYSTEM**

[Regulation of extracellular signal-regulated kinases \(ERKs\) by naloxone-induced morphine withdrawal in the brain stress system.](#)

Núñez C, Castells MT, Laorden ML, Milanés MV.

Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. 2008 Oct;378(4):407-20

<http://www.springerlink.com/content/746463nt571515j7/>

**I.3. REGULATION OF SER31 AND SER40 TH
PHOSPHORYLATION DURING MORPHINE
WITHDRAWAL IN THE HYPOTHALAMIC PVN
AND NTS-A₂ CELL GROUP. ROLE OF ERK_{1/2}**

[Regulation of serine \(Ser\)-31 and Ser40 tyrosine hydroxylase phosphorylation during morphine withdrawal in the hypothalamic paraventricular nucleus and nucleus tractus solitarius-A2 cell group: role of ERK1/2.](#)

Núñez C, Laorden ML, Milanés MV.

Endocrinology. 2007 Dec;148(12):5780-93

<http://endo.endojournals.org/cgi/content/full/148/12/5780>

**I.4. ELEVATED GLUCOCORTICOID LEVELS
ARE RESPONSIBLE FOR INDUCTION OF
TYROSINE HYDROXYLASE MRNA
EXPRESSION, PHOSPHORYLATION, AND
ENZYME ACTIVITY IN THE NUCLEUS OF THE
SOLITARY TRACT DURING MORPHINE
WITHDRAWAL**

[Elevated glucocorticoid levels are responsible for induction of tyrosine hydroxylase mRNA expression, phosphorylation, and enzyme activity in the nucleus of the solitary tract during morphine withdrawal.](#)

Núñez C, Földes A, Pérez-Flores D, García-Borrón JC, Laorden ML, Kovács KJ, Milanés MV.

Endocrinology. 2009 Jul;150(7):3118-27.

<http://endo.endojournals.org/cgi/content/full/150/7/3118>

II. INTRODUCCIÓN

El desarrollo de estrategias farmacológicas destinadas a evitar las recaídas en el consumo de drogas constituye uno de los retos más importantes de la Farmacología actual. Por esta razón, el conocimiento y caracterización de las vías moleculares y celulares asociadas a las diferentes etapas de la adicción permitirá identificar dianas farmacológicas eficaces que podrán reducir los devastadores efectos que origina el consumo de drogas.

1. Neurobiología de la adicción

La adicción a drogas o sustancias de abuso, también conocida como dependencia de drogas, se define en la actualidad como un desorden neurológico crónico, con tendencia a la recaída, caracterizado por (a) búsqueda y consumo compulsivo de la droga, (b) pérdida del control sobre el consumo de la misma, y (c) aparición de un estado emocional negativo (por ejemplo disforia, ansiedad, irritabilidad) cuando no se tiene acceso a ésta [1]. La tolerancia y el síndrome de abstinencia a drogas pueden estar presentes en un sujeto adicto, pero no son elementos necesarios para la existencia de adicción. Sí es imprescindible la búsqueda persistente y compulsiva de la droga en detrimento de los placeres naturales [2].

El ciclo de la adicción comienza con el consumo puntual de la droga, que ejerce un efecto placentero (reforzador positivo), con lo cual dicho consumo se prolonga en el tiempo, pasando a ser crónico. Los efectos reforzadores positivos de las drogas se consideran como una de las primeras etapas de la dependencia [3]. Adicionalmente, su uso prolongado produce una serie de efectos aversivos, tanto fisiológicos como psicológicos (reforzadores negativos) si el consumo es interrumpido, lo cual resulta en el uso crónico de la sustancia de abuso para evitar la sintomatología negativa del síndrome de abstinencia [4, 5]. En muchos casos hay periodos de abstinencia y posteriores recaídas, lo cual pone de relieve

que esta enfermedad está presente durante toda la vida del individuo. Actualmente está aceptado que diferentes factores de tipo genético y ambiental contribuyen a la vulnerabilidad para entrar en el denominado ciclo de la adicción (Fig. 1) [6, 7].

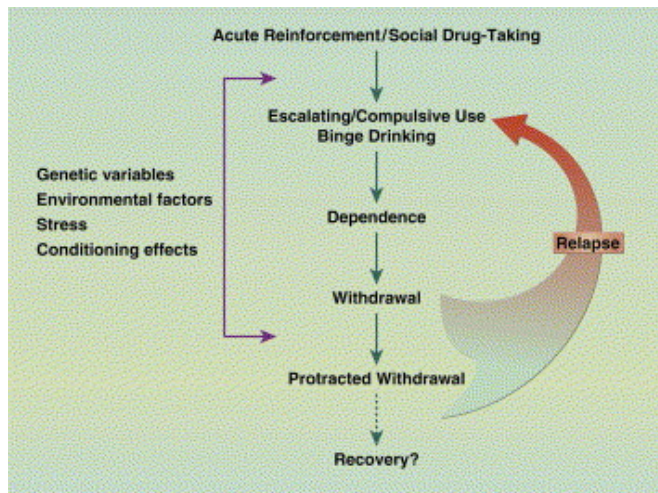


Figura 1. Fases de la adicción. El consumo de drogas comienza con el uso inicial de las mismas y sus efectos reforzadores agudos. Para algunos individuos, el uso pasa a ser compulsivo y finalmente llegan a desarrollar dependencia, síndrome de abstinencia y, en algunos casos, abstinencia prolongada. Las recaídas son frecuentes y el ciclo se repite. Tomado de Le Moal y Koob (2007).

Un reto importante de la investigación neurobiológica actual es identificar los fenómenos adaptativos neuronales, o plasticidad neuronal, en los neurocircuitos específicos que median la transición entre el uso ocasional y controlado de una droga, y el estado de pérdida de control sobre la búsqueda y consumo de la misma, que es lo que caracteriza a la adicción.

1.1. Mecanismos celulares y moleculares

La adicción es el resultado de cambios adaptativos a nivel celular y molecular en determinadas neuronas del cerebro causados por la exposición repetida a drogas. Estos cambios implican modificaciones en la maquinaria neuronal, lo cual modifica a su vez el funcionamiento de los circuitos neuronales en los cuales estas neuronas están integradas, teniendo como consecuencia final el desarrollo del comportamiento que caracteriza el estado de adicción [8].

Las drogas actúan sobre determinadas proteínas diana y las neuronas que las expresan. Puesto que cada droga tiene una estructura molecular distinta, las proteínas diana sobre las que actúan son también diferentes. La unión de la droga a su diana tiene como consecuencia una serie de cambios a nivel celular y molecular en la neurona sobre la que actúan, incluyendo cambios en rutas de señalización intracelular y en la expresión de determinados factores de transcripción, responsables en último término de los cambios adaptativos a largo plazo observados durante la adicción (Fig. 2).

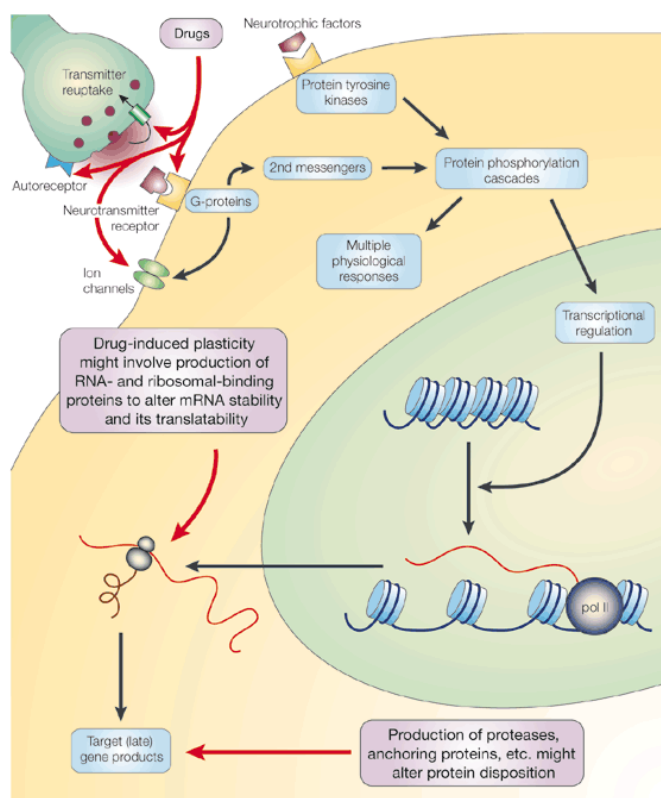


Figura 2. Los efectos de las sustancias de abuso en sus dianas sinápticas, que se localizan en la membrana celular, producen respuestas por medio de modificaciones en las rutas de señalización intracelular. Estas respuestas incluyen alteraciones en la expresión génica, mediadas por cambios en los factores de transcripción. Tomado de Nestler (2001).

1.1.1. Vías de señalización intraneuronal

Uno de los fenómenos adaptativos moleculares mejor caracterizado es la regulación al alza de la ruta de la adenilato ciclasa (AC)/adenosín-monofosfato cíclico (AMPC)/proteín kinasa A (PKA) en neuronas de varios núcleos del Sistema Nervioso Central (SNC). La administración aguda de opioides y de otras drogas de abuso inhibe esta ruta, mientras que la exposición crónica a las

mismas conduce a un aumento compensatorio de los niveles de AC/AMPC/PKA, el cual podría representar una forma de tolerancia fisiológica al consumo crónico de opioides (Fig. 3). La exposición crónica a opioides también induce modificaciones en otras rutas de señalización implicadas en una gran variedad de procesos reguladores que incluyen fosforilación de proteínas y regulación de la expresión génica [8-11].

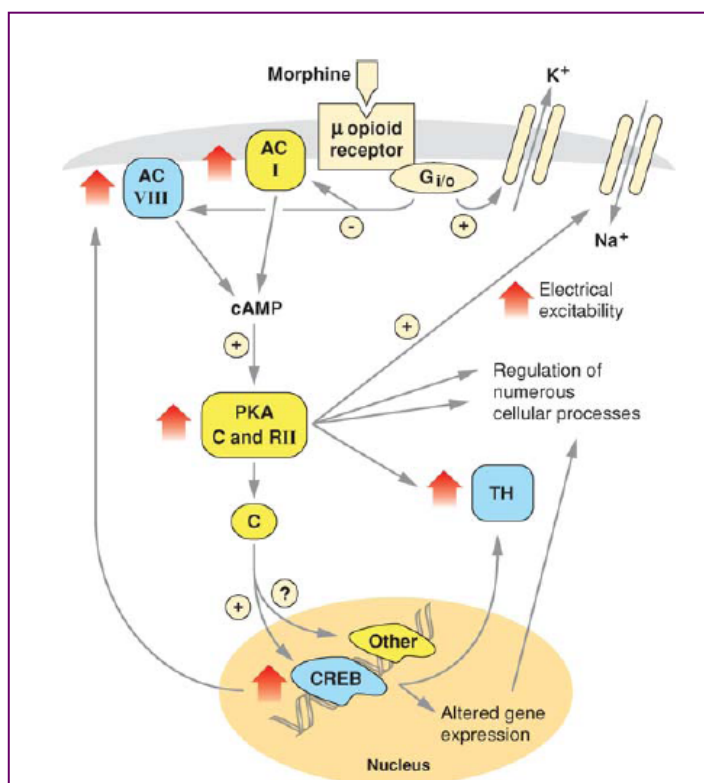


Figura 3. Esquema ilustrativo propuesto para explicar los efectos del tratamiento agudo con opioides sobre distintos núcleos del SNC (inhibición de AC y, por tanto, de las subunidades catalíticas de PKA, que no actuarán sobre el factor de transcripción CREB, entre otros). Las flechas rojas indican los mecanismos adaptativos que se desarrollan tras la exposición crónica a opioides. Tomado de Hyman et al (2006).

Resultados recientes indican que, durante el síndrome de abstinencia a morfina, se produce un incremento en la activación de la PKA en diferentes núcleos y áreas del SNC [12, 13]. Además, se ha podido caracterizar en los mismos núcleos, la implicación de diferentes isoformas de la proteína quinasa C (PKC) en los cambios adaptativos observados durante la administración crónica y el síndrome de abstinencia a morfina [9, 14, 15].

Las proteínas quinasas reguladas por señales extracelulares (ERK), miembros de la familia de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK), traducen una amplia variedad de estímulos extracelulares en diversas respuestas intracelulares, y están implicadas en diferentes procesos en el SNC, incluyendo la adicción a drogas [16, 17]. Así, numerosos estudios han establecido que la regulación de la ruta de las ERKs en las distintas regiones cerebrales es un factor clave en los procesos de tolerancia y dependencia tras la administración de distintas sustancias de abuso [9, 18, 19].

1.1.2. Factores de transcripción y expresión génica

Existen muchos mecanismos por los cuales la exposición repetida a drogas puede alterar la expresión génica en diferentes regiones del cerebro. Entre ellos se incluyen cambios en la velocidad de transcripción de genes, modificaciones del proceso de maduración del transcrito primario hasta mRNA maduro, variaciones del proceso de traducción de estos mRNA a proteínas, y alteraciones en el tráfico de proteínas maduras a sus lugares intracelulares de acción [11].

El factor de transcripción CREB (cAMP Response Element Binding Protein) se definió inicialmente como el encargado de mediar los efectos de la ruta AC/AMPC/PKA sobre la expresión génica. Cuando esta ruta es activada, la PKA actúa fosforilando el residuo de Serina (Ser) 133 de CREB, lo cual provoca la dimerización de este factor de transcripción. Estos dímeros se unen a la secuencia CRE (cAMP Response Element), situada en la región promotora de numerosos genes diana, y modifican la regulación de la transcripción de los mismos. Más recientemente se ha demostrado que otras proteínas quinasas, como las CaMK (Calcium/Calmodulin dependent protein kinases), proteínas quinasas dependientes de factores de crecimiento y ERKs entre otras, fosforilan a CREB en la Ser133 para regular así la transcripción de sus genes diana [20-22].

Muchos genes tienen la secuencia CRE en su región promotora, incluyendo genes que codifican neuropéptidos, (CRF: factor liberador de corticotropina, prodinorfina, proencefalina), enzimas encargadas de la síntesis de neurotransmisores (TH: tirosina hidroxilasa, enzima limitante de la síntesis de catecolaminas), receptores para neurotransmisores, proteínas de señalización celular y factores de transcripción (CREB, c-Fos, Jun D) [22, 23].

Las primeras evidencias de que CREB está implicado en diferentes etapas de la adicción provienen de estudios en el locus coeruleus (LC), el principal núcleo noradrenérgico del cerebro que normalmente regula los estados de atención. Esta región se considera un área importante en la dependencia y síndrome de abstinencia a opioides [8, 10]. Por otra parte, se ha evidenciado que CREB tiene un importante papel en los procesos adaptativos que se ponen en marcha tras el consumo crónico de drogas, ya que la expresión de CREB activada vía AMPc-PKA en el núcleo accumbens (NAc, principal núcleo diana de las aferencias dopaminérgicas en el sistema de recompensa) causado por el consumo crónico de drogas disminuye los efectos reforzadores positivos de cocaína, anfetaminas, opioides e incluso un reforzante natural como es la sacarosa [24-26]. Se ha postulado que ello es debido a que CREB promueve la transcripción del gen de dinorfina en el NAc, la cual se une a receptores opioides κ en las terminaciones de las neuronas dopaminérgicas que provienen del área tegmental ventral (VTA) e inhibe la liberación de dopamina (DA) (Fig. 4) [2, 27, 28]. Además, también se ha podido demostrar que ratones knock-out (KO) para el factor de transcripción CREB en diversos tejidos muestran menor dependencia y síndrome de abstinencia a morfina [29].

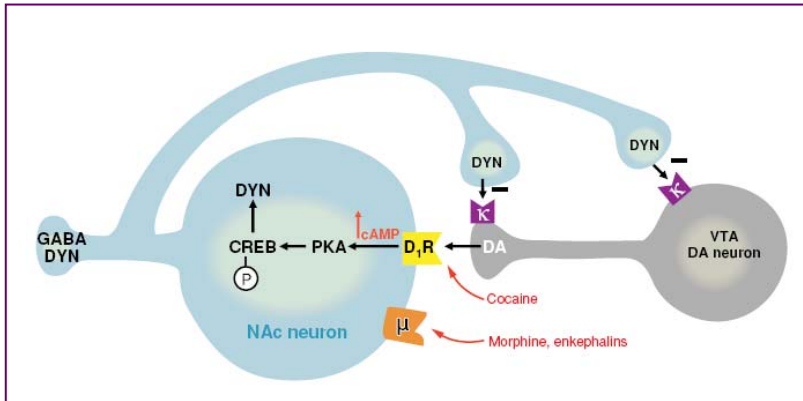


Figura 4. Esquema ilustrativo de la inducción de la expresión del gen de dinorfina mediado por CREB y la posterior estimulación de receptores opioides κ en el VTA. Tomado de Hyman et al (2007).

Los genes de expresión inmediata (IEG) son un tipo de genes cuya expresión es inducida rápidamente tras la exposición a determinados estímulos. En el estudio de la adicción son de particular interés las familias de IEG fos y jun, que codifican factores de transcripción. La familia Fos incluye c-Fos, FosB, Fra-1 y -2, y Δ FosB (splicing alternativo del gen de FosB, que pierde una porción del extremo C-terminal; [30]). Los miembros de la familia Fos heterodimerizan con factores de transcripción de la familia Jun (c-Jun, JunB y JunD) para formar el complejo AP-1 (Activator Protein-1). Este complejo se une a secuencias específicas de DNA presentes en la región promotora de distintos genes diana y actúa como activador o como represor de la transcripción génica, dependiendo del lugar específico de unión AP-1 y el promotor en cuestión (Fig. 5) [22].

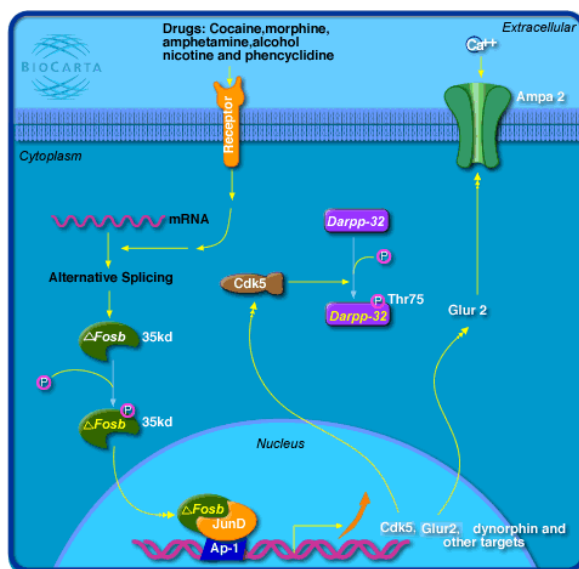


Figura 5. Esquema ilustrativo de cómo las drogas inducen la fosforilación y heterodimerización del factor de transcripción Δ FosB, modificando así la expresión de sus numerosos genes diana y, por tanto, la actividad neuronal. Tomado de Biocarta (consultado el 14/05/2008).

La administración aguda de la mayoría de las drogas de abuso induce de forma rápida y transitoria la expresión de varias proteínas de estas familias de IEG. Esta activación dura de 8 a 12 horas, tras las cuales vuelven al nivel basal debido a la inestabilidad del mRNA de estos factores de transcripción, así como a la inestabilidad de las proteínas en sí mismas. Sin embargo, Δ FosB es la única proteína de la familia Fos que, tras la exposición inicial a drogas de abuso, es inducida sólo en pequeña proporción. Además, en contraste con los demás factores de transcripción de esta familia, es una proteína muy estable, por lo que, tras la administración crónica de drogas, Δ FosB se acumula gradualmente y, después de un cierto tiempo, se convierte en la proteína Fos predominante en el NAc y otras áreas del SNC [31-34]. Adicionalmente, debido a su estabilidad, una vez inducido, Δ FosB permanece en estos núcleos durante semanas o meses después de la interrupción del consumo de drogas (Fig. 6). Por tanto, la acumulación de Δ FosB representa un nuevo mecanismo por el cual la exposición crónica a drogas de abuso puede conducir a cambios en la expresión génica que persisten durante largo tiempo tras el cese del consumo de las mismas [22].

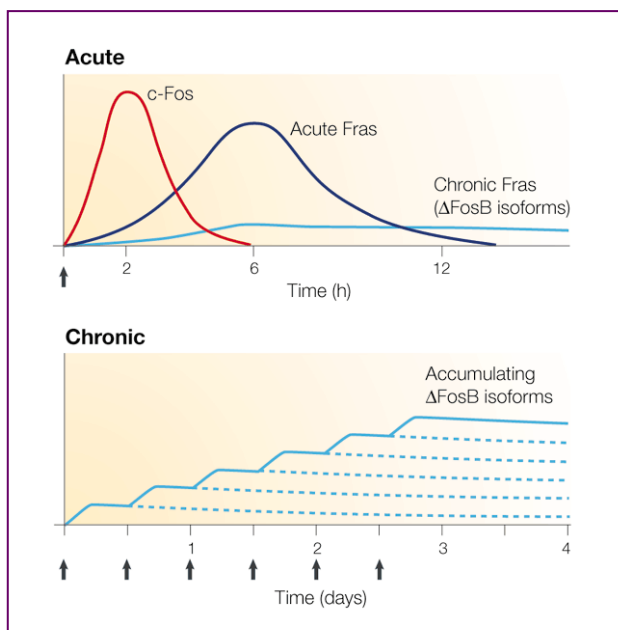


Figura 6. Esquema ilustrativo de la acumulación gradual de Δ FosB frente a la inducción rápida y transitoria de otras proteínas de la familia Fos tras la administración de sustancias de abuso (gráfica superior). Diferentes isoformas de Δ FosB (35 – 37 kDa) también son inducidas, aunque en baja proporción, pero persisten en el cerebro durante largos periodos debido a su estabilidad (gráfica inferior). Tomado de McClung et al (2004).

En la actualidad se han identificado numerosos genes con la secuencia AP-1 en su región promotora. Los más estudiados han sido genes que codifican péptidos del sistema opioide endógeno, como los de proencefalina y prodinorfina [35, 36]. Otras proteínas cuya expresión está regulada por Fos/AP-1 son algunas enzimas encargadas de la síntesis de neurotransmisores, como es el caso de TH [37]. Se ha sugerido también el gen de CRF como una diana potencial de la familia de factores de transcripción AP-1, a pesar de que aún no se ha podido caracterizar la unión del dímero Fos/Jun en esta secuencia. La vía propuesta para la activación de la expresión de este gen durante la adicción sería a través de CREB, cuya expresión es a la vez inducida por c-Fos, ya que contiene la secuencia AP-1 en su región promotora [36]. En resumen, las sustancias de abuso provocan cambios a largo plazo en los circuitos neuronales que median en la adicción. Estos cambios están causados a su vez por modificaciones en las rutas de señalización intracelular, que conducen a un aumento de la actividad de factores de transcripción en la región reguladora de sus genes diana (Fig. 7) [38].

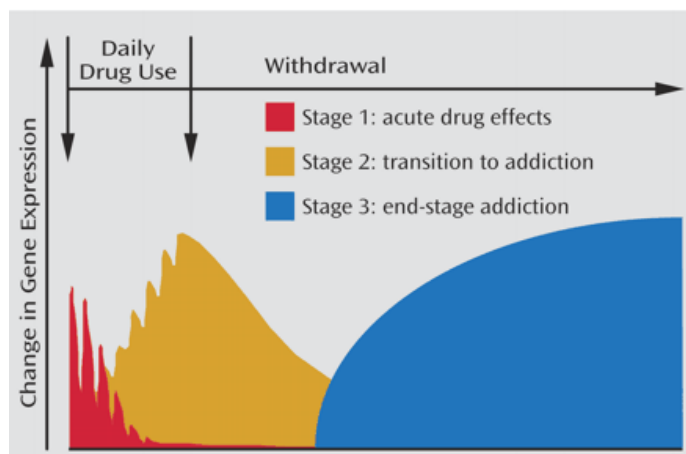


Figura 7. Cambios en la expresión génica en las diferentes etapas de la adicción. Tomado de Kalivas y Volkow (2005).

2. Circuitos neuronales implicados en la adicción

La adicción implica plasticidad a largo plazo en la actividad de circuitos neuronales que regulan dos estados emocionales opuestos: disminución de la función del sistema de recompensa, y aumento de la estimulación del sistema

anti-recompensa, también denominado sistema cerebral del estrés, que es el responsable de los estados aversivos que aparecen cuando el sujeto no tiene acceso a la sustancia de abuso [1].

El principal objetivo de investigación de la neurobiología de la adicción en las últimas décadas ha sido el sistema dopaminérgico mesocorticolímbico o sistema de recompensa, que es el responsable de los efectos reforzadores positivos de las drogas, ya que hay evidencias de que todas las sustancias de abuso activan este circuito, incrementando así la liberación de DA. Además, se ha propuesto un importante papel del sistema opioide endógeno en los efectos reforzadores positivos de las drogas, independientemente de la acción de la DA [39], lo cual sugiere que existen múltiples vías que, paralelamente, están implicadas en estos procesos [40].

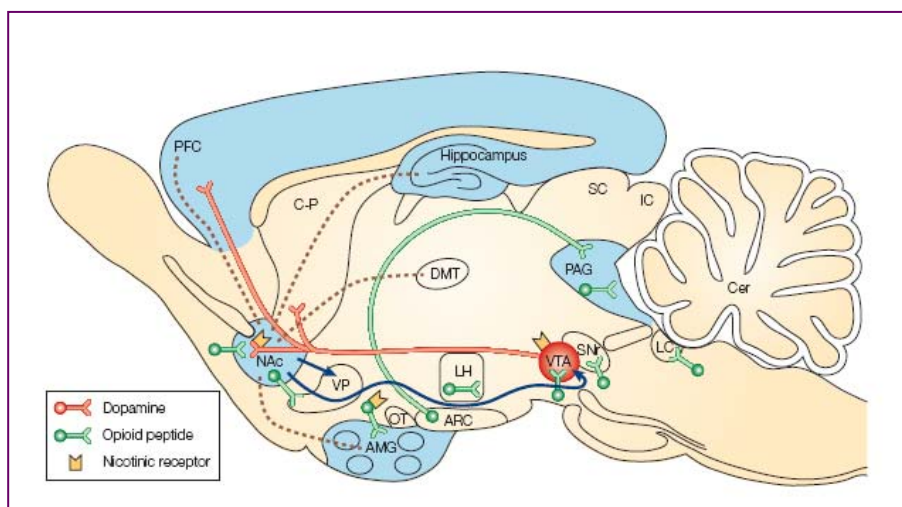


Figura 8. Circuitos neuronales implicados en la adicción. NAc: núcleo accumbens; VTA: área tegmental ventral. AMG: amígdala; PFC: córtex prefrontal. Tomado de Nestler (2001).

Más recientemente, se han identificado otras áreas cerebrales implicadas en los efectos reforzadores de las drogas y relacionadas con la amígdala (AMG) [41]. A este sistema se le ha denominado amígdala extendida, e incluye no sólo al núcleo central de la amígdala (CeA), sino también al núcleo de la estría

terminal (BNST) y a una zona de transición localizada en la corteza (shell) del NAc (Fig. 8) [40].

Los sustratos neurológicos y mecanismos neurofarmacológicos implicados en los efectos emocionales aversivos que aparecen durante el síndrome de abstinencia a drogas pueden implicar la interrupción de los procesos desencadenados en los circuitos neuronales encargados de mediar en los efectos reforzadores positivos de las mismas. Por ejemplo, se ha comprobado que durante el síndrome de abstinencia agudo a drogas se produce una elevación en el umbral del placer en estos sistemas [42].

Recientemente se ha postulado que los sistemas neuroquímicos encargados de la respuesta del organismo al estrés podrían estar también implicados en los procesos adaptativos que se ponen en marcha en el SNC para restaurar la función normal del mismo durante el consumo crónico de drogas. La regulación del sistema cerebral del estrés, que incluye tanto al eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (HHA) como a la amígdala extendida, y cuyo común neurotransmisor principal es CRF, está alterada durante la administración crónica de sustancias de abuso, teniendo como resultado un aumento en la liberación de hormona adrenocorticotropa (ACTH), glucocorticoides (GC) y CRF hipotalámico y extrahipotalámico durante el síndrome de abstinencia a la mayoría de drogas [42, 43]. Además, dicho síndrome también incrementa la actividad de las vías norarenérgicas que inervan al CeA y al núcleo paraventricular hipotalámico (PVN, localización principal de neuronas de CRF en el hipotálamo) [44, 45], disminuyendo a su vez los niveles funcionales de neuropéptido Y (NPY) en la amígdala extendida [46]. Todos estos procesos parecen ser, en parte, los implicados en los efectos emocionales negativos que se desencadenan durante el síndrome de abstinencia, lo cual le confiere al CRF un importante papel en el incremento de

la autoadministración de drogas de abuso asociado con la dependencia, como se comentará posteriormente.

2.1. Vía mesocorticolímbica

En la pasada década, la mayoría de estudios sobre adicción se han realizado en el sistema mesocorticolímbico, que incluye especialmente a las neuronas dopaminérgicas del VTA que inervan al NAc y al córtex prefrontal (PFC). Además de la DA, en el sistema mesocorticolímbico también se ha descrito el importante papel de otros neurotransmisores/neuromoduladores en los efectos reforzadores positivos de las drogas. Entre ellos se encuentran los péptidos opioides, el ácido γ -aminobutírico (GABA), glutamato, endocannabinoides y serotonina (Tabla 1) [40].

Tabla 1. Sustratos neurobiológicos que median en los efectos reforzadores positivos de las drogas.

Drug of abuse	Neurotransmitter	Site
Cocaine and amphetamines	Dopamine	Nucleus accumbens
	γ -aminobutyric acid	Amygdala
Opiates	Opioid peptides	Nucleus accumbens
	Dopamine	Ventral tegmental area
	Endocannabinoids	
Nicotine	Nicotinic acetylcholine	Nucleus accumbens
	Dopamine	Ventral tegmental area
	γ -aminobutyric acid	Amygdala
	Opioid peptides	
Δ^9 -Tetrahydrocannabinol	Endocannabinoids	Nucleus accumbens
	Opioid peptides	Ventral tegmental area
	Dopamine	
Alcohol	Dopamine	Nucleus accumbens
	Opioid peptides	Ventral tegmental area
	γ -aminobutyric acid	Amygdala
	Endocannabinoids	

Tomado de Koob y Le Moal (2008)

El VTA recibe numerosas inervaciones glutamatérgicas, GABAérgicas, colinérgicas y noradrenérgicas. La mayoría de las aferencias glutamatérgicas provienen del PFC y el BNST, y provocan un aumento en la liberación de DA. La principal inervación GABAérgica del VTA proviene del NAc y de

interneuronas del VTA, inhibiendo así la liberación de DA. También son inhibitorias las aferencias serotoninérgicas que provienen del núcleo del rafe hasta el VTA. Las aferencias noradrenérgicas que inervan al VTA provienen del LC, y se ha observado que la actividad de las neuronas dopaminérgicas del VTA parece depender de la duración de la activación de sus receptores noradrenérgicos [47].

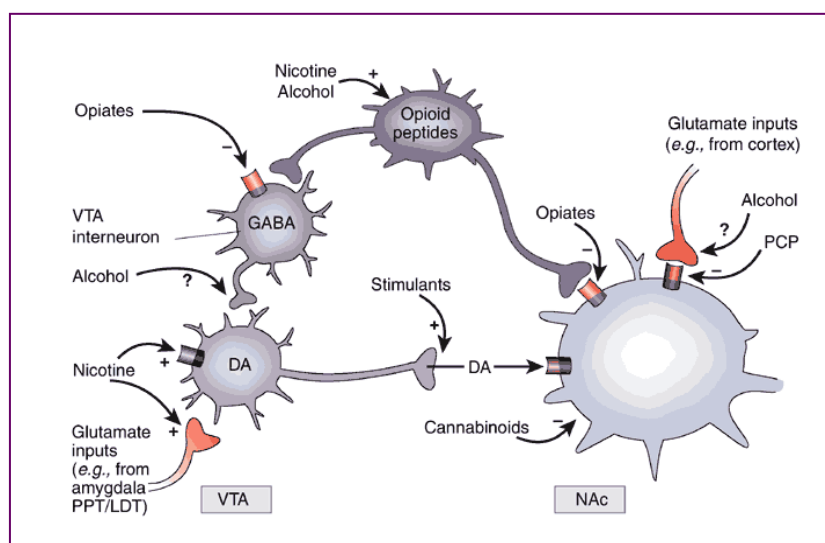


Figura 9. Esquema simplificado de que muestra la convergencia de los efectos agudos de las diferentes drogas de abuso sobre el circuito VTA-NAc. Las distintas sustancias, a pesar de sus diferentes mecanismos de acción, provocan un aumento de DA en el NAc. Tomado de Nestler (2005).

En la actualidad hay evidencias suficientes de que todas las drogas convergen en un circuito neuronal común en este sistema (Fig. 9). Cada sustancia administrada de forma aguda activa la transmisión dopaminérgica desde el VTA hasta el NAc y el PFC, de forma directa o indirecta [48]. Los estimulantes, como la cocaína, bloquea la recaptación de DA. Por otra parte, los opioides y el etanol actúan inhibiendo interneuronas GABAérgicas del VTA, lo que a su vez desinhibe a las neuronas dopaminérgicas del VTA y por tanto se incrementa la liberación de DA, mientras que la nicotina actúa sobre receptores colinérgicos de las propias neuronas dopaminérgicas estimulando así la

liberación de este neurotransmisor. El mecanismo de acción de los cannabinoides aún no está totalmente clarificado, pero se ha postulado que actúan estimulando receptores CB1 en el VTA, inhibiendo la liberación presináptica de GABA y aumentando así la liberación de glutamato [47]. Además, otras sustancias, como la nicotina o el etanol parecen activar los sistemas opioide y endocannabinoide endógenos en este circuito neuronal, como demuestran experimentos en ratones KO para los receptores cannabinoide y opioide en los que se reducen los efectos agudos de distintas sustancias de abuso [5, 48, 49]. En el caso de los opioides, estos pueden actuar sobre tres tipos de receptores en el SNC, denominados μ , δ y κ . Pero se ha comprobado que es fundamentalmente su interacción con receptores opioides μ la que parece mediar en sus propiedades reforzadoras [50].

La DA liberada actúa sobre receptores D₁ de las neuronas del NAc, la PFC y la AMG, que están acoplados positivamente a proteínas G_s, activando así la ruta del AMPc/PKA/CREB y, por tanto, la expresión de importantes genes implicados en la adicción, como los de c-fos o prodinorfina. El papel de los receptores presinápticos D₂ ha sido ampliamente estudiado mediante la administración de agonistas y antagonistas de los mismos y ha dado lugar a resultados muy complejos. Estudios de imagen (PET, tomografía de emisión de positrones) han revelado que la administración crónica de etanol, cocaína, metanfetamina y heroína disminuye el número de estos receptores [28, 51]. Muy recientemente también se ha postulado un papel importante de los receptores D₃ en la dependencia de drogas. Mediante la administración de antagonistas selectivos de estos receptores se ha comprobado su implicación en los efectos reforzadores positivos de las drogas, en el consumo crónico de las mismas, y en las recaídas inducidas por estrés o estímulos asociados a la sustancia de abuso [52].

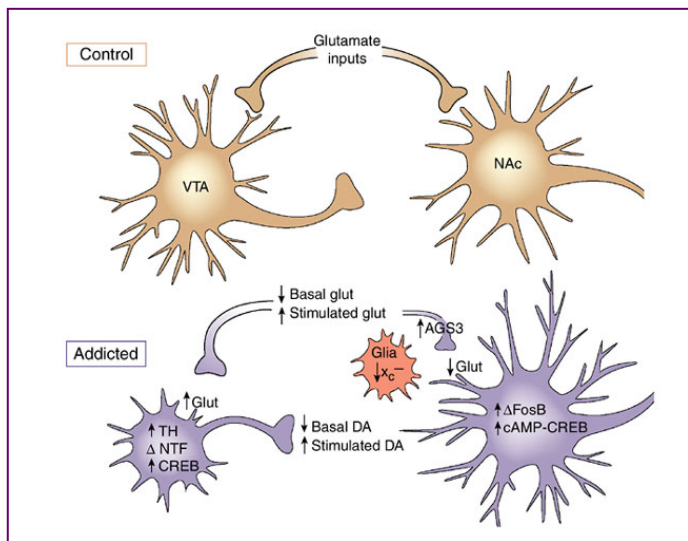


Figura 10. Esquema simplificado de las adaptaciones comunes tras la administración crónica de diferentes drogas en el sistema mesocorticolímbico. Tomado de Nestler (2005).

Al igual que la administración aguda de todas las sustancias de abuso provoca un aumento de la transmisión dopaminérgica desde el VTA al NAc y el PFC, también todas ellas provocan cambios neuroadaptativos comunes en este sistema tras su administración crónica. Después del uso continuado de sustancias de abuso, se produce un desequilibrio en este circuito neuronal, lo cual se puede considerar una respuesta homeostática a la activación continua de este sistema (Fig. 10). Estos cambios adaptativos a nivel del PFC conducen a alteraciones que reducen el control del comportamiento y la toma de decisiones (hipofrontalidad), lo cual resulta en adaptaciones negativas en el aprendizaje asociado al consumo de drogas, existiendo por tanto un solapamiento entre las áreas implicadas en la adicción y en la memoria [50].

Durante el consumo crónico de cocaína, opioides, anfetaminas, nicotina y otras drogas, se produce un incremento en los niveles de TH en el VTA, pero bajo determinadas condiciones experimentales, en las terminales de estas neuronas a nivel del NAc, la actividad de esta enzima decrece, lo cual podría estar relacionado con la disminución de la función dopaminérgica que se observa tras el consumo crónico de estas sustancias [48]. También se ha comprobado que el consumo crónico de determinadas sustancias, como

cocaína, puede sensibilizar al sistema mesocorticolímbico, lo que se traduce en una mayor transmisión dopaminérgica en respuesta a la droga en cuestión o a cualquier estímulo relacionado con la misma [53, 54].

En estudios de imagen (PET) con cerebros de adictos humanos se ha podido constatar que, tras largos periodos sin consumir o durante el síndrome de abstinencia a drogas, se produce una disminución en los receptores D₂, así como un descenso en la actividad de la PFC [55]. Se ha sugerido además que la disminución de la función de los neurotransmisores implicados en la recompensa tras el consumo de drogas, podría estar relacionada con el estado motivacional negativo asociado con el síndrome de abstinencia agudo y podría desencadenar cambios bioquímicos a largo plazo que contribuirían a los síntomas de la abstinencia y a las recaídas (Tabla 2).

Tabla 2. Neurotransmisores implicados en los efectos emocionales aversivos durante el síndrome de abstinencia a drogas.

Neurotransmitter	Functional effect
↓ Dopamine	“Dysphoria”
↓ Serotonin	“Dysphoria”
↓ γ -Aminobutyric acid	Anxiety, panic attacks
↓ Neuropeptide Y	Antistress
↑ Dynorphin	“Dysphoria”
↑ Corticotropin-releasing factor	Stress
↑ Norepinephrine	Stress

Tomado de Koob y Le Moal (2008).

Por tanto, la exposición aguda a drogas provoca un aumento en la actividad del sistema de recompensa y también del sistema cerebral del estrés. Cuando el consumo pasa a ser crónico y se llega al estado adictivo, se produce una disminución de la actividad del sistema mesocorticolímbico mientras que el sistema del estrés pasa a estar hiperactivado. La abstinencia prolongada se caracteriza por la vuelta al estado normal de la actividad del sistema de recompensa, pero el sistema cerebral del estrés presenta una hiperactividad

residual, que parece ser la responsable de las recaídas en el consumo durante esta fase (Fig 11) [5].

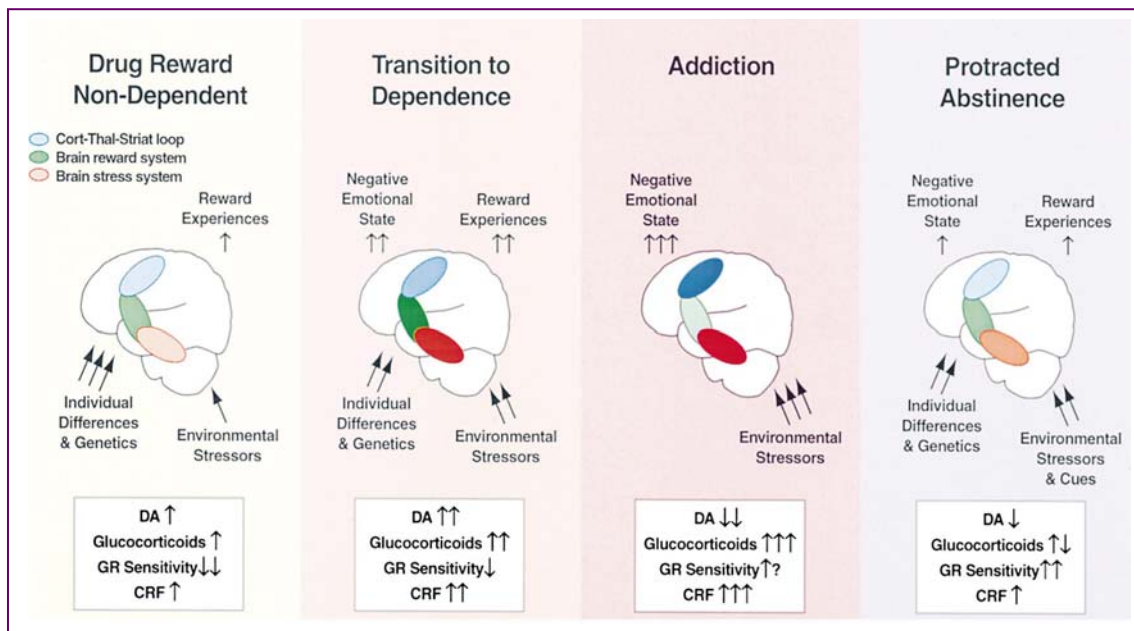


Figura 11. Esquema representativo de la transición desde el consumo inicial de la droga, hasta la adicción y la abstinencia. Tomado de Koob y Le Moal (2001).

2.2. Sistema cerebral del estrés

Existen numerosos estudios que indican que todas las drogas de abuso, además de provocar cambios adaptativos en el sistema de recompensa, producen alteraciones en el sistema cerebral del estrés [43, 56, 57]. Estas modificaciones persistentes en este circuito, ya sea a nivel de los sistemas de neurotransmisores, a nivel de receptores o a nivel hormonal, pueden representar mecanismos neuronales compensatorios para restablecer la función homeostática en presencia de drogas. Las alteraciones en el sistema cerebral del estrés podrían contribuir significativamente al estado emocional negativo característico del síndrome de abstinencia agudo a drogas así como a la elevada sensibilidad frente a estímulos estresantes, pudiendo ser ambas situaciones causantes de la mayor vulnerabilidad a la recaída durante la abstinencia a drogas en humanos [50, 58, 59].

El CRF es liberado por dos regiones cerebrales diferentes pero conectadas entre sí y que forman lo que se ha denominado Sistema Cerebral del Estrés. El Sistema Cerebral del Estrés hipotalámico está formado por el eje HHA, donde las neuronas de CRF localizadas en la región parvocelular del PVN regulan la liberación de ACTH por la hipófisis y la secreción de GC por la corteza adrenal. En el Sistema Cerebral del Estrés extrahipotalámico las neuronas de CRF están localizadas en el CeA y en el BNST e inervan al LC, incrementando su actividad, lo cual resulta en un aumento de la liberación de NA, que a su vez aumenta la actividad del BNST y CeA. Por otra parte se ha comprobado que existe una interconexión funcional entre las neuronas de CRF del PVN y el bucle noradrenérgico ventral, que comprende al núcleo del tracto solitario (NTS) y el área ventrolateral del bulbo (VLM) [28].

El Sistema Cerebral del Estrés puede contribuir tanto a la vulnerabilidad al consumo de drogas en las primeras fases de la adicción, como a la vulnerabilidad a la recaída tras el consumo crónico. El eje HHA parece tener más importancia en el inicio del consumo de sustancias de abuso y el mantenimiento de este comportamiento, mientras que el sistema del estrés extrahipotalámico parece tener más implicación en los aspectos motivacionales adversos durante la abstinencia prolongada (ansiedad, disforia, etc) y en la recaída en el consumo debido al estrés [28].

2.2.1. Sistema de CRF hipotalámico

El PVN hipotalámico, que constituye el ápex del eje HHA (Fig. 12), comprende dos regiones, la región magnocelular, cuyos neuropéptidos más importantes son la Arginina-Vasopresina (AVP) y la oxitocina (OT), y la región parvocelular, que es la principal localización de las neuronas de CRF hipotalámico. Además, en esta última región también se sintetiza y libera AVP. Este neuropéptido tiene la capacidad de potenciar la acción del CRF sobre la

adenohipófisis para la liberación de ACTH, y por lo tanto también está implicado en las respuestas del eje HHA ante estímulos estresantes [60-62].

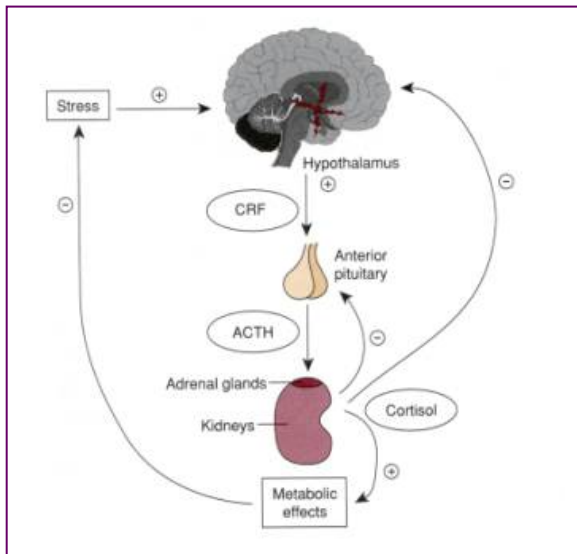


Figura 12. Representación del eje HHA. En situaciones de estrés, el PVN libera CRF, lo cual provoca la secreción de ACTH por la hipófisis. La ACTH es transportada hasta la glándula adrenal donde estimula la liberación de GC. La liberación de GC ejercen un efecto de retroalimentación negativo sobre el PVN y la hipófisis, disminuyendo la liberación de CRF y ACTH. Tomado de <http://www.montana.edu> (15/05/2008).

La región parvocelular del PVN se puede subdividir a su vez en diferentes regiones (Fig. 13). La zona medial parvocelular (mdp) envía proyecciones de CRF a la eminencia media induciendo así la liberación de ACTH y GC, mientras que otros grupos neuronales que están localizados en las áreas dorsal parvocelular (dp) y ventral parvocelular medial (mpv) envían proyecciones a otras zonas del hipotálamo, a núcleos bulbares y la médula espinal, de forma que influyen las respuestas del sistema nervioso autónomo [63].

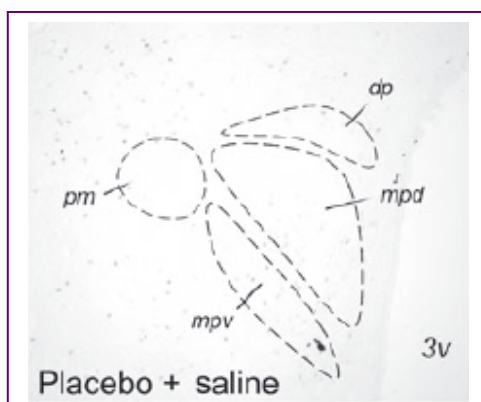


Figura 13. Esquema de las subdivisiones del PVN: dp, dorsal parvocelular; mdp, zona dorsal del área medial parvocelular; mpv, zona ventral del área parvocelular medial; pm, subdivisión magnocelular posterior; 3V, tercer ventrículo.

Numerosos estudios en modelos animales y en humanos han puesto de

manifiesto la implicación del eje HHA en diferentes etapas de la adicción. Los elevados niveles de GC en plasma debidos a una hiperactividad de dicho eje durante el estrés crónico aumentan la sensibilidad del sistema dopaminérgico mesocorticolímbico a los efectos reforzadores de drogas como los psicoestimulantes, incrementando así el riesgo de desarrollar adicción [64]. Este efecto es mediado por los GC, que actúan sobre el VTA y estimulan la liberación de DA [64-67].

Trabajos previos de nuestro grupo de investigación han descrito un aumento de los niveles plasmáticos de corticosterona tras la administración aguda de morfina [44], así como tras el síndrome de abstinencia inducido por la administración de naloxona [68], lo que implica un aumento de la actividad del eje HHA. Además, en otros estudios se ha puesto de manifiesto la alteración de numerosas rutas de señalización intracelular y de la expresión génica en el PVN durante el consumo agudo y crónico de morfina, así como durante el síndrome de abstinencia. Así, se ha podido constatar un incremento en la expresión de c-Fos en el PVN tras la exposición aguda a morfina [69], mientras que, durante la exposición crónica a la misma, la expresión de esta proteína baja a su nivel basal, y vuelve a aumentar durante el síndrome de abstinencia a morfina inducido por la administración de naloxona [70-72]. Por otra parte, se han caracterizado varias de las rutas de proteínas quinasas implicadas en el aumento de la expresión de este factor de transcripción en el PVN durante el síndrome de abstinencia a morfina. Se ha podido demostrar que la administración crónica de un inhibidor de la PKC (calfostin C) inhibe parcialmente el aumento de la expresión de c-Fos tras la administración de naloxona a ratas dependientes de morfina. Resultados similares se obtuvieron tras la administración crónica de un inhibidor selectivo de la PKA, el HA-1004, y un antagonista de los canales de calcio tipo L, la nimodipina [13, 14, 70, 73]. Todo ello indica la gran complejidad de los cambios celulares y moleculares observados durante la dependencia de

morfina a nivel del eje HHA.

Con respecto a la expresión de CRF y AVP durante la exposición crónica y síndrome de abstinencia a opioides, estudios previos de nuestro grupo de investigación han puesto de manifiesto que durante el tratamiento crónico con morfina se produce una disminución de los niveles de mRNA para CRF en el PVN, mientras que no se observan cambios en los niveles de mRNA para AVP. Treinta minutos después de la administración de naloxona a ratas dependientes de morfina se produce una disminución aún mayor en los niveles de mRNA para CRF, mientras que los niveles de mRNA para AVP no se ven alterados [74, 75]. Sin embargo, en otros estudios no se observaron cambios en los niveles de mRNA para CRF en el PVN durante la exposición crónica de opioides [76, 77], o se observa un aumento de los mismos [78, 79]. También se han obtenido datos dispares tras el síndrome de abstinencia a morfina, ya que frente a resultados indicando una disminución de los niveles de mRNA para CRF [75], también se han descrito otros en los que no se observan cambios en dichos niveles [77].

2.2.2. Sistema de CRF extrahipotalámico

Como se ha comentado anteriormente, la amígdala extendida incluye al CeA, BNST y a una zona de transición localizada en la corteza (shell) del NAc, y recibe inervación procedente de otras estructuras del sistema límbico, como el hipocampo, la amígdala basolateral (BLA) y el hipotálamo lateral. Este sistema envía proyecciones, entre otras regiones, al VTA, a varios núcleos noradrenérgicos (LC, NTS y VLM) y al hipotálamo lateral [5]. Las regiones de la amígdala extendida contienen elevadas cantidades de terminales de CRF, cuerpos celulares y receptores, y forman parte de lo que se ha llamado Sistema Cerebral del Estrés/CRF extrahipotalámico (Fig. 14) [40].

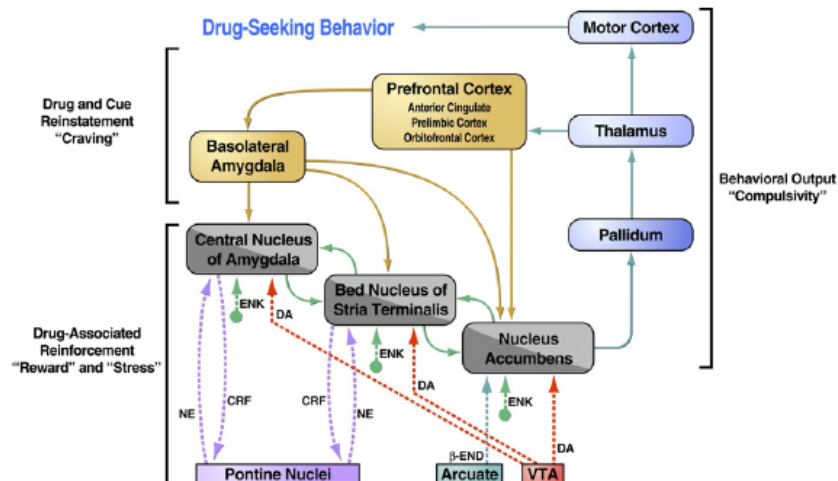


Figura 14. Representación esquemática de la amígdala extendida junto con otros circuitos neuronales implicados en la adicción. Tomado de Le Moal y Koob (2007).

Numerosos estudios han demostrado la implicación del sistema de CRF extrahipotalámico en la regulación de las respuestas asociadas con el miedo y el estrés [80]. Se han relacionado los núcleos de la amígdala extendida y sus sistemas de neurotransmisores con los efectos reforzadores positivos del consumo de drogas, así como con los efectos reforzadores negativos asociados al síndrome de abstinencia a las mismas. La administración de antagonistas de receptores D_1 tanto en el NAc, como en el CeA y en el BNST es particularmente efectiva en el bloqueo de la autoadministración de cocaína [81, 82], aunque su papel no está totalmente definido.

Durante el síndrome de abstinencia a alcohol, opioides, tetrahidrocannabinol (THC) y cocaína se produce una hiperactivación del sistema de CRF extrahipotalámico, con un aumento en la liberación de CRF en el CeA y BNST de animales dependientes [45, 83-85]. De esta forma, la amígdala extendida podría ser el circuito neuronal responsable de los efectos negativos sobre el sistema mesocorticolímbico producidos por el estrés, y que hacen que el adicto consuma la droga de forma compulsiva [40]. En la actualidad hay

evidencias suficientes que sugieren que la liberación de CRF por el CeA juega un papel fundamental en la autoadministración de sustancias de abuso, como etanol [83], heroína [40], cocaína [86] o nicotina [40, 87].

El NPY también ha sido implicado en los procesos adaptativos neuronales asociados con la adicción. Este neuropéptido es muy abundante en áreas implicadas en la dependencia de drogas, como la AMG entre otras [88], y sus efectos agudos suponen una supresión de las respuestas a la ansiedad y también sedación [89]. En el contexto de adicción, el NPY se debe considerar como un inhibidor de la actividad neuronal [90], y se ha sugerido que el NPY y CRF podrían tener acciones antagónicas en la regulación de las respuestas ante el estrés [89]. Así, se podría especular que durante el síndrome de abstinencia, y quizá durante largos periodos sin consumir drogas, junto con el aumento en la actividad de CRF habría una disminución en la actividad del NPY, de forma que se potenciaría de este modo la contribución del sistema cerebral del estrés extrahipotalámico a la alostasis en el sistema de recompensa [5].

2.3. Vías Noradrenérgicas

En la actualidad hay numerosos estudios que avalan la importancia de la función noradrenérgica en diferentes etapas de la adicción. Las neuronas noradrenérgicas del LC regulan la actividad del sistema dopaminérgico de recompensa [28]. Por una parte, ejercen su acción sobre el VTA, donde estimulan la liberación de DA mediante el estímulo de receptores α_1 -adrenérgicos [91], pero además también regulan la función de el PFC, de forma directa mediante la liberación de NA, y también de forma indirecta induciendo la liberación de DA procedente de las neuronas del VTA [92]. Cuando la liberación de NA es bloqueada en el PFC también se atenúa la liberación de DA, mientras que cuando el bloqueo de la liberación de NA en esta región es crónico, se produce un mecanismo compensatorio en el sistema dopaminérgico

a través de un aumento de afinidad de los receptores dopaminérgicos postsinápticos [93]. Este proceso resulta en un aumento de la sensibilidad a drogas mediante el incremento de los niveles de DA en la sinapsis [28].

La administración de agonistas α_2 -adrenérgicos es capaz de bloquear la autoadministración de etanol [94]. Adicionalmente, en ratones KO para los receptores α_1 -adrenérgicos no se ha observado la autoadministración de cocaína o morfina que presentan los ratones silvestres [95]. Igualmente, en estudios de preferencia condicionada de plaza (CPP) realizados con morfina se ha observado que la preferencia es bloqueada por la administración de antagonistas α_1 y agonistas α_2 (que inhiben la liberación de NA mediante la activación de receptores presinápticos), mientras que es incrementada por la administración de antagonistas α_2 [96, 97]. Todos estos datos indican que los efectos reforzadores positivos de las drogas de abuso son de alguna manera dependientes de la función noradrenérgica [28].

Varios estudios también apoyan la implicación del LC en la tolerancia y dependencia a opiodes. Uno de los primeros estudios realizados en monos demostró que la electroestimulación de las neuronas del LC producía los mismos síntomas que el síndrome de abstinencia a opiodes. Además, el síndrome de abstinencia a morfina provoca un aumento del turnover de NA y de la actividad de TH en el LC, así como un aumento del metabolito cerebral de la NA (3-metoxi-4-hidroxifeniletilenglicol, MHPG) en las áreas cerebrales inervadas por este núcleo, como son el córtex y el hipocampo [98].

En los últimos años se han realizado numerosos estudios sobre la importancia de la regulación del sistema cerebral del estrés por núcleos noradrenérgicos bulbares, dándosele gran relevancia a la NA como neurotransmisor modulador de estos circuitos y a la estrecha relación NA-CRF

en los procesos adictivos (Fig. 15) [28, 56, 68, 99, 100].

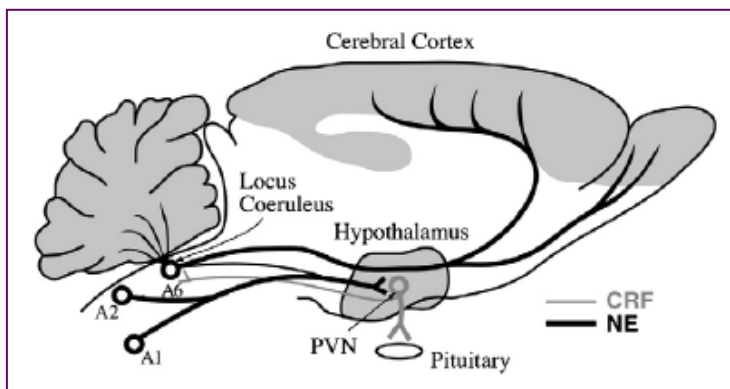


Figura 15. Diagrama simplificado de los sistemas noradrenérgicos más importantes: el LC y el sistema A1/A2 (VLM/NTS) y sus interacciones con las neuronas de CRF del PVN hipotalámico. Tomado de Dunn y Swiergiel (2008).

El LC (grupo celular A₆) es la mayor fuente de proyecciones noradrenérgicas que inervan al BNST y CeA [56], siendo el núcleo más ampliamente estudiado para establecer la relación CRF-NA. Se sabe que el estrés induce la liberación de NA en el BNST [101], así como en el CeA [102], estimulando a su vez la liberación de CRF en el CeA [103]. El PVN hipotalámico recibe la mayor parte de aferencias noradrenérgicas por parte del NTS (grupo celular A₂), que inerva fundamentalmente a la región parvocelular. En menor proporción, el PVN también recibe una pequeña inervación noradrenérgica procedente del LC, que proyecta fundamentalmente a la zona periventricular. A nivel ultraestructural, varios estudios han confirmado la inervación noradrenérgica de las neuronas de CRF del PVN [104, 105], y además se ha podido demostrar la presencia de receptores α_1 - y α_2 -adrenérgicos en dichas neuronas [106]. En la actualidad es ampliamente conocido que la liberación de NA estimula a las neuronas de CRF para activar el eje HHA [100, 107, 108]. También hay evidencias que apuntan a que las neuronas de CRF del PVN inervan a sistemas noradrenérgicos bulbares [109]. Todos estos datos parecen indicar que existe un bucle NA-CRF, en el que la NA estimularía la liberación de CRF en el CeA, el BNST y el PVN, y a su vez el CRF procedente de estos núcleos estimularía la liberación de NA por las áreas bulbares noradrenérgicas (Fig. 16) [56].

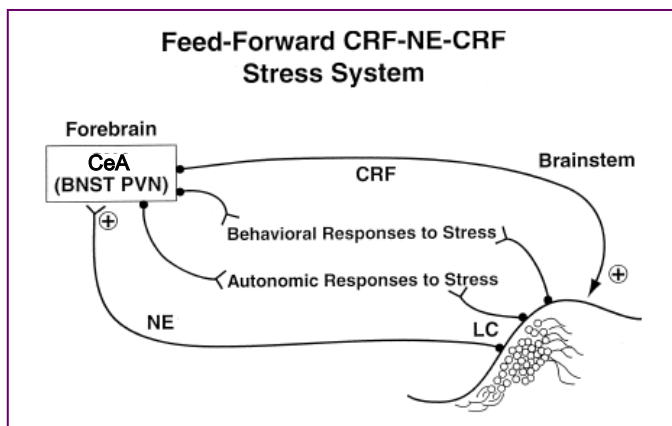


Figura 16. Diagrama describiendo el sistema de feedforward por el cual el CRF podría estimular la actividad noradrenérgica bulbar, la cual a su vez estimularía la actividad de los sistemas de CRF cerebrales cerrando así el bucle CRF-NA. Tomado de Koob (1999).

Tras la administración aguda de morfina se ha podido constatar un aumento en el turnover de NA en el PVN hipotalámico [44, 99], al igual que durante el síndrome de abstinencia inducido por la administración de naloxona [68]. Concomitantemente, se ha observado una importante expresión de c-Fos en las neuronas noradrenérgicas del NTS tras la administración aguda de morfina, así como durante el síndrome de abstinencia a la misma, lo cual indica un aumento de la actividad de este núcleo [69, 71, 72]. Paralelamente, también se ha podido constatar un incremento de la actividad enzimática de TH y del turnover de NA en el PVN hipotalámico tras el síndrome de abstinencia a morfina, junto con un aumento en la liberación de GC y ACTH [68, 73]. Estos resultados sugieren un incremento de la actividad en el NTS tras la exposición a opioides, que a su vez actuaría induciendo la activación del eje HHA mediante la estimulación de las neuronas de CRF de la región parvocelular del PVN.

El efecto de la NA sobre las neuronas de CRF hipotalámicas parece estar mediado por receptores α -adrenérgicos, aunque no se ha descartado un papel para los receptores adrenérgicos tipo β . Estudios previos de nuestro laboratorio han puesto de manifiesto que la administración de antagonistas de receptores α_1 -, α_2 - y β -adrenérgicos bloquea el aumento en la liberación de corticosterona tras la administración aguda de morfina [44], así como tras el síndrome de abstinencia [108]. También se ha podido constatar que la administración de estos antagonistas bloquea el aumento en la expresión de c-Fos observado en la

región parvocelular del PVN durante el síndrome de abstinencia a morfina [71]. Estos resultados parecen indicar que la inervación noradrenérgica está implicada en las modificaciones que se producen en el eje del estrés durante el síndrome de abstinencia a morfina. Un resumen de los circuitos neuronales involucrados en los efectos reforzadores de las sustancias de abuso viene recogido en la Fig. 17.

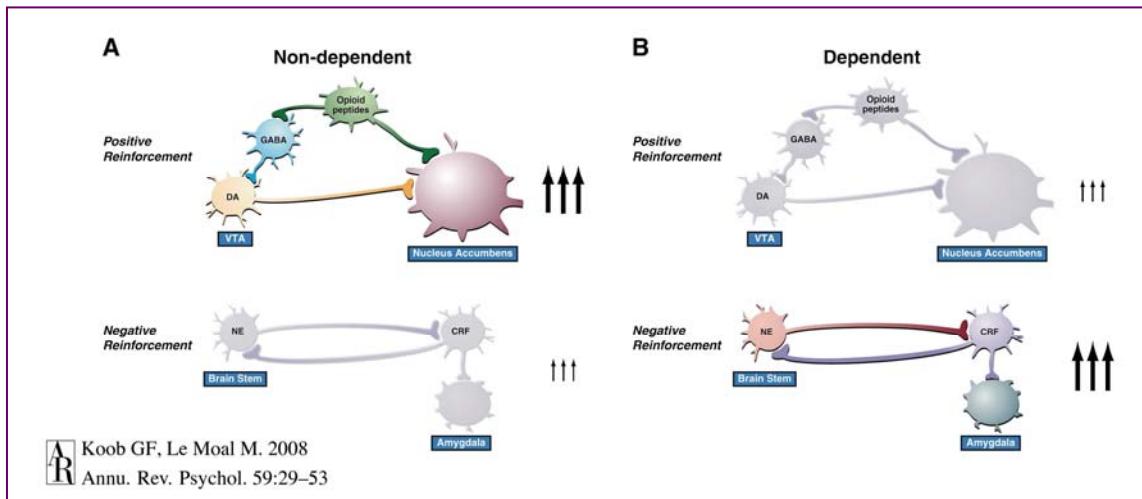


Figura 17. Circuitos neuronales asociados con los efectos reforzadores positivos tras la administración aguda de sustancias de abuso, y los efectos reforzadores negativos durante la dependencia. Tomado de Koob y Le Moal (2008).

3. Estrés y Adicción

En los últimos años, numerosos estudios han puesto de manifiesto una estrecha relación entre el estrés y las diferentes fases del ciclo de la adicción. La exposición a situaciones estresantes en alguna etapa de este ciclo parece empeorar la enfermedad adictiva, aumentando los componentes típicos de la dependencia de drogas: la vulnerabilidad al consumo, la búsqueda compulsiva de la sustancia de abuso, la ansiedad por la autoadministración y las recaídas [6, 57, 110].

Se ha comprobado que tanto el estrés como la adicción a drogas afectan a los mismos circuitos neuronales, no sólo al sistema del CRF, sino que además

varios estudios han puesto de manifiesto que el sistema mesocorticolímbico, principal mediador de los efectos reforzadores positivos de las drogas, también está implicado en las respuestas al estrés. A este respecto se ha comprobado que ante situaciones estresantes aumenta la liberación de DA por las neuronas del VTA [65], y también durante el estrés crónico se producen cambios en la morfología de las dendritas de la PFC [111, 112]. Concomitantemente, también los cambios moleculares asociados con el estrés en el circuito mesocorticolímbico son semejantes a los observados durante la dependencia de drogas, de forma que tras el estrés crónico aumentan los niveles de Δ FosB y la fosforilación de CREB en el NAc entre otras áreas cerebrales [6, 113]. Todos estos datos indican que tanto el estrés como las drogas afectan de manera similar a las vías de recompensa y a través de los mismos mecanismos moleculares [6].

Es ampliamente conocido que el eje HHA es el principal sistema neuroendocrino implicado en el estrés y que además sufre modificaciones en su función durante la exposición a drogas. Ante un agente estresante, el PVN libera CRF para estimular la secreción de ACTH por la hipófisis, que a su vez activa la liberación de GC por la glándula adrenal. La respuesta del eje HHA es similar ante la exposición aguda a muchas sustancias, como cocaína, opioides, etc [40, 43]. Tras el consumo crónico de las mismas la respuesta de este sistema puede variar. Mientras que durante la exposición prolongada a opioides, alcohol y nicotina se desarrolla tolerancia a este efecto, el consumo crónico de cocaína mantiene elevada la actividad del eje HHA [114-117].

El estrés, a través de la activación del eje HHA y la liberación de GC, influye directa o indirectamente en numerosas áreas cerebrales, incluidas las neuronas dopaminérgicas, que poseen receptores para GC (GR) [118]. La interacción de los GC con el sistema dopaminérgico mesocorticolímbico puede

tener gran relevancia en la autoadministración/vulnerabilidad al consumo de sustancias de abuso. Ante situaciones agudas de estrés, el eje HHA incrementa la liberación de GC, que actúan estimulando las neuronas dopaminérgicas del sistema mesocorticolímbico, lo que tiene como resultado un aumento de la sensibilidad a los efectos reforzadores de las drogas. Cuando la exposición al estrés es crónica, los niveles de GC se mantienen elevados durante largo tiempo, lo cual daña el sistema de feed-back negativo en el hipocampo mediante una disminución en el número de GRs. Esto produce un incremento prolongado en la secreción de GC y un aumento en la liberación de DA en el NAc, lo cual explica la elevada sensibilidad a determinadas sustancias observada en adictos, incluso semanas después de que cese la situación estresante [7]. Apoyando esta hipótesis, se ha comprobado que la administración aguda de cortisol en humanos precipita la ansiedad por el consumo de drogas [119], al igual que la exposición a agentes estresantes [120]. Además, la administración de corticosterona a ratas que muestran una baja respuesta ante nuevos estímulos, ha demostrado inducir y mantener la autoadministración de anfetaminas [121, 122]. Por otra parte, la adrenalectomía y el bloqueo de GRs, (y también de CRF), tienden a suprimir la autoadministración de drogas en ratas [123, 124], y a disminuir los niveles de DA en el NAc [66, 67]. Estos resultados sugieren que las hormonas y neurotransmisores relacionados con el estrés pueden estar implicadas en el aumento de la liberación de DA y por tanto en los efectos reforzadores positivos y en la autoadministración/consumo de sustancias de abuso [6, 7].

Durante el síndrome de abstinencia se produce un incremento en la actividad del eje HHA, pero las concentraciones de ACTH y corticosterona o cortisol vuelven a sus niveles normales en ratas o humanos respectivamente [43]. Sin embargo, la presencia de un agente estresante durante el síndrome de abstinencia a opioides o psicoestimulantes mantiene elevada la actividad del eje

HHA [125, 126]. Este hecho parece indicar que tanto la hipersensibilidad de los adictos al estrés como la vulnerabilidad a las recaídas en el consumo estarían relacionadas con las alteraciones de la respuesta del eje HHA al estrés durante el síndrome de abstinencia [6]. Sin embargo, el papel del CRF hipotalámico durante el síndrome de abstinencia no está aún totalmente clarificado, aunque hay datos que parecen indicar su relevancia en los estados afectivos negativos así como en los síntomas físicos que aparecen durante el síndrome de abstinencia a opioides, ya que la administración de antagonistas del receptor de CRF bloquea la ansiedad y los estados aversivos del síndrome de abstinencia a morfina, además de atenuar su sintomatología [127-129].

En cuanto al sistema de CRF extrahipotalámico, diversos estudios le confieren un importante papel en las recaídas en el consumo ante situaciones estresantes. Varios estudios han demostrado, mediante el uso de modelos animales, que la exposición aguda al estrés puede restablecer la búsqueda compulsiva de varias drogas, como opioides, psicoestimulantes, etanol y nicotina [130-133]. Además, la inactivación de las proyecciones de CRF desde el CeA al BNST bloquea las recaídas en el consumo de cocaína inducidas por el estrés [134, 135]. Iguales efectos produce la administración de antagonistas del receptor de CRF tipo 1 (CRF1R) en el BNST, pero no en el CeA o en el NAc [130, 136]. Estos datos sugieren que serían los CRF1R localizados en el BNST los que mediarían en las recaídas en el consumo de drogas inducidas por estrés. Sin embargo los antagonistas del CRF1R no bloquean la recaída en el consumo inducida por estímulos relacionados con droga [137, 138]. Estos datos indicarían que la estimulación del sistema de CRF extrahipotalámico inducida por estrés desde el CeA hasta el BNST, y la activación de los CRF1R del BNST desencadena la recaída en el consumo de drogas [6].

Por otra parte, se ha localizado CRF en las neuronas del VTA de animales control y expuestos a cocaína ante una situación estresante, aunque el origen de este CRF es desconocido [139]. Además de CRF, en los animales expuestos a cocaína se libera glutamato y DA ante situaciones estresantes, pero la liberación de estos dos neurotransmisores depende del CRF, ya que la administración de antagonistas de receptores de CRF tipo 2 (CRF2R), pero no de antagonistas de CRF1R atenúa la liberación de ambos neurotransmisores, así como la recaída en el consumo de cocaína ante situaciones estresantes [139, 140]. Estos estudios sugieren que el CRF es un importante mediador en la actividad de las neuronas dopaminérgicas, especialmente tras el consumo de sustancias de abuso [6].

Por último, las vías noradrenérgicas también juegan un papel importante en las recaídas en el consumo de drogas inducidas por el estrés [28]. Se ha comprobado que la administración de agonistas α_2 -adrenérgicos en el BNST inhibe la vuelta al consumo inducida por el estrés [141-143], mientras que las lesiones en el LC atenúan la vuelta al consumo de heroína [142]. Asimismo, la administración de antagonistas β -adrenérgicos en el BNST bloquea la recaída en consumo de cocaína en ratas [144].

III. OBJETIVOS

Actualmente está bien establecido, mediante estudios en modelos animales y más recientemente en humanos, que todas las sustancias de abuso conocidas hasta el momento convergen en un circuito común: la vía mesocorticolímbica, de naturaleza dopaminérgica [5, 48, 145, 146]. Más recientemente se ha propuesto que otras áreas y núcleos también podrían estar esencialmente implicados en los cambios crónicos asociados con la adicción. Dichas áreas incluyen, entre otras, al hipotálamo y al sistema cerebral del estrés [147]. Desde hace años es conocido que, en el humano, el estrés es uno de los factores que contribuye poderosamente al desarrollo y perpetuación de la adicción a diferentes sustancias de abuso. En este sentido, se ha podido comprobar que el estrés psicológico favorece el deseo de consumo; además, la activación que se produce en el eje HHA como consecuencia del estrés constituye uno de los predictores del uso subsiguiente de drogas [40, 148]. Datos recientes han evidenciado que la actividad neuronal del CRF hipotalámico y extrahipotalámico constituye un importante factor en la neurobiología de la adicción.

Recientemente se ha constatado que la mayoría de drogas producen alteraciones del eje HHA y del sistema cerebral del estrés, tales como modificaciones en la liberación de ACTH y GC, y cambios en la actividad de los circuitos de CRF y NA [5, 7, 40, 56, 69]. Dichas alteraciones del sistema hormonal del estrés, de receptores y neurotransmisores, podrían representar mecanismos compensatorios que tenderían a restaurar las funciones homeostáticas en respuesta a la exposición crónica a drogas. Estos cambios podrían contribuir de forma significativa al estado emocional negativo característico del síndrome de abstinencia, así como al aumento de la sensibilidad a los estímulos estresantes. Ambos factores pueden favorecer la vulnerabilidad a las recaídas durante los períodos de abstinencia, la cual constituye uno de los mayores problemas en el tratamiento de la adicción [1, 7,

28, 147]. De esta forma, los sistemas cerebrales del estrés contribuirían no solo al estado emocional negativo asociado con la abstinencia, sino también a la vulnerabilidad a las circunstancias estresantes observadas en el humano durante los períodos de abstinencia. Los neurotransmisores/neuromoduladores implicados en las recaídas provocadas por estrés incluyen CRF, GC y NA, conociéndose como “sistema anti-recompensa” a los circuitos del sistema cerebral del estrés [40].

La identificación de los sustratos neuronales y de los procesos neuroadaptativos celulares y moleculares que tienen lugar en los diferentes circuitos específicos que participan en el proceso adictivo vienen siendo las dianas de la investigación actual. **Los objetivos** del presente estudio han sido investigar los efectos de la administración crónica de morfina (como prototipo de opioide) y del síndrome de abstinencia, en diferentes componentes del eje HHA, así como en el grupo celular NTS-A₂.

- **El primer objetivo** del presente estudio fue investigar los cambios transcripcionales y de actividad en el hipotálamo y otras estructuras cerebrales en ratas dependientes de morfina y durante el síndrome de abstinencia inducido por naloxona. Para ello, se analizó la secreción de corticosterona, la inducción del factor de transcripción c-Fos y los niveles de RNA heteronuclear (hnRNA) para CRF y AVP.
- La vía de señalización de las ERK ha sido implicada en la adicción [9]. Sin embargo, su posible función en la activación del PVN y NTS-A₂ durante la dependencia de morfina no se ha estudiado en profundidad. **El Segundo objetivo** del estudio fue determinar la posible activación de ERK_{1/2} durante la dependencia y síndrome de abstinencia a morfina, así como su posible implicación en la expresión génica inducida durante la

abstinencia. Se analizó para ello, en las áreas anteriormente mencionadas, los cambios en la fosforilación de ERKs así como los niveles de ERKs totales. Se investigó asimismo si el síndrome de abstinencia activa neuronas de CRF en el PVN. Por último, se determinó si la activación de la vía de señalización de ERK_{1/2} contribuye a la activación catecolaminérgica observada en el NTS-A₂ y/o a la activación de las neuronas de CRF en el PVN.

- Nuestro laboratorio ha mostrado previamente que durante el síndrome de abstinencia a morfina se produce un incremento del turnover de NA en el PVN [108], concomitantemente con la activación de las neuronas noradrenérgicas del NTS-A₂ (evidenciada por la expresión de c-Fos; [71, 72]). Estas respuestas fueron acompañadas por un incremento en la actividad enzimática de TH en el PVN [73]. La regulación a corto plazo de la síntesis de catecolaminas se produce mediante la fosforilación de la enzima TH, tras lo cual aumenta su actividad enzimática. En particular, el aumento en la fosforilación de Ser31 y Ser40 acelera la actividad de TH, lo que se traduce en la síntesis de catecolaminas [149, 150]. **El Tercer objetivo** del estudio consistió en analizar los cambios en la fosforilación de TH, durante la dependencia de morfina, en el PVN y en las neuronas noradrenérgicas bulbares que lo inervan. Para ello se evaluó en primer lugar los posibles cambios en la fosforilación de TH a nivel de Ser31 y Ser40, así como la actividad enzimática de TH. Es bien conocido que la fosforilación de TH en cada uno de los residuos de Ser está asociada con diferentes vías de señalización intracelular. Puesto que el residuo Ser31 de TH es fosforilado específicamente por ERK_{1/2} [150, 151], en el presente trabajo se analizó si la activación de la cascada MEK-ERK contribuye a la fosforilación de TH en Ser31 observada en nuestro estudio durante el síndrome de abstinencia. Para ello se investigó el efecto del inhibidor

selectivo de la activación de MEK, SL327, sobre los niveles de TH fosforilada en Ser31.

- Los GC ejercen sus efectos a nivel del SNC no sólo inhibiendo la secreción de CRF en el PVN, sino también modulando los impulsos neuronales que llegan a este núcleo hipotalámico desde otras vías del sistema cerebral del estrés [152]. Una importante diana de las acciones de los GC son las vías noradrenérgicas bulbares del NTS-A₂, que constituyen las aferencias catecolaminérgicas más importantes que inervan al PVN [104]. Teniendo en cuenta el importante papel del NTS-A₂ en las respuestas del PVN al síndrome de abstinencia, es importante determinar si la depleción de corticoides podría modificar las funciones de la enzima TH en el NTS-A₂. Por tanto, **el cuarto objetivo** fue examinar los efectos de la adrenalectomía bilateral sobre la expresión génica de TH, los niveles de inmunoreactividad y la fosforilación (activación) de la enzima en dicho núcleo durante la dependencia de morfina y tras el síndrome de abstinencia. Finalmente, se analizó también la actividad enzimática de TH en el PVN para determinar si el aumento de la misma que produce el síndrome de abstinencia requiere la acción de los GC.

IV. MATERIAL Y MÉTODOS

1. Animales y tratamientos

Se han utilizado ratas macho de 220-240 g al inicio del tratamiento de las cepas Sprague-Dawley y Wistar. Los animales fueron mantenidos en cajas transparentes en una habitación a $22 \pm 2^\circ$ C, humedad de $50 \pm 10\%$ y con un ciclo de luz oscuridad de 12 h (08:00-20:00 h), y fueron manipulados de acuerdo a la normativa ética vigente (Directiva de la Comunidad Europea de 24 de noviembre de 1986, 86/609/EEC y la Directiva Local ES300305440012), teniendo libre acceso a la comida y al agua hasta el momento de comenzar el experimento.

La dependencia de morfina se indujo mediante la implantación subcutánea de pellets de morfina base (75 mg), uno el día 1, dos el día 3 y tres el día 5, bajo ligera anestesia con éter. Los animales control fueron implantados con pellets de placebo (lactosa) en lugar de morfina, con la misma secuencia de implantación. El día 8 se les administró salino s.c. (1 mL/kg) o naloxona (2 ó 5 mg/kg) a los animales tratados con placebo o morfina. El peso de de las ratas fue controlado durante todo el tratamiento para comprobar que la morfina era correctamente liberada de los pellets. También se cuantificó la pérdida de peso de los animales durante el síndrome de abstinencia a morfina mediante la diferencia del peso del animal inmediatamente antes de la administración de salino o naloxona y el peso a los 30, 60, 90 ó 120 minutos de dicha administración.

Para determinar el efecto de la inhibición de la fosforilación de ERKs en los cambios en la expresión de c-Fos y en la fosforilación de TH en la Ser31 en el PVN y el NTS, así como en la actividad del eje HHA, los animales control y los dependientes de morfina fueron tratados con SL327 (inhibidor selectivo de las MEK; [153]) 1 h antes de la administración de salino o naloxona. Este inhibidor

se disolvió en dimetilsulfóxido (DMSO) al 100% y se inyectó i.p. en un volumen de 1 mL/kg a dosis de 100 mg/kg.

2. Adrenalectomía

Para investigar el posible papel de los GC en los cambios en la expresión génica de TH, en sus niveles de proteína total, su fosforilación y su actividad enzimática durante el síndrome de abstinencia, las ratas fueron adrenalectomizadas mediante una incisión dorsal bajo anestesia con pentobarbital (2 mg/100 g i.p.; Hospira, Hoofddorp, Holanda) y se les implantó s.c un pellet de corticosterona (25 mg de corticosterona, Sigma Chemicals, St Louis, MO, más 75 mg de colesterol) de liberación mantenida durante 15 días. La composición de estos pellets fue elegida porque provee de niveles bajos pero estables de corticosterona. Los animales control fueron sometidos al mismo procedimiento pero sin extirpación de la glándula adrenal. Las ratas adrenalectomizadas recibieron salino al 0.9% en vez de agua para reemplazar la depleción de sodio debida a la pérdida de aldosterona por la adrenalectomía. Cinco días después de la cirugía se comenzó con el proceso de inducción de dependencia de morfina.

3. Inmunocitoquímica

Para el marcaje simple de c-Fos, 2 h después de la administración de salino o naloxona, los animales fueron anestesiados con una dosis subletal de pentobarbital i.p. (Nembutal, 2 mg/100 g) y rápidamente perfundidos vía transaórtica con salino y seguidamente con fijador a 4° C (paraformaldehido 4% en tampón borato 0.1 M). Los cerebros fueron postfijados en fijador durante 3 h y después puestos en KPBS (tampón fosfato-potasio 0.1 M, pH 7.2) y sacarosa al 10% a 4° C. Mediante microtomo se realizaron cuatro series de secciones seriadas de 30 µm, que fueron guardadas en crioprotector a -20° C hasta su

procesado. Después de bloquear el tejido con H₂O₂ y suero de cabra (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA), las secciones fueron incubadas en anticuerpo primario contra c-Fos (policlonal, sc-52, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA; 1:20000) durante 72 h a 4° C. Los antígenos fueron visualizados mediante el protocolo convencional avidina-biotina-peroxidasa (Vectastain ABC Elite Kit; Vector Laboratories). La reacción con 3-3'-diaminobencidina (DAB; Sigma) fue intensificada con sulfato de níquel y amonio. Las secciones fueron posteriormente montadas sobre portas gelatinados y cubiertas.

Para el marcaje de ERK_{1/2} fosforiladas (pERK_{1/2}), TH fosforilada en la Serina31 (TH pSer 31), TH fosforilada en la Serina40 (TH pSer40) y los dobles inmunomarcajes, 60 y 90 minutos después de la administración de salino o naloxona, las ratas fueron anestesiadas con una dosis subletal de pentobarbital sódico (100 mg/kg i.p.) y perfundidas vía transaórtica con tampón fosfato (PBS pH 7.4; 1mM NaF), seguido de paraformaldehído (4% en PBS, pH 7.4) a 4° C. Una vez extraídos los cerebros, se postfijaron en paraformaldehído a 4° C toda la noche. Se obtuvieron secciones seriadas de 30 µm de grosor mediante vibratomo (Leica, Nussloch, Alemania) y se guardaron en crioprotector a -20° C hasta su procesamiento.

Después de bloquear el tejido con H₂O₂ y suero de cabra (Sigma), las secciones fueron incubadas en anticuerpo primario contra pERK_{1/2} (1:1500; policlonal, sc 7383, Santa Cruz Biotechnology), TH pSer31 (1:400; AB5423, Chemicon International) o TH pSer40 (1:400; AB5935, Chemicon International) durante toda la noche. Los antígenos fueron visualizados mediante el protocolo convencional avidina-biotina-peroxidasa (Vectastain ABC Kit; Vector Laboratories). La reacción fue visualizada mediante DAB (Sigma). Las secciones fueron posteriormente montadas sobre portas gelatinados y cubiertas.

Para el doble marcaje c-Fos/pERK_{1/2}, el protocolo para el marcaje de c-Fos fue similar al descrito anteriormente para el marcaje simple de pERK_{1/2}, TH pSer31 o 40, excepto que la reacción con DAB fue intensificada con sulfato de níquel. Se utilizó el mismo anticuerpo mencionado anteriormente a una dilución 1:3000 y las secciones se incubaron 36 h. El marcaje de pERK_{1/2} fue realizado en segundo lugar con DAB. El mismo protocolo fue utilizado para los dobles marcajes c-Fos/CRF y c-Fos/TH pSer31.

4. Hibridación *in situ*

Las sondas para los hnRNAs de CRF y AVP, así como para el mRNA de TH fueron transcritas de plásmidos cedidos por los Drs. T.G. Sherman (Universidad de Georgetown), A. Ericsson (The Salk Institute) y Z. Coth (Universidad Semmelweis, Budapest) respectivamente, en presencia de ³⁵S-uridin-trifosfato (DuPont-NEN, Boston, MA, USA). Las secciones de tejido se montaron sobre portas impregnados con poli-L-lisina para la detección de los hnRNAs de CRF y AVP, y sobre portas SuperFrost Ultra Plus (Menzel, GmbH, Braunschweig, Alemania) para el mRNA de TH. Posteriormente se fijaron con paraformaldehído al 4%, se digirieron con proteasa K, fueron acetiladas, y posteriormente deshidratadas. Se pipetearon 100 µL de mezcla de hibridación que contenía la sonda marcada con ³⁵S-UTP (107 dpm/mL) sobre las secciones y se dejó hibridar durante toda la noche a 56° C. Posteriormente las secciones fueron lavadas en SSC 4X, digeridas con ribonucleasa A a 37° C durante 30 minutos, desaladas gradualmente y lavadas en SSC 0.1X a 65-75° C durante 30 minutos. Las secciones fueron reveladas durante 24-48 h y analizadas en Phosphoimager. Para la visualización de los hnRNAs de CRF y AVP, las secciones fueron incubadas en emulsión nuclear NTB-3 (Eastman Kodak, Rochester, NY, USA) de 1 a 3 semanas a 4° C, reveladas en el revelador D-19 y ligeramente teñidas con cresilvioleta.

5. Análisis de imagen

Para el análisis cuantitativo del marcaje de c-Fos las imágenes fueron capturadas con un microscopio Nikon Eclipse E600 (Nikon Corporation, Tokio, Japón) acoplado a una cámara CCD (AVC-D7CE, Sony, Tokio, Japón), de acuerdo con el Atlas de Paxinos y Watson [154]. Los núcleos positivos para c-Fos se contaron mediante el software para Macintosh NIH IMAGE 1.59. Las subdivisiones del PVN fueron delineadas y el número de perfiles positivos fueron contados tras delimitar un umbral común a todas las secciones. El contaje fue realizado a ambos lados del PVN a intervalos regulares y expresado como la media aritmética y su error estándar.

El análisis semicuantitativo de los hnRNAs de CRF y AVP se realizó mediante densitometría en el programa NIH IMAGE 1.59 sobre las secciones incubadas con emulsión nuclear. La densidad óptica de las imágenes invertidas fue detectada en una escala de grises de 256, bajo idénticas condiciones de iluminación usando la función "O.D. no calibrada". Se calculó la densidad integrada, que refleja tanto la intensidad de la señal como en número de píxeles [número de píxeles · (media – background)] en cada sección. Puesto que el número de píxeles está incluido en cada medida, se tuvo extremo cuidado en que las áreas fuesen equivalentes entre los distintos animales. Para la señal del hnRNA de CRF, se utilizó un rectángulo de (625 μm · 525 μm) con un aumento de 10X. Puesto que el hnRNA de AVP está distribuido en dos espacios irregulares y adyacentes en el PVN, la señal fue analizada delineando los bordes de la región parvocelular y magnocelular del PVN. Se escogieron los tres valores máximos de cada animal y se calculó la media aritmética para obtener un solo valor de densidad integrada por región y por rata.

El contaje de las neuronas positivas para pERK_{1/2}, TH pSer31 y TH pSer40 fue realizado mediante un microscopio DMLB (Leica, Madrid,

España) acoplado a una cámara (Sony 151-AP; Sony, Madrid España) mediante el software Q500MC (Leica). Como área de referencia fue usado un cuadrado de 129 μm de lado sobre la imagen ampliada 20X o 40X. Se analizó la porción parvocelular a ambos lados del PVN de tres o cuatro secciones correlativas y se obtuvo la media aritmética para cada animal. Para el NTS también se analizaron ambos lados de este núcleo en cinco o seis secciones correlativas correspondientes a los niveles de área postrema (AP) y óbex, y se obtuvo la media aritmética para cada animal. Las medidas fueron promediadas para cada grupo experimental en PVN y NTS.

Para el análisis cuantitativo de los dobles inmunomarcajes c-Fos/pERK_{1/2}, c-Fos/CRF y c-Fos/TH pSer31 se usó el mismo microscopio descrito anteriormente con una amplificación de 40X. Las neuronas doblemente marcadas se identificaron por el depósito oscuro en el núcleo, correspondiente a c-Fos, y marrón en el citoplasma, que identifica a pERK_{1/2}, TH pSer31 o CRF. También fueron analizadas las células marcadas para uno de los dos antígenos en cada uno de los dobles inmunomarcajes. Se analizaron ambos lados del PVN y/o del NTS en un cuadrado de 129 μm de lado utilizado como área de referencia.

El análisis del mRNA de TH en el NTS fue realizado por densitometría mediante el software Advanced Image Data Analyser (AIDA 3.1) sobre imágenes escaneadas obtenidas con el programa BASReader (Raytest Isotopenmessgerate GMBH Straubenhardt, Alemania). Se utilizó un cuadrado de 25 · 25 píxeles. La señal de hibridación fue corregida mediante la sustracción de los valores de background de tejido no hibridado.

6. Western blot

Treinta, 60, 90 y 120 minutos tras la administración de salino o naloxona, las ratas fueron decapitadas, el cerebro extraído y rápidamente congelado a -80° C. Las áreas correspondientes al PVN [155] y el NTS fueron aisladas, homogeneizadas, sonicadas y centrifugadas. La concentración de proteínas de las muestras se analizó mediante la técnica del ácido bicinónico. Las muestras, que contenían 40 μ g de proteínas, fueron separadas mediante electroforesis en geles de SDS/poliacrilamida al 10% y transferidas a membranas de difluor polivinilideno (PVDF) (Millipore Corp., Bedford, MA, USA), que fueron bloqueadas en suero bovino, y posteriormente se incubaron con los primeros anticuerpos que se describen a continuación: policlonal anti-ERK (1:1000; sc-154, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), monoclonal anti-pERK_{1/2} (1:1000; sc-7383, Santa Cruz Biotechnology), policlonal anti-(c-Fos) (1:2000; sc-52, Santa Cruz), policlonal anti-tTH (frente TH fosforilada y no fosforilada; 1:1000; AB152, Chemicon International, Temecula, CA), policlonal anti-TH pSer31 (1:500; AB5423, Chemicon International), policlonal anti-TH pSer40 (1:500; AB5935, Chemicon International) o policlonal anti- β -actina (1:1000; #4967; Cell Signalling; Danvers, MA). La inmunorreactividad fue detectada mediante un kit ECL (Amersham, UK). La intensidad de las bandas correspondientes a las ERKs totales y fosforiladas (42 y 44 kDa), c-Fos (62 kDa), tTH y TH pSer31 y pSer40 (60 kDa) y β -actina (45 kDa) se analizó mediante densitometría utilizando el programa Alpha Imager (Alpha Innotech, Nucliber, Madrid, España).

7. Medida de la actividad TH

Noventa y 120 minutos después de la administración de salino o naloxona, los animales fueron decapitados, se extrajo el cerebro y rápidamente se congeló a -80° C. El área correspondiente al PVN fue aislada [155],

homogeneizada y centrifugada. La enzima TH cataliza la hidroxilación de tirosina para generar L-DOPA y agua, usando como cofactor tetrahidrobiopterina (BH₄). Por tanto la actividad TH se midió mediante la cuantificación de agua tritiada producida por la catálisis de [³H]L-tirosina en función de los µg de proteína de la muestra.

8. Radioinmunoanálisis de corticosterona y ACTH

Tras la decapitación de los animales, la sangre fue recogida en tubos siliconados conteniendo EDTA al 5%, a continuación fue centrifugada y se aisló el plasma, el cual se mantuvo a -80° C hasta su uso para determinar las concentraciones de corticosterona y ACTH (marcadores de la actividad del eje HHA). Para ello se utilizaron kits comerciales (¹²⁵I-corticosterone and ¹²⁵I-hACTH radioimmunoassay, MP Biomedicals, Orangeburg, NY, USA), y se siguió el procedimiento habitual, de acuerdo con las instrucciones del proveedor.

9. Análisis estadístico

Para cada grupo experimental se calculó la media aritmética y su correspondiente error estándar (S.E.M.) para realizar el análisis estadístico de los datos. Se utilizó un análisis de varianza (ANOVA) de dos o tres vías. Para identificar las diferencias entre las medias se utilizó un ANOVA de una vía seguido de un análisis de Newman-Keuls. Cuando se compararon sólo dos grupos experimentales se utilizó el test de la *t* de Student no pareada. Los valores de $P < 0.05$ fueron considerados significativos.

V. RESULTADOS

1. Activación de la expresión génica de neuropéptidos hipotalámicos implicados en el estrés durante el síndrome de abstinencia a morfina

El síndrome de abstinencia a morfina induce importantes síntomas somáticos y afectivos, que incluyen la activación del eje HHA. Para evidenciar los cambios en la secreción, en la actividad y en la regulación de la expresión génica en el hipotálamo de ratas dependientes de morfina y durante el síndrome de abstinencia, en este primer trabajo hemos determinado la secreción de corticosterona, la expresión de c-Fos y los niveles de hnRNA para CRF y AVP en el PVN de animales control y dependientes de morfina a los que se les administró salino o naloxona. El síndrome de abstinencia a morfina indujo un importante aumento en la liberación de corticosterona y en la expresión de c-Fos en el PVN, lo cual muestra la hiperactividad de este núcleo. Además, mediante sondas complementarias a secuencias intrónicas de los genes que codifican para CRF y AVP en las neuronas de la porción parvocelular del PVN, se ha podido cuantificar un aumento en los niveles de hnRNA que codifica para estos neuropéptidos durante el síndrome de abstinencia a morfina. Sin embargo, en animales control y dependientes de morfina a los que se les administró salino no se observó cambio alguno en la expresión de CRF o AVP. Dicho aumento en los niveles de hnRNA para CRF y AVP se localizó en neuronas que expresan c-Fos en el PVN. Además de la activación de las neuronas del PVN que liberan CRF a la eminencia media iniciando así la activación del eje HHA, también se ha podido demostrar un aumento en la actividad de las neuronas del PVN que proyectan al sistema nervioso autónomo, así como en las neuronas de la región magnocelular del PVN y en el núcleo supraóptico (SON). A su vez se evidenció un incremento en la actividad de los núcleos noradrenérgicos que inervan al PVN, como el NTS, así como en otras áreas importantes asociadas con la adicción, como el BNST, el CeA y el

NAC. En resumen, nuestros resultados indican que durante el síndrome de abstinencia a morfina se produce una inducción de los genes relacionados con el estrés (CRF y AVP) a nivel del PVN. Además, se pudo confirmar que durante dicho síndrome existe una activación neuronal en muchas áreas cerebrales, incluidas áreas del sistema límbico funcionalmente relacionadas con el eje HHA.

2. Regulación de las ERKs durante el síndrome de abstinencia a morfina en el sistema cerebral del estrés

El aumento de la actividad en el eje HHA durante el síndrome de abstinencia a morfina es ampliamente conocido. Dicha hiperactividad es dependiente de los núcleos noradrenérgicos bulbares que inervan al PVN hipotalámico. La ruta de las ERKs ha sido implicada en los cambios celulares y moleculares que se desarrollan durante la adicción a drogas, pero su papel en la activación del PVN y el NTS durante la dependencia y el síndrome de abstinencia a opioides aún no es bien conocido. En este trabajo se ha observado que se produce una activación de la ruta de las ERKs, tanto en el PVN como en el NTS, durante el síndrome de abstinencia a morfina. Se comprobó además que dicha ruta de señalización celular está implicada en el aumento de la expresión de c-Fos en ambos núcleos. Se observó que c-Fos se expresaba en neuronas pERK_{1/2}⁺, tanto en el PVN como en el NTS. La administración de SL327, un inhibidor de la activación (fosforilación) de las ERKs por las MEKs, bloqueó, parcialmente en el PVN y totalmente en el NTS, el incremento en la expresión de c-Fos inducido por la administración de naloxona a ratas dependientes de morfina. Concomitantemente, mediante inmunocitoquímica, hemos demostrado un aumento en el número de neuronas que expresan CRF en la porción parvocelular del PVN durante el síndrome de abstinencia a morfina. Dichas neuronas expresaban el factor de transcripción c-Fos. Todos estos

resultados sugieren que la ruta de las ERKs es necesaria para la activación de las áreas cerebrales asociadas con el estrés durante el síndrome de abstinencia a morfina.

3. Regulación de la fosforilación de TH en la Serina31 y en la Serina40 durante el síndrome de abstinencia a morfina en el PVN y el NTS. Papel de las ERKs

Como ya ha sido comentado, la activación del eje HHA durante el síndrome de abstinencia a morfina es dependiente de las proyecciones noradrenérgicas que recibe el PVN hipotalámico desde el NTS del bulbo. La regulación a corto plazo de la biosíntesis de neurotransmisores catecolaminérgicos se realiza mediante la fosforilación de la enzima TH, lo cual provoca un aumento de su actividad catalítica. En este trabajo hemos estudiado, mediante western-blot e inmunocitoquímica, la regulación transcripcional de TH mediante la fosforilación en residuos de Ser específicos durante el síndrome de abstinencia a morfina. Nuestros resultados demuestran que, durante la dependencia y el síndrome de abstinencia a morfina, se produce un aumento de los niveles totales de TH (fosforilada y no fosforilada) en el NTS pero no en el PVN. Tras la administración de naloxona a animales tratados crónicamente con morfina se produce un aumento de la fosforilación de TH en la Ser31, pero no en la Ser40 en ambos núcleos. Estos resultados sugieren que el aumento de la actividad enzimática de TH durante la abstinencia de opioides depende de los cambios en la fosforilación del residuo 31 de esta enzima, y no en la Ser40. Adicionalmente, mediante inmunocitoquímica, se observó que c-Fos se expresaba en neuronas positivas para TH fosforilada en la Ser31 en el NTS, donde se encuentran los somas de las neuronas noradrenérgicas que inervan al PVN. Diferentes estudios han propuesto que la única ruta de señalización intracelular que fosforila a TH en el residuo de Ser31 es la de las ERKs. En este

estudio se pudo comprobar que la administración de SL327 disminuye la fosforilación de TH en la Ser31 durante el síndrome de abstinencia a morfina, tanto en PVN como en NTS. Por tanto, estos resultados sugieren que el aumento en la actividad enzimática de TH, y por tanto del turnover de NA en el PVN durante el síndrome de abstinencia a morfina es dependiente, al menos en parte, de la ruta de las ERKs.

4. Influencia de la adrenalectomía en la expresión del mRNA de TH, su fosforilación y activación en el NTS durante el síndrome de abstinencia a morfina

En este estudio hemos investigado la contribución del incremento de los niveles plasmáticos de GC en la regulación de TH en el NTS. Nuestros resultados muestran que durante el síndrome de abstinencia a morfina se produce un aumento de los niveles de mRNA para TH en el NTS, el cual es atenuado en animales adrenalectomizados que no presentan una elevada concentración de corticosterona en plasma. La adrenalectomía también bloquea el incremento en los niveles de TH total observado previamente durante la dependencia y el síndrome de abstinencia a morfina. Durante el síndrome de abstinencia se observó un aumento de neuronas positivas para TH fosforilada en la Ser31 (activada) en el NTS, en paralelo con un aumento de la actividad enzimática a nivel del PVN. Sin embargo, en animales adrenalectomizados el síndrome de abstinencia a morfina no modificó el número de neuronas positivas para TH fosforilada en la Ser31 en el NTS ni la actividad enzimática de TH en el PVN. Estos resultados sugieren que el incremento de GC durante el síndrome de abstinencia a morfina puede jugar un papel fundamental en la activación de las vías noradrenérgicas que inervan al PVN, tanto a nivel transcripcional como post-transcripcional.

VI. DISCUSIÓN

1. Activación de la expresión génica de neuropéptidos hipotalámicos implicados en el estrés durante el síndrome de abstinencia a morfina

El síndrome de abstinencia a morfina induce una serie de síntomas afectivos y somáticos que incluyen la activación del eje HHA, debido a que se ha demostrado que tanto el síndrome de abstinencia espontáneo como el inducido por la administración de naloxona, provocan un incremento en la liberación de ACTH y corticosterona [78, 79]. Dicha activación incluye además un incremento de la expresión de c-Fos (marcador de la activación neuronal) en la región parvocelular del PVN [71, 73, 156, 157], junto con una importante reducción de las reservas de neuropéptidos en las células neurosecretoras del PVN, como demuestra el descenso de la inmunoreactividad de CRF [74].

Las neuronas de la región parvocelular del PVN, además del CRF, también tienen capacidad para sintetizar otros péptidos bioactivos que inducen la liberación de ACTH. El más destacado de ellos es la AVP, que potencia la acción del CRF sobre las células corticotropas de la hipófisis anterior y está implicado en los cambios a largo plazo en la sensibilidad y capacidad de respuesta del eje HHA ante posteriores estímulos [60-62]. Aunque se ha descrito que el síndrome de abstinencia a morfina en ratas facilita la respuesta ante el estrés a corto plazo y que, además, atenúa el incremento en los niveles de ACTH ante situaciones estresantes a largo plazo [79, 158], el papel de AVP aún no ha sido estudiado.

La hibridación *in situ* con sondas complementarias a secuencias intrónicas es un método relativamente fiable para detectar cambios rápidos en la expresión génica [159], ya que hibridan con secuencias del transcrito primario del RNA (hnRNA) del gen, lo cual permite evaluar cambios rápidos en la

expresión de CRF [61, 159, 160]. Nuestros resultados demuestran que la activación del eje HHA durante el síndrome de abstinencia a morfina inducido por naloxona implica un aumento de la expresión de CRF y AVP en el PVN hipotalámico. Con respecto al efecto de la administración crónica de morfina sobre el CRF hipotalámico existen datos contradictorios. En contraste con datos previos de nuestro laboratorio mostrando una disminución en los niveles de mRNA para CRF en el PVN [75], otros estudios no han observado cambios en dichos niveles en el PVN [76, 77] e incluso se ha descrito un aumento de la señal del mRNA [78, 79]. Durante el síndrome de abstinencia a morfina nuestro grupo ha encontrado una mayor caída en los niveles de mRNA para CRF en el PVN, mientras que otros estudios han descrito que no hay cambios en el contenido de mRNA para CRF en el PVN [77]. Además, se ha sugerido que el tipo de síndrome de abstinencia a morfina también influye en la expresión de CRF en el hipotálamo. El síndrome de abstinencia por privación parece ser menos efectivo en la inducción de la transcripción de CRF que el inducido por la administración de naloxona [76]. Nuestros resultados, obtenidos mediante sondas específicas para secuencias intrónicas del RNA de CRF, apoyan la hipótesis de que la administración crónica de morfina no activa la síntesis de CRF en las neuronas de la porción parvocelular del PVN; sin embargo, la expresión de CRF en las neuronas del PVN relacionadas con la respuesta al estrés sí está dramáticamente aumentada durante el síndrome de abstinencia a morfina inducido por naloxona.

Las neuronas neurosecretoras del PVN contienen unas reservas significativas de mRNA para CRF en condiciones basales. Pero en la actualidad se conoce bastante poco sobre las alteraciones en la secreción, transporte axonal y regulación transcripcional y/o post-transcripcional que afectan a los niveles de mRNA en las neuronas hipotalámicas relacionadas con el estrés. Por ejemplo, a pesar del fuerte incremento en los niveles y en el número de células que

expresan hnRNA tras el estrés inducido por éter, se ha demostrado que no hay cambios en los niveles de mRNA para CRF comparado con los animales control [61, 161]. Razones similares pueden explicar las inconsistencias encontradas en los niveles de mRNA para CRF en el PVN tras el síndrome de abstinencia inducido por naloxona.

Además de CRF, las neuronas de la región parvocelular del PVN también expresan AVP, que regula la actividad del eje HHA en situaciones concretas [162, 163]. En contraste con estudios previos que indican que no hay cambios en los niveles de mRNA para AVP en el PVN tras el síndrome de abstinencia a morfina [75], en nuestro estudio hemos cuantificado un incremento en la señal de hnRNA para AVP en las neuronas neurosecretoras del PVN. Estos resultados apoyan la utilidad de las sondas específicas para secuencias intrónicas para el análisis de los cambios transcripcionales del gen de AVP, especialmente en el PVN, donde las reservas de AVP en la región magnocelular del mismo puede limitar la capacidad de detectar cambios en la expresión de AVP en la región parvocelular.

La inducción de la expresión de c-Fos en el PVN confirma la activación neuronal en respuesta al síndrome de abstinencia inducido por naloxona en la región dorsal de la subdivisión medial parvocelular de este núcleo [71]. Las señales que pueden poner en marcha la actividad transcripcional y sintética de las neuronas del PVN durante el síndrome de abstinencia a morfina pueden ser consecuencia de (a) el empobrecimiento de las reservas de péptidos, (b) la activación de las aferencias que reciben las neuronas neurosecretoras del PVN, y/o (c) desinhibición basal del PVN. Se ha descrito previamente que el síndrome de abstinencia a opioides inducido por naloxona tiene como consecuencia un dramático descenso en las reservas de neuropéptidos, que son liberados en la eminencia media [74], aunque los mecanismos que gobiernan estos procesos de

transcripción y secreción en las neuronas del PVN no están totalmente caracterizados. El aumento de la actividad de las aferencias noradrenérgicas que recibe el PVN durante el síndrome de abstinencia a morfina puede ser también responsable de la regulación al alza de la transcripción de los genes de CRF y AVP. La activación de las vías noradrenérgicas que inervan al PVN durante el síndrome de abstinencia a morfina está bien documentada [68, 71-73, 108], y además se ha descrito que la microinyección de NA en el PVN induce la activación de los genes de CRF [164] y AVP [165]. Las neuronas de CRF en el PVN, en condiciones normales, están inhibidas por neuronas GABAérgicas y de opioides endógenos. La suspensión de esta acción inhibitoria conduce a una activación de la expresión de los neuropéptidos implicados en el estrés [166, 167]. El síndrome de abstinencia a opioides inducido por la administración de naloxona tiene como resultado la inducción del mRNA para c-Fos en varias áreas del sistema límbico, como la amígdala basolateral, (BLA), el hipocampo, el VTA y la amígdala extendida [168]. Estas áreas están conectadas, de forma directa o indirecta, con las neuronas hipotalámicas relacionadas con el estrés. Por tanto, el papel de estas aferencias del sistema límbico en la activación de la expresión de neuropéptidos en el PVN no puede ser descartada.

El mecanismo molecular que conduce al aumento de la transcripción de CRF y AVP en las neuronas relacionadas con el estrés del PVN durante el síndrome de abstinencia a morfina no está totalmente establecido. Se ha descrito previamente que el aumento en la transcripción de CRF y AVP inducido por el estrés en las células neurosecretoras del PVN es compatible con la fosforilación de CREB y la activación de factores de transcripción codificados por IEGs, como los miembros de las familias fos y jun [61, 62]. Apoyando la implicación de la vía del AMPc/PKA/CREB en la activación de las neuronas de la región parvocelular del PVN, recientemente ha sido descrito que la inhibición específica de la PKA atenúa el incremento en la expresión de c-Fos durante el

síndrome de abstinencia a morfina [13]. Se ha sugerido la implicación de CREB en la regulación transcripcional de numerosos genes, incluyendo CRF, AVP y c-fos, y recientemente se ha propuesto como un marcador de la plasticidad neuronal durante el síndrome de abstinencia a morfina [11, 113]. Estudios en secuencias temporales de la expresión de neuropéptidos y IEGs en combinación con el análisis de las regiones reguladoras de los genes que los codifican, han implicado al factor de transcripción AP-1 en la regulación del gen de AVP en la porción parvocelular del PVN [163]. El gen de AVP contiene secuencias muy parecidas a las secuencias canónicas CRE y AP-1, las cuales podrían inducir la transcripción de AVP durante el síndrome de abstinencia a morfina.

El análisis del marcaje de c-Fos en la porción parvocelular del PVN indica un aumento de su expresión tras la administración de naloxona a ratas dependientes de morfina, pero no sólo en las neuronas secretoras de CRF de la porción parvocelular del PVN, sino que también hay un incremento en la inmunorreactividad de c-Fos en la región magnocelular y en el SON. En base a su topografía así como a experimentos de doble marcaje, se sabe que estas neuronas son de naturaleza oxitocinérgica y vasopresinérgica. Tras la administración crónica de morfina se ha descrito un aumento de los niveles de mRNA para AVP [76]. Durante el síndrome de abstinencia a morfina se detectó un aumento en la liberación de OT a la circulación portal hipofisaria [169] y un incremento en la expresión de OT [170] [171] en el PVN y el SON. En contraste a lo que ocurre en la porción parvocelular del PVN, la activación de las neuronas oxitocinérgicas durante el síndrome de abstinencia a morfina parece ser independiente de la inervación catecolaminérgica procedente del bulbo [170, 172, 173].

El tercer grupo de neuronas en importancia en el PVN, aquellas que proyectan a los centros del sistema nervioso autónomo del bulbo y la médula,

también muestran un incremento en la expresión de c-Fos durante el síndrome de abstinencia a morfina inducido por naloxona [174]. Sin embargo, no está descrito si esta activación está directamente relacionada con el incremento de la actividad simpática descrita durante el síndrome de abstinencia a diferentes sustancias de abuso. El efecto del síndrome de abstinencia a morfina no se limita al sistema de CRF hipotalámico, ya que también se ha sugerido el CRF extrahipotalámico está implicado en los estados de ansiedad y aversión asociados al síndrome de abstinencia a opioides. La administración de antagonistas del CRF1R atenúa varios de los síntomas del síndrome de abstinencia a morfina [175], así como la recaída en el consumo de heroína inducida por el estrés, y la preferencia de lugar condicionada por morfina [130]. Por otra parte, se ha propuesto que el CRF desempeña un importante papel en el aumento de la transmisión noradrenérgica inducida por el síndrome de abstinencia [176].

En conclusión, nuestros resultados indican que se produce una inducción significativa de los genes que codifican para los neuropéptidos implicados en el estrés, CRF y AVP, en la población parvocelular del PVN durante el síndrome de abstinencia a morfina. También se ha podido confirmar una activación de aquellos núcleos noradrenérgicos y del sistema límbico que están relacionadas con el eje HHA. Sin embargo, los mecanismos moleculares que conducen a la transcripción de estos neuropéptidos durante el síndrome de abstinencia en sujetos dependientes de morfina son todavía desconocidos.

2. Regulación de las ERKs durante el síndrome de abstinencia a morfina en el sistema cerebral del estrés

Como ya ha sido descrito anteriormente, la exposición aguda, crónica, y el síndrome de abstinencia a opioides provocan cambios adaptativos en la regulación de diferentes rutas de señalización intracelular en distintas regiones del SNC [8-11]. Así, se ha podido demostrar un aumento de la actividad de PKA y PKC durante el síndrome de abstinencia a morfina en el PVN y los núcleos noradrenérgicos que lo inervan [13, 14].

Las ERKs, miembros de la familia de las MAPK, traducen estímulos extracelulares en respuestas intracelulares y están implicadas en varios procesos en el SNC, incluida la adicción a drogas [16, 17]. En cerebro de rata se ha demostrado que el tratamiento crónico con morfina regula la actividad catalítica de ERK_{1/2} de diferente forma en función del área cerebral [177]. Numerosos estudios han demostrado la importancia de la modulación de la actividad de la ruta de las ERKs en diferentes regiones cerebrales en los procesos de tolerancia, dependencia y recompensa tras la administración de drogas [18, 19]. Nuestros resultados muestran que el síndrome de abstinencia a morfina provoca un aumento de la fosforilación de ERK_{1/2} en el PVN y NTS de rata, indicando por tanto que existe un aumento de su actividad. Además, el incremento en la actividad de las ERKs parece deberse solamente a un aumento en su estado de fosforilación, ya que no se observaron cambios en los niveles de proteína total en ninguno de los dos núcleos. Esto sugiere que los efectos del síndrome de abstinencia a morfina mediados por las ERK_{1/2} parecen ser consecuencia de la activación (vía fosforilación) de estas kinasas.

Este estudio muestra que el tratamiento crónico con morfina no induce cambios en la actividad basal de las ERKs en el PVN o el NTS. En este contexto,

estudios recientes [178] también demuestran que el tratamiento crónico con morfina no altera los niveles de MEK_{1/2} en diferentes regiones cerebrales, mientras que el síndrome de abstinencia a morfina induce una fuerte estimulación de MEK en el córtex frontal y el cuerpo estriado, indicando que el síndrome de abstinencia a morfina está asociado con una activación de la ruta de las ERKs. Estos resultados contrastan con otros realizados en otras áreas cerebrales. Por ejemplo, el tratamiento crónico con morfina incrementa la actividad de ERK_{1/2} en el VTA [179], el caudado/putamen y LC [180], mientras que disminuye su actividad en el NAc [177], la médula espinal, y algunas otras estructuras del cerebro de rata. Así, parece ser que la ruta de las ERKs estaría regulada de diferente forma dependiendo de las distintas áreas cerebrales, lo que indica la gran complejidad de las acciones de la morfina a nivel intracelular [16].

Es conocido que la dependencia y el síndrome de abstinencia a morfina alteran los niveles y/o la actividad de varios elementos de las rutas de señalización intracelular. Estos cambios adaptativos a nivel molecular implican alteraciones en la expresión génica y/o en proteínas quinasas, que son importantes en los procesos de señalización intracelular y expresión de genes [9]. Las ERKs son una familia de proteínas quinasas que fosforilan residuos de serina/treonina y que se han relacionado funcionalmente con la adicción a través de la fosforilación de factores de transcripción, lo cual conduciría a cambios en la expresión de sus genes diana [9]. El marcaje simple de pERK_{1/2} reveló que la activación de estas proteínas quinasas durante el síndrome de abstinencia a morfina tiene lugar en la porción parvocelular del PVN, que es la localización principal de neuronas CRF, y en las neuronas catecolaminérgicas del NTS. Los resultados del marcaje doble c-Fos/pERK_{1/2} apoyan resultados previos de nuestro grupo en los que se había demostrado un incremento de la expresión de c-Fos en la porción parvocelular del PVN y en el NTS durante el síndrome de

abstinencia a morfina [71]. La fosforilación de las ERKs es una de las vías más importantes que induce la expresión de c-Fos. Apoyando esta hipótesis, la administración de SL327 atenuó el incremento en la expresión de este factor de transcripción inducido por el síndrome de abstinencia a morfina, tanto en el PVN como en el NTS. Estos resultados sugieren que la activación de la ruta de las ERKs podría estar implicada en la hiperactividad de las neuronas de la región parvocelular del PVN y las neuronas catecolaminérgicas del NTS durante el síndrome de abstinencia a morfina.

Además, nuestros resultados muestran que, durante el síndrome de abstinencia, la mayoría de neuronas c-Fos positivas en la división parvocelular del PVN co-expresan pERK_{1/2}. El aumento en la actividad neuronal en el PVN (como indica el aumento en la expresión de c-Fos) podría estar relacionado con el incremento en la transcripción del gen de CRF, ya que se observó un aumento en el número de neuronas que expresan CRF en la porción parvocelular del PVN. La expresión de c-Fos se localizó en la mayoría de neuronas de CRF. Estos resultados sugieren que la activación de las ERKs en el PVN puede contribuir a la activación de las neuronas de CRF mediante la expresión de c-Fos.

El aumento en la actividad de las ERKs se traduce directamente en la fosforilación de proteínas efectoras citosólicas que gobiernan funciones neuronales específicas. La activación de las ERK_{1/2} en neuronas positivas para c-Fos en el NTS durante el síndrome de abstinencia a morfina es interesante, debido a evidencias previas que muestran que durante dicho síndrome la mayoría de neuronas TH positivas expresan c-Fos en ese núcleo [71-73]. Se ha demostrado que la actividad del CRF y noradrenérgica están incrementadas durante el síndrome de abstinencia de la mayoría de las drogas de abuso y, como ya se ha comentado anteriormente, se ha sugerido la interacción CRF-NA

puede ser un mecanismo que se pone en marcha durante el estrés y que contribuiría al desarrollo de adicción [40, 56]. Dado que TH es fosforilada en un residuo de Ser específico (Ser31) por las ERKs [151], es posible que la activación de las ERKs sea el modo mediante el cual se regula TH durante la dependencia de morfina. Todos estos datos sugieren que el síndrome de abstinencia a morfina podría estimular la actividad de las vías noradrenérgicas que inervan al PVN mediante el incremento de la actividad de las ERKs, lo cual está de acuerdo con resultados de otros grupos que muestran el incremento de la actividad de las ERKs en el VTA y que, por tanto, contribuiría al aumento en la expresión de TH inducida por la droga [181].

3. Regulación de la fosforilación de TH en la Serina31 y en la Serina40 durante el síndrome de abstinencia a morfina en el PVN y el NTS. Papel de las ERKs

Una gran variedad de agentes estresantes estimulan la síntesis de catecolaminas mediante la regulación de TH. La regulación a corto plazo de la síntesis de catecolaminas tiene lugar mediante la fosforilación de TH, lo cual incrementa su actividad enzimática, mientras que la regulación a largo plazo se realiza por cambios en los niveles de proteína total [151, 182]. La actividad de TH está directamente regulada por la fosforilación en los residuos de Ser31 y Ser40 [150, 151]. Los cambios en el estado de fosforilación de esta enzima están íntimamente ligados a la regulación de la síntesis de catecolaminas. En particular, un aumento en la fosforilación de estos dos residuos de serina acelera la actividad de TH, estimulando así la síntesis de neurotransmisor [150].

Como se ha comentado previamente, nuestro laboratorio ha demostrado que la activación de las terminales noradrenérgicas que inervan al PVN modula la respuesta del eje HHA durante el síndrome de abstinencia a morfina. Así, el

síndrome de abstinencia pero no la administración crónica de morfina incrementa el turnover de NA y la expresión de c-Fos en el PVN, concomitantemente con un aumento en la liberación de corticosterona y de la actividad de las neuronas catecolaminérgicas del NTS (como refleja la expresión de c-Fos; [68, 71, 72]). Estos efectos fueron inhibidos mediante la administración de antagonistas adrenérgicos, lo cual indica que la hiperactividad del eje HHA durante el síndrome de abstinencia a morfina está mediada por un aumento en la actividad noradrenérgica [108]. Adicionalmente, hemos demostrado que el síndrome de abstinencia a morfina está asociado con un incremento en la actividad enzimática de TH en el PVN [73]. Sin embargo, los residuos Ser de TH que se fosforilan durante el síndrome de abstinencia a morfina no están bien caracterizados.

Los resultados muestran que durante el síndrome de abstinencia a morfina aumentan los niveles de TH pSer31 en el PVN, concomitantemente con un incremento en la actividad enzimática de TH. También se ha observado el incremento de los niveles de TH pSer31 en el NTS, así como en el número de neuronas positivas para TH pSer31. Todos estos datos sugieren que la fosforilación de la enzima en la Ser31 puede tener un importante papel regulador de la actividad de TH durante el síndrome de abstinencia a morfina, y podría estar directamente implicado en el incremento del turnover de NA que se produce en el PVN durante dicho síndrome.

Es bien conocido que la fosforilación de TH en el residuo de Ser40 provoca un aumento considerable de su actividad enzimática [150]. Se ha demostrado la relación entre la fosforilación de TH en la Ser40, el aumento de su actividad enzimática y el incremento de catecolaminas in vivo. Así, se ha podido comprobar que la fosforilación de TH en Ser40 en el núcleo estriado aumenta concomitantemente con un incremento en la actividad enzimática de

TH y la biosíntesis de DOPA [183]. Sin embargo, también se ha evidenciado la activación de TH sin que esté fosforilada en la Ser40 [184]. En el presente estudio, el número de neuronas positivas para TH pSer40 no varió durante la dependencia de morfina en el NTS cuando lo comparamos con las ratas control. Tampoco se observaron cambios en los niveles de TH pSer40 en el PVN durante el síndrome de abstinencia. De estos resultados podría sugerirse que la fosforilación en la Ser40 no parece estar implicada en la activación de TH durante el síndrome de abstinencia a morfina, aunque sí podría ser la responsable de mantener su actividad basal. Nuestros datos concuerdan con resultados recientes que indican que la fosforilación mantenida de TH en la Ser40 podría ser el mecanismo mediante el cual se mantiene la biosíntesis de catecolaminas para reemplazar aquellas liberadas en respuesta a los estímulos nerviosos [185].

Como se ha comentado anteriormente, la exposición crónica a opioides induce numerosos procesos neuroadaptativos en el sistema noradrenérgico, incluyendo un aumento en la expresión de TH [8, 12, 98, 186]. Resultados recientes de nuestro grupo han demostrado la implicación del incremento en la actividad de la PKA en el aumento de los niveles de TH y de c-Fos durante el síndrome de abstinencia a morfina [13]. Además, también se ha comprobado que la activación de PKC puede ser crítica para la activación de las neuronas catecolaminérgicas bulbares en respuesta a la abstinencia de opioides [14]. En el estudio actual se ha podido constatar un aumento en los niveles de TH total en el NTS durante la dependencia de morfina, lo cual podría sugerir que los efectos de la morfina estarían mediados tanto por la activación (mediante fosforilación) de TH, como por un aumento de su expresión génica, lo cual concuerda con resultados previos de nuestro laboratorio [73]. Es bien conocido que la regulación de TH a través de los niveles de proteína y de su actividad enzimática controla la síntesis de catecolaminas. Ha sido demostrado que

ambos factores pueden ser regulados a dos niveles: regulación de la actividad de la enzima a corto plazo (por ejemplo mediante fosforilación), y regulación a medio/largo plazo a través de su expresión génica (regulación transcripcional; [182])[150]. Uno de los cambios bioquímicos más consistentes observados en respuesta a la exposición crónica de morfina es la regulación al alza de TH [12, 186]. Se ha comprobado que la administración crónica de morfina incrementa la inmunorreactividad de TH en el LC, lo cual podría indicar un aumento de la capacidad de estas neuronas para sintetizar NA [1]. Además, también se ha sugerido que las drogas que alteran la función catecolaminérgica pueden inducir cambios en el mRNA de TH y en la expresión de esta proteína. Así, se sabe que la morfina y la cocaína aumentan la inmunorreactividad de TH en los núcleos dopaminérgicos del sistema de recompensa.

En el gen de TH se ha identificado la secuencia AP-1 [187]. Puesto que tanto cocaína como morfina inducen la expresión de c-Fos, se ha sugerido que este factor de transcripción aumentaría la transcripción de TH mediante la unión a la secuencia AP-1 [182]. También se ha propuesto que los GC podrían ser una de las hormonas que regulen los niveles de mRNA para TH. Así, se ha demostrado que los GC incrementan los niveles de mRNA para TH y también de proteína total [188, 189], y se ha postulado la presencia de la secuencia GRE (elemento de unión a GC) en el gen de TH [182].

Todos estos datos sugieren que el síndrome de abstinencia a morfina podría incrementar los niveles de TH en el NTS a través de la expresión de c-Fos y de la liberación de corticosterona, lo cual está de acuerdo con resultados recientes indicando un aumento de los niveles de TH total en el NTS [73]. Se han obtenido resultados similares en el LC y el VTA, donde la morfina crónica aumenta la inmunorreactividad de TH mediante mecanismos transcripcionales [12, 186]. Nuestros resultados también muestran un aumento de la

inmunorreactividad de TH en el NTS de animales dependientes de morfina que recibieron salino en lugar de naloxona. Puesto que este tratamiento no induce aumentos ni en la expresión de c-Fos ni en la liberación de corticosterona, nuestros resultados sugieren que serían mecanismos post-transcripcionales los responsables de este incremento en los niveles de TH total, como se ha sugerido para otras áreas cerebrales [186].

Como se mencionó anteriormente, TH es fosforilada en el residuo de Ser31 de forma específica por las ERKs, y se ha comprobado que el síndrome de abstinencia a morfina induce una activación de estas kinasas. Por tanto, es posible que dicha activación de ERK_{1/2} sea la responsable de la regulación de la actividad de TH durante la dependencia de morfina. En nuestro estudio se administró el inhibidor de las MEK, SL327, para investigar la implicación de las ERK_{1/2} en la fosforilación de TH en la Ser31 durante el síndrome de abstinencia a morfina. La administración de 100 mg/kg de SL327 (una dosis que selectivamente bloquea a las MEK; [190]) disminuyó la fosforilación de TH en la Ser31 inducida por el síndrome de abstinencia a morfina en el PVN, mientras que en el NTS la abolió completamente. Estos datos sugieren que la activación de las ERKs facilita la fosforilación de TH en la Ser31.

Está bien documentado que la activación de las ERKs, y por tanto la fosforilación de TH, puede llevarse a cabo por dos vías, una dependiente de raf/MEK y otra independiente de esta ruta [191, 192]. Por ejemplo, los ésteres de forbol provocan la fosforilación de la TH en la Ser31, sugiriendo por tanto que la activación de las ERKs puede ser dependiente de PKC [149, 192]. Puesto que la fosforilación de TH en la Ser31 en el PVN no fue totalmente revertida por el inhibidor de las MEK, se podría sugerir que el síndrome de abstinencia a morfina induce esta fosforilación, al menos en parte, mediante la activación de las ERK_{1/2} por PKC.

De acuerdo con datos previos de nuestro laboratorio [108], los resultados obtenidos en nuestro trabajo actual muestran una hipersecreción de ACTH y corticosterona inducidas por el síndrome de abstinencia a morfina. Mientras que nuestros resultados indican que el síndrome de abstinencia a morfina induce la fosforilación de TH en la Ser31 y que este efecto estaría mediado, al menos en parte, por la activación de ERK_{1/2} dependiente de las MEK, la activación de las MEK parece no ser necesaria para la actividad secretora del eje HHA. Así, la administración de SL327 no inhibió el aumento en la liberación de ACTH y corticosterona que se produce durante la abstinencia de morfina. Estos datos nos permiten concluir que la actividad secretora del eje HHA depende probablemente de otras rutas de señalización intracelular. Resultados previos de nuestro grupo han demostrado que la administración de antagonistas de la PKC inhibe de forma significativa la secreción de corticosterona durante el síndrome de abstinencia a morfina [193]. Estos datos son consistentes con estudios que demostraron un aumento en la actividad de PKC en el PVN durante la dependencia a morfina, y podrían indicar que la PKC sería necesaria para la hiperactividad del eje HHA durante el síndrome de abstinencia a morfina [14].

En resumen, este estudio sugiere que la estimulación de la actividad de TH y el incremento en el turnover de NA durante el síndrome de abstinencia a morfina implicaría la activación de ERK_{1/2} y la fosforilación de TH en la Ser31, lo que es consistente con otros datos que muestran que la fosforilación de ERKs en el VTA contribuye al aumento de la expresión de TH [181]. Además, la actividad hipersecretora de eje HHA durante el síndrome de abstinencia a morfina parece ser independiente de la ruta MEK/ERKs.

4. Influencia de la adrenalectomía en la expresión del mRNA para TH, su fosforilación y activación en el NTS durante el síndrome de abstinencia a morfina

El eje HHA se activa tanto por el consumo de drogas como por la exposición a estímulos estresantes. Diversos estudios han demostrado que uno de los lugares de acción de las sustancias de abuso es el GR [194]. Se ha propuesto que los GC están implicados en la búsqueda compulsiva de las sustancias de abuso que caracteriza a la adicción [195], pero el papel desempeñado por el eje HHA en el consumo de drogas inducido por el estrés aún no ha sido totalmente clarificado. Una importante diana de los GC son las áreas noradrenérgicas bulbares que proyectan al PVN [196, 197]. Se ha comprobado que este sistema noradrenérgico está activado en situaciones de estrés [101, 198], y que media en la liberación de CRF y ACTH a través de la estimulación de receptores adrenérgicos [199]. Dado el importante papel del NTS en la respuesta del PVN durante el síndrome de abstinencia a opioides, es importante determinar si la ausencia de GC regula la función de TH en el NTS.

De acuerdo con los resultados obtenidos previamente en ratas de la cepa Sprague-Dawley, en ratas Wistar control se observó un aumento en la secreción de ACTH y corticosterona 2 h después de la administración de naloxona a ratas dependientes de morfina, respuesta que no se observó en animales adrenalectomizados (ADX/C). La adrenalectomía eliminó el incremento en la liberación de corticosterona en respuesta al síndrome de abstinencia, tal y como se esperaba. Además, los niveles plasmáticos de ACTH en las ratas ADX/C fueron significativamente superiores que los de las ratas control (sham). Por otra parte, y de acuerdo con trabajos previos de nuestro grupo, las ratas tratadas con morfina mostraron una menor ganancia de peso [200] que las tratadas con placebo. Esto podría ser debido a la menor ingesta de alimento

observada en estos animales. Esta pérdida de peso observada durante la dependencia a morfina fue similar a la descrita en animales tratados de forma intermitente con esta sustancia [158], lo cual se relacionó con el estrés crónico asociado a la abstinencia prolongada. Nuestros resultados también mostraron una menor ingesta de comida y ganancia de peso en los animales ADX/C que la de los sham, lo que parece confirmar la naturaleza orexigénica/adipogénica de los GC [201, 202].

El uso continuado de drogas en un individuo adicto puede verse reforzado por los síntomas que sufre durante el síndrome de abstinencia [5, 58]. El aumento de NA en el cerebro se ha relacionado durante largo tiempo con la dependencia de opioides [98] y también con los síntomas físicos que aparecen cuando se deja de consumir la droga [203, 204]. Además, los núcleos noradrenérgicos bulbares que inervan al hipotálamo y a la amígdala extendida influyen en los sistemas cerebrales que controlan múltiples facetas de la adicción, incluyendo la sensibilización, recompensa y recaídas [93, 204]. Sin embargo, los factores endógenos que regulan la función de las neuronas noradrenérgicas durante el síndrome de abstinencia a opioides son relativamente desconocidos.

El nivel basal de expresión de TH depende de una serie de factores reguladores de su transcripción. Las secuencias CRE y AP-1 se encuentran, entre otras, en la región promotora del gen de TH y participan en la expresión basal de esta enzima [205]. Además, se ha postulado la presencia de la secuencia GRE en el gen de TH [182], y se ha propuesto que los GC serían unas de las hormonas que regularían los niveles de mRNA para esta enzima. Así, se ha comprobado un incremento de mRNA y de proteína TH en presencia de GC [188, 189]. Nuestros resultados muestran un aumento de GC en las ratas sham durante el síndrome de abstinencia a morfina inducido por naloxona,

paralelamente a un aumento en los niveles de mRNA para TH en el NTS, lo cual sugiere que la expresión de TH está controlada por una regulación de tipo transcripcional. Resultados similares se han obtenido en el LC y el VTA, en los cuales la morfina crónica aumenta la inmunorreactividad de TH mediante un mecanismo transcripcional [12, 186]. Puesto que nuestros resultados muestran que la adrenalectomía no induce un aumento significativo en la expresión de mRNA para TH, estos datos claramente sugieren que los GC estarían implicados en el incremento de la expresión del mRNA para TH en el NTS.

Aunque ha sido propuesto que la estimulación de los GRs aumenta la transcripción del gen de TH, su mecanismo de acción aún es desconocido. En la región promotora del gen de TH de diferentes especies se ha identificado una secuencia parecida a la secuencia consenso GRE [182]. También es sabido que los grupos celulares noradrenérgicos del bulbo expresan elevados niveles de GRs [196], y se ha demostrado que los GC facilitan la transmisión noradrenérgica [197]. Estos datos concuerdan con resultados de nuestro grupo que muestran que la activación del eje HHA durante el síndrome de abstinencia a morfina depende de la transmisión noradrenérgica.

Los resultados obtenidos en ratas Wistar, al igual que los observados previamente en Sprague-Dawley, muestran un aumento de la inmunorreactividad de TH en ratas tratadas de forma crónica con morfina y que recibieron salino en lugar de naloxona. Puesto que este tratamiento no induce ni la expresión de c-Fos ni la liberación de GC, nuestros resultados parecen sugerir que serían mecanismos post-transcripcionales los responsables del aumento de la inmunorreactividad de TH, tal y como ha sido propuesto para otras áreas [186]. Paralelamente, también hemos observado que los animales ADX/C no muestran el incremento en la expresión de mRNA o de proteína total de TH en el NTS, lo cual permita sugerir que para que ocurra el

aumento tanto de mRNA como de proteína total es necesario el incremento en los niveles plasmáticos de corticosterona. De acuerdo con nuestros resultados, previamente se ha demostrado que la supresión de GRs modifica la respuesta del mRNA para TH tras la exposición a cocaína [206].

Nuestros resultados muestran que la administración de naloxona a ratas dependientes de morfina produjo un incremento en el número de neuronas TH pSer31 positivas en NTS. Concomitantemente, la actividad enzimática de TH aumentó a nivel del PVN. El hecho de que en ratas ADX/C el número de neuronas positivas para TH pSer31 no cambie durante el síndrome de abstinencia a morfina, en paralelo a una disminución de la actividad de la enzima, sugiere que los GC podrían estimular las vías noradrenérgicas que inervan al PVN a través de la fosforilación en la Ser31. Puesto que recientemente se ha postulado que las ERKs son cruciales para algunas de las acciones de los GC [207, 208], todos estos datos sugieren que la actividad de las ERKs estaría implicada en la activación de TH inducida por los GC.

En conclusión, la expresión del mRNA para TH en el NTS podría estar regulada por los GC liberados durante el síndrome de abstinencia a morfina. De acuerdo con esta hipótesis, no se observaron cambios en la fosforilación (activación) en el NTS ni la actividad enzimática de TH en el PVN de ratas ADX/C. Esta regulación al alza de la expresión de TH y de su actividad catalítica en animales sham durante el síndrome de abstinencia aumentaría la capacidad de las neuronas noradrenérgicas para sintetizar NA a nivel de las terminales procedentes del NTS, lo cual contribuiría al gran incremento del turnover de NA en el PVN y de la actividad del eje HHA asociada a él.

VII. CONCLUSIONES

1. De acuerdo con resultados previos, nuestro estudio indica que el síndrome de abstinencia a morfina cursa con una hiperactivación del eje HHA, como indican los elevados niveles plasmáticos de ACTH y corticosterona. Concomitantemente se produce una marcada activación (expresión de c-Fos) en el PVN, asociada a un incremento en la expresión de los genes que codifican para CRF y AVP en la región parvocelular de dicho núcleo. Estos resultados indican que la activación del eje HHA durante la abstinencia de morfina implica la regulación transcripcional de los neuropéptidos CRF y AVP.
2. Durante el síndrome de abstinencia se observó un incremento de la expresión de c-Fos en áreas noradrenérgicas A₂ y A₆ que inervan al PVN y otras áreas relacionadas con el sistema cerebral del estrés. Dicha activación podría estar directamente relacionada con el incremento en la actividad noradrenérgica que se produce durante dicho síndrome. Además, c-Fos también se expresó en numerosas áreas implicadas en la adicción. Todos estos procesos podrían contribuir a facilitar la respuesta al estrés que se produce en sujetos dependientes durante la abstinencia a opiáceos.
3. El síndrome de abstinencia cursa con una activación de la ruta de señalización de las ERK_{1/2}, tanto en PVN como en NTS-A₂. Dicha activación se produce en neuronas de CRF (PVN) y noradrenérgicas (NTS-A₂). La colocalización de pERK y c-Fos confirma la activación de dichas neuronas. Por otra parte, el bloqueo de la expresión de c-Fos cuando se inhibe farmacológicamente la activación de ERKs indica que la expresión de dicho factor de transcripción está modulada por la ruta de las ERKs. Todos estos datos sugieren que dicha vía de señalización sería

en parte la responsable de la activación de las vías relacionadas con el estrés durante el síndrome de abstinencia a opioides.

4. Nuestros resultados muestran que el síndrome de abstinencia a morfina indujo un aumento en la fosforilación (activación) de TH en Ser31 (pero no en Ser40), tanto en PVN como en el área A₂, junto con un incremento de la TH total en NTS-A₂ y a un aumento en la actividad enzimática de TH en PVN. La activación de TH en Ser31 fue inhibida por SL327. Estos resultados sugieren que el síndrome de abstinencia podría estimular la actividad de la enzima TH y el turnover de NA en PVN mediante un proceso que depende de la activación de ERKs y posterior fosforilación de la TH en Ser31. Sin embargo, la actividad hormonal secretora del eje HHA parece depender de otras vías de transducción independientes de ERKs.
5. Durante el síndrome de abstinencia a morfina se produjo un incremento en la expresión de mRNA para TH en NTS-A₂, lo que indica que el incremento en los niveles de TH observado en dicho núcleo es consecuencia de una regulación transcripcional.
6. En animales adrenalectomizados (ADX/C) no se observó este incremento de mRNA para TH, ni tampoco el aumento en los niveles de TH total en NTS-A₂ típicos del síndrome de abstinencia. En ADX/C no se produjeron modificaciones en el número de neuronas de TH fosforiladas en Ser31 en NTS durante la abstinencia. Paralelamente se produjo una disminución de la actividad enzimática de TH en PVN. Estos resultados sugieren que la elevación de los niveles de GC que se produce durante el síndrome de abstinencia podría tener una función permisiva en la activación de las

vías noradrenérgicas que inervan el PVN.

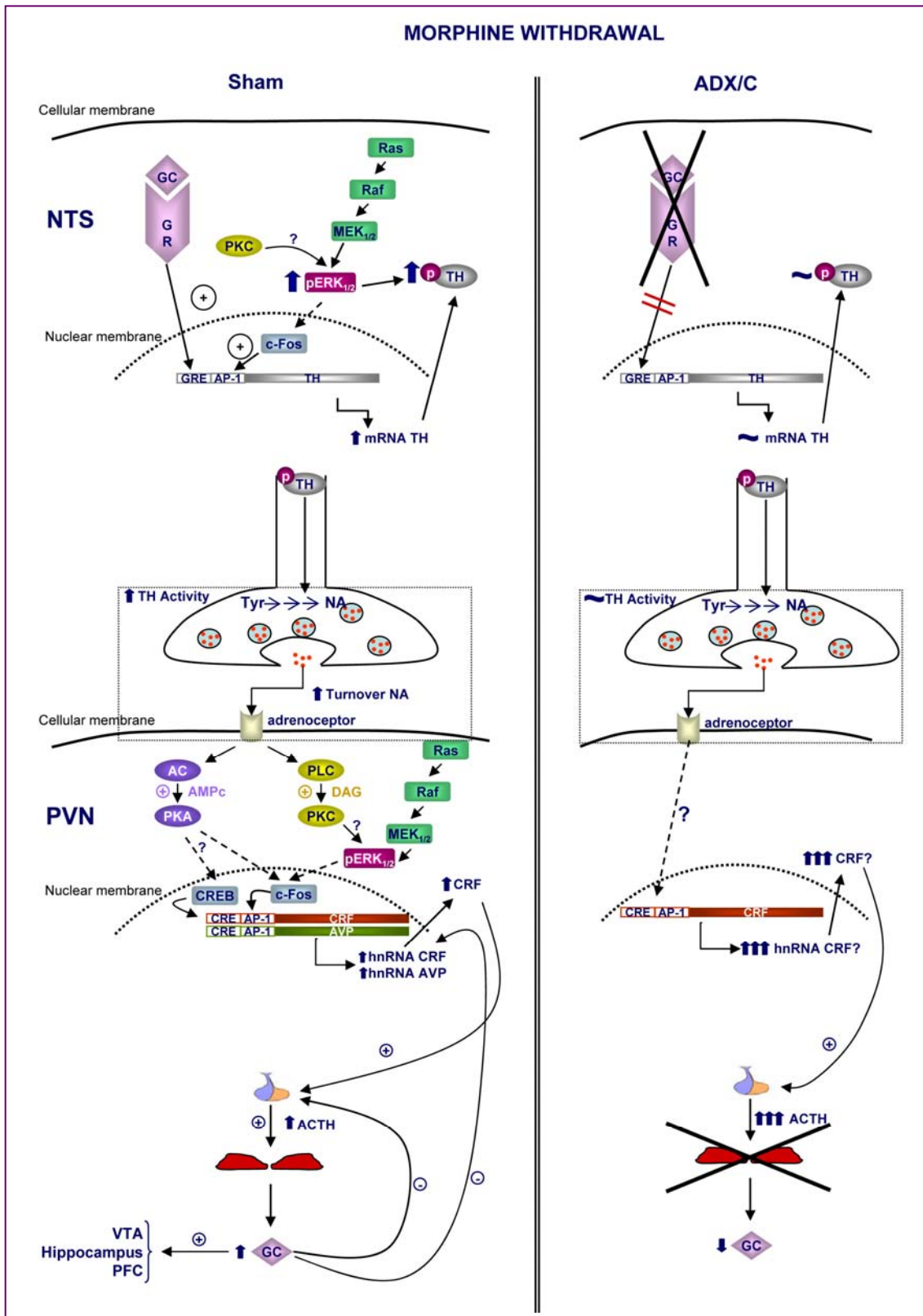


Figura 18. Representación esquemática de los cambios observados en el eje del estrés y NTS-A2 durante el síndrome de abstinencia a morfina

VIII. BIBLIOGRAFÍA

1. **Koob GF, Le Moal M** (2005) Plasticity of reward neurocircuitry and the 'dark side' of drug addiction. *Nat Neurosci* 8: 1442-1444
2. **Kalivas PW, O'Brien C** (2008) Drug Addiction as a Pathology of Staged Neuroplasticity. *Neuropsychopharmacology* 33: 166-180
3. **Gill K, Amit Z, Koe BK** (1988) Treatment with sertraline, a new serotonin uptake inhibitor, reduces voluntary ethanol consumption in rats. *Alcohol* 5: 349-354
4. **Cami J, Farre M** (2003) Drug Addiction. *N Engl J Med* 349: 975-986
5. **Koob GF, Le Moal M** (2001) Drug addiction, dysregulation of reward and allostasis. *Neuropsychopharmacology* 24: 97-129
6. **Cleck JN, Blendy JA** (2008) Making a bad thing worse: adverse effects of stress on drug addiction. *J Clin Invest* 118: 454-461
7. **Le Moal M, Koob GF** (2007) Drug addiction: Pathways to the disease and pathophysiological perspectives. *Eur Neuropsychopharmacol* 17: 377-393
8. **Nestler EJ, Aghajanian GK** (1997) Molecular and cellular basis of addiction. *Science* 278: 58-63
9. **Liu JG, Anand KJ** (2001) Protein kinases modulate the cellular adaptations associated with opioid tolerance and dependence. *Brain Res Brain Res Rev* 38: 1-19
10. **Williams JT, Christie MJ, Manzoni O** (2001) Cellular and synaptic adaptations mediating opioid dependence. *Physiol Rev* 81: 299-343
11. **Nestler EJ** (2004) Molecular mechanisms of drug addiction. *Neuropharmacology* 47: 24-32
12. **Nestler EJ** (1992) Molecular mechanism of drug addiction. *J Neurosci* 12: 2439-2450
13. **Benavides M, Laorden ML, Milanes MV** (2005) Involvement of 3',5'-cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase in regulation of Fos expression and tyrosine hydroxylase levels during morphine withdrawal in the hypothalamic paraventricular nucleus and medulla oblongata catecholaminergic cell groups. *J Neurochem* 92: 246-254
14. **Benavides M, Laorden ML, Marin MT, Milanes MV** (2005) Role of PKC- α,γ isoforms in regulation of c-Fos and TH expression after naloxone-induced morphine withdrawal in the hypothalamic PVN and medulla oblongata catecholaminergic cell groups. *J Neurochem* 95: 1249-1258
15. **Ventayol P, Busquets X, Garcia-Sevilla JA** (1997) Modulation of immunoreactive protein kinase C α and β isoforms and G proteins by acute and chronic treatments with morphine and other opiate drugs in rat brain. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 355: 491-500
16. **Eitan S, Bryant CD, Saliminejad N, Yang YC, Vojdani E, Keith D, Jr., Polakiewicz R, Evans CJ** (2003) Brain Region-Specific Mechanisms for Acute Morphine-Induced Mitogen-Activated Protein Kinase Modulation and Distinct Patterns of Activation during Analgesic Tolerance and Locomotor Sensitization. *J Neurosci* 23: 8360-8369

17. **Mazzucchelli C, Vantaggiato C, Krezel W, Welzl H, Wolfer D, Pagès G, Valverde O** (2002) Knockout of ERK1 MAP Kinase Enhances Synaptic Plasticity in the Striatum and Facilitates Striatal-Mediated Learning and Memory. *Neuron* 34: 807-820
18. **Cao JL, He JH, Ding HL, Zeng YM** (2005) Activation of the spinal ERK signalling pathways contributes naloxone-precipitated withdrawal in morphine dependents rats. *Pain* 118: 336-349
19. **Valjent E, Pages C, Herve D, Girault JA, Caboche J** (2004) Addictive and non-addictive drugs induce distinct and specific patterns of ERK activation in mouse brain. *Eur J Neurosci* 19: 1826-1836
20. **Shaywitz AJ, Greenberg ME** (1999) CREB: A Stimulus-Induced Transcription Factor Activated by A Diverse Array of Extracellular Signals. *Annu Rev Biochem* 68: 821-861
21. **Mayr B, Montminy M** (2001) Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2: 599-609
22. **Chao J, Nestler EJ** (2004) Molecular Neurobiology of Drug Addiction. *Annu Rev Med* 55: 113-132
23. **Lonze BE, Ginty DD** (2002) Function and Regulation of CREB Family Transcription Factors in the Nervous System. *Neuron* 35: 605-623
24. **Barrot M, Olivier JDA, Perrotti LI, DiLeone RJ, Berton O, Eisch AJ, Impey S, Storm DR, Neve RL, Yin JC, Zachariou V, Nestler EJ** (2002) CREB activity in the nucleus accumbens shell controls gating of behavioral responses to emotional stimuli. *PNAS* 99: 11435-11440
25. **Self DW** (1998) Neural substrates of drug craving and relapse in drug addiction. *Annals Med* 30: 379-389
26. **Carlezon WA, Jr., Thome J, Olson VG, Lane-Ladd SB, Brodtkin ES, Hiroi N, Duman RS, Neve RL, Nestler EJ** (1998) Regulation of Cocaine Reward by CREB. *Science* 282: 2272-2275
27. **Cole RL, Konradi C, Douglass J, Hyman SE** (1995) Neuronal adaptation to amphetamine and dopamine: Molecular mechanisms of prodynorphin gene regulation in rat striatum. *Neuron* 14: 813-823
28. **Goodman A** (2008) Neurobiology of addiction. An integrated review. *Biochem Pharmacol* 75: 266-322
29. **Maldonado R, Blendy JA, Tzavara E, Gass P, Roques BP, Haoune J, Schütz G** (1996) Reduction of morphine abstinence in mice with a mutation in the gene encoding CREB. *Science* 273: 657-659
30. **Mumberg D, Lucibello FC, Schuermann M, Muller R** (1991) Alternative splicing of fosB transcripts results in differentially expressed mRNAs encoding functionally antagonistic proteins. *Genes Dev* 5: 1212-1223

31. **Hope BT, Kelz MB, Duman RS, Nestler EJ** (1994) Chronic electroconvulsive seizure (ECS) treatment results in expression of a long-lasting AP-1 complex in brain with altered composition and characteristics. *J Neurosci* 14: 4318-4328
32. **Chen J, Kelz MB, Hope BT, Nakabeppu Y, Nestler EJ** (1997) Chronic Fos-Related Antigens: Stable Variants of Delta FosB Induced in Brain by Chronic Treatments. *J Neurosci* 17: 4933-4941
33. **Moratalla R, Elibol B, Vallejo M, Graybiel AM** (1996) Network-Level Changes in Expression of Inducible Fos-Jun Proteins in the Striatum during Chronic Cocaine Treatment and Withdrawal. *Neuron* 17: 147-156
34. **Hiroi N, Brown JR, Haile CN, Ye H, Greenberg ME, Nestler EJ** (1997) FosB mutant mice: Loss of chronic cocaine induction of Fos-related proteins and heightened sensitivity to cocaine's psychomotor and rewarding effects. *PNAS* 94: 10397-10402
35. **Hughes P, Dragunow M** (1995) Induction of immediate-early genes and the control of neurotransmitter-regulated gene expression within the nervous system. *Pharmacol Rev* 47: 133-178
36. **Kovács K** (1998) c-Fos as a transcription factor: a stressful (re)view from a functional map. *Neurochem Int* 33: 287-297
37. **Sabban EL, Hiremagalur B, Nankova B, Kvetnanský R** (1995) Molecular biology of stress-elicited induction of catecholamine biosynthetic enzymes. *Ann N Y Acad Sci* 771: 327-338
38. **McClung CA, Nestler EJ** (2008) Neuroplasticity Mediated by Altered Gene Expression. *Neuropsychopharmacology* 33: 3-17
39. **Koob GF** (1992) Drugs of abuse: anatomy, pharmacology and function of reward pathways. *Trends Pharmacol Sci* 13: 177-184
40. **Koob GF, Le Moal M** (2008) Addiction and the brain antireward system. *Ann Rev Physiol* 59: 29-53
41. **Koob GF** (2003) Neuroadaptive mechanisms of addiction: studies on the extended amygdala. *Eur Neuropsychopharmacol* 13: 442-452
42. **Koob GF** (2006) The neurobiology of addiction: a neuroadaptational view relevant for diagnosis. *Addiction* 101: 23-30
43. **Kreek MJ, Koob GF** (1998) Drug dependence: stress and dysregulation of brain reward pathways. *Drug Alcohol Depend* 51: 23-47
44. **Martínez-Piñero MG, Milanés MV, Alcaraz C, Vargas ML** (1994) Catecholaminergic mediation of morphine-induced activation of pituitary-adrenocortical axis in the rat: implication of α - and β -adrenoceptors. *Brain Res* 668: 122-128
45. **Olive MF, Koenig HN, Nannini MA, Hodge CW** (2002) Elevated extracellular CRF levels in the bed nucleus of the stria terminalis during ethanol withdrawal and reduction by subsequent ethanol intake. *Pharmacol Biochem Behav* 72: 213-220

46. **Roy A, Pandey SC** (2002) The Decreased Cellular Expression of Neuropeptide Y Protein in Rat Brain Structures During Ethanol Withdrawal After Chronic Ethanol Exposure. *Alcohol Clin Exp Res* 26: 796-803
47. **Melis M, Spiga S, Diana M** (2005) The Dopamine Hypothesis of Drug Addiction: Hypodopaminergic State. In: Ronald JB (ed). *International Review of Neurobiology*. Academic Press, 101-154
48. **Nestler EJ** (2005) Is there a common molecular pathway for addiction? *Nat Neurosci* 8: 1445-1449
49. **Maldonado R, Valverde O, Berrendero F** (2006) Involvement of the endocannabinoid system in drug addiction. *Trends Neurosci* 29: 225-232
50. **Feltenstein MW, See RE** (2008) The neurocircuitry of addiction: an overview. *Br J Pharmacol* 154: 261-274
51. **Volkow ND** (2004) Imaging the Addicted Brain: From Molecules to Behavior. *J Nucl Med* 45: 13N-24
52. **Heidbreder C** (2005) Novel pharmacotherapeutic targets for the management of drug addiction. *Eur J Pharmacol* 526: 101-112
53. **Hyman SE, Malenka RC** (2001) Addiction and the brain: The neurobiology of compulsion and its persistence. *Nat Rev Neurosci* 2: 695-703
54. **Kalivas PW** (2005) How do we determine which drug-induced neuroplastic changes are important? *Nat Neurosci* 8: 1440-1441
55. **Volkow ND, Fowler JS, Wang GJ** (2003) Positron emission tomography and single-photon emission computed tomography in substance abuse research. *Semin Nucl Med* 33: 114-128
56. **Koob GF** (1999) Stress, corticotropin-releasing factor, and drug addiction. *Ann N Y Acad Sci* 897: 27-45
57. **Koob G, Kreek MJ** (2007) Stress, Dysregulation of Drug Reward Pathways, and the Transition to Drug Dependence. *Am J Psychiatry* 164: 1149-1159
58. **Koob GF, Moal ML** (1997) Drug Abuse: Hedonic Homeostatic Dysregulation. *Science* 278: 52-58
59. **Weiss F, Ciccocioppo R, Parsons LH, Katner S, Liu X, Zorrilla EP, Valdez GR, Ben-Shahar O, Angeletti S, Richter RR** (2001) Compulsive Drug-Seeking Behavior and Relapse: Neuroadaptation, Stress, and Conditioning Factors. *Ann NY Acad Sci* 937: 1-26
60. **Vale W, Vaughan J, Smith M, Yamamoto G, Rivier J, Rivier C** (1983) Effects of synthetic ovine corticotropin-releasing factor, glucocorticoids, catecholamines, neurohypophysial peptides, and other substances on cultured corticotropic cells. *Endocrinology* 113: 1121-1131

61. **Kovács K, Sawchenko PE** (1996) Sequence of stress-induced alteration in indices of synaptic and transcriptional activation in parvocellular neurosecretory neurons. *J Neurosci* 16: 262-273
62. **Kovács KJ, Földes A, Sawchenko PE** (2000) Glucocorticoid negative feedback selectively targets vasopressin transcription in parvocellular neurosecretory neurons. *J Neurosci* 20: 3843-3852
63. **Swanson LW, Simmons DM** (1989) Differential steroid hormone and neural influences on peptide mRNA levels in CRH cells of the paraventricular nucleus: a hybridization histochemical study in the rat. *J Comp Neurol* 285: 413-435
64. **Piazza PV, Le Moal M** (1998) The role of stress in drug self-administration. *Trends Pharmacol Sci* 19: 67-74
65. **Saal D, Dong Y, Bonci A, Malenka RC** (2003) Drugs of Abuse and Stress Trigger a Common Synaptic Adaptation in Dopamine Neurons. *Neuron* 37: 577-582
66. **Marinelli M, Aouizerate B, Barrot M, Le Moal M, Piazza PV** (1998) Dopamine-dependent responses to morphine depend on glucocorticoid receptors. *PNAS* 95: 7742-7747
67. **Barrot M, Marinelli M, Abrous DN, Rouge-Pont F, Le Moal M, Piazza PV** (2000) The dopaminergic hyper-responsiveness of the shell of the nucleus accumbens is hormone-dependent. *Eur J Neurosci* 12: 973-979
68. **Fuertes G, Laorden ML, Milanés MV** (2000) Noradrenergic and dopaminergic activity in the hypothalamic paraventricular nucleus after naloxone-induced morphine withdrawal. *Neuroendocrinology* 71: 60-67
69. **Laorden ML, Castells MT, Martínez MD, Martínez PJ, Milanés MV** (2000) Activation of c-fos expression in hypothalamic nuclei by μ - and κ -receptor agonists. Correlation with catecholaminergic activity in the hypothalamic paraventricular nucleus. *Endocrinology* 141: 1366-1376
70. **Martínez PJ, Laorden ML, Cerezo M, Martínez-Piñero MG, Milanés MV** (2001) Characterization of the signal transduction pathways mediating morphine withdrawal-stimulated c-fos expression in hypothalamic nuclei. *Eur J Pharmacol* 430: 59-68
71. **Laorden ML, Núñez C, Almela P, Milanés MV** (2002) Morphine withdrawal-induced c-fos expression in the hypothalamic paraventricular nucleus is dependent on the activation of catecholaminergic neurones. *J Neurochem* 83: 132-140
72. **Laorden ML, Castells MT, Milanés MV** (2002) Effects of morphine and morphine withdrawal on brainstem neurons innervating hypothalamic nuclei that control the pituitary-adrenocortical axis in rats. *Br J Pharmacol* 136: 67-75
73. **Benavides M, Laorden ML, García-Borrón JC, Milanés MV** (2003) Regulation of tyrosine hydroxylase levels and activity and Fos expression during opioid withdrawal in the hypothalamic PVN and medulla oblongata catecholaminergic cell groups innervating the PVN. *Eur J Neurosci* 17: 103-112

74. **Milanés MV, Laorden ML, Chapleur-Chateau M, Burlet A** (1998) Alterations in corticotropin-releasing factor and vasopressin content in rat brain during morphine withdrawal. Correlation with hypothalamic noradrenergic activity and pituitary-adrenal response. *J Pharmacol Exp Ther* 285: 700-706
75. **Milanés MV, Laorden ML, Angel E, Tankosic P, Burlet A** (2002) Effect of naloxone-precipitated morphine withdrawal on CRH and vasopressin mRNA expression in the rat hypothalamic paraventricular nucleus. *Neurosci Lett* 334: 58-62
76. **Lightman SL, Young WS** (1988) Corticotrophin-releasing factor, vasopressin and proopiomelanocortin mRNA responses to stress and opiates in the rat. *J Physiol* 403: 511-523
77. **Harbuz M, Russell JA, Sumner BEH, Kawata M, Lightman SL** (1991) Rapid changes in the content of proenkephalin A and corticotrophin releasing hormone mRNAs in the paraventricular nucleus during morphine withdrawal in urethane-anesthetized rats. *Mol Brain Res* 9: 285-291
78. **McNally GP, Akil H** (2002) Role of corticotropin-releasing hormone in the amygdala and bed nucleus of the stria terminalis in the behavioral, pain modulatory, and endocrine consequences of opiate withdrawal. *Neuroscience* 112: 605-617
79. **Houshyar H, Gomez F, Manalo S, Bhargava A, Dallman MF** (2003) Intermittent Morphine Administration Induces Dependence and is a Chronic Stressor in Rats. *Neuropsychopharmacology* 28: 1960-1972
80. **Koob GF, Heinrichs SC** (1999) A role for corticotropin releasing factor and urocortin in behavioral responses to stressors. *Brain Res* 848: 141-152
81. **Caine SB, Heinrichs SC, Coffin VL, Koob GF** (1995) Effects of the dopamine D-1 antagonist SCH 23390 microinjected into the accumbens, amygdala or striatum on cocaine self-administration in the rat. *Brain Res* 692: 47-56
82. **Epping-Jordan MP, Markou A, Koob GF** (1998) The dopamine D-1 receptor antagonist SCH 23390 injected into the dorsolateral bed nucleus of the stria terminalis decreased cocaine reinforcement in the rat. *Brain Res* 784: 105-115
83. **Funk D, Li Z, Le AD** (2006) Effects of environmental and pharmacological stressors on c-fos and corticotropin-releasing factor mRNA in rat brain: Relationship to the reinstatement of alcohol seeking. *Neuroscience* 138: 235-243
84. **Pich EM, Lorang M, Yeganeh M, Rodriguez de Fonseca F, Raber J, Koob GF, Weiss F** (1995) Increase of extracellular corticotropin-releasing factor-like immunoreactivity levels in the amygdala of awake rats during restraint stress and ethanol withdrawal as measured by microdialysis. *J Neurosci* 15: 5439-5447
85. **Zorrilla EP, Koob GF** (2004) The therapeutic potential of CRF1 antagonists for anxiety. *Expert Opin Investig Drugs* 13: 799-828
86. **Specio S, Wee S, O'Dell LE, Boutrel B, Zorrilla E, Koob G** (2008) CRF1 receptor antagonists attenuate escalated cocaine self-administration in rats. *Psychopharmacology* 196: 473-482

87. **George O, Ghozland S, Azar MR, Cottone P, Zorrilla EP, Parsons LH, O'Dell LE, Richardson HN, Koob GF** (2007) CRF CRF1 system activation mediates withdrawal-induced increases in nicotine self-administration in nicotine-dependent rats. *PNAS* 104: 17198-17203
88. **de Quidt ME, Emson PC** (1986) Distribution of neuropeptide Y-like immunoreactivity in the rat central nervous system--II. Immunohistochemical analysis. *Neuroscience* 18: 545-618
89. **Heilig M, Koob GF, Ekman R, Britton KT** (1994) Corticotropin-releasing factor and neuropeptide Y: role in emotional integration. *Trends in Neurosci* 17.: 80-85
90. **Palmiter RD, Erickson JC, Hollopeter G, Baraban SC, Schwartz MW** (1998) Life without neuropeptide Y. *Recent Prog Horm Res* 53: 163-199
91. **Grenhoff J, Svensson TH** (1993) Prazosin modulates the firing pattern of dopamine neurons in rat ventral tegmental area. *Eur J Pharmacol* 233: 79-84
92. **Devoto P, Flore G, Saba P, Fa M, Gessa GL** (2005) Stimulation of the locus coeruleus elicits noradrenaline and dopamine release in the medial prefrontal and parietal cortex. *J Neurochem* 92: 368-374
93. **Weinshenker D, Schroeder JP** (2006) There and Back Again: A Tale of Norepinephrine and Drug Addiction. *Neuropsychopharmacology* 32: 1433-1451
94. **Le AD, Harding S, Juzytsch W, Funk D, Shaham Y** (2005) Role of alpha-2 adrenoceptors in stress-induced reinstatement of alcohol seeking and alcohol self-administration in rats. *Psychopharmacology* 179: 366-373
95. **Drouin C, Darracq L, Trovero F, Blanc G, Glowinski J, Cotecchia S, Tassin JP** (2002) α_{1b} -Adrenergic Receptors Control Locomotor and Rewarding Effects of Psychostimulants and Opiates. *J Neurosci* 22: 2873-2884
96. **Zarrindast MR, Bahreini T, Adl M** (2002) Effect of imipramine on the expression and acquisition of morphine-induced conditioned place preference in mice. *Pharmacol Biochem Behav* 73: 941-949
97. **Sahraei H, Ghazzaghi H, Zarrindast MR, Ghoshooni H, Sepehri H, Haeri-Rohan A** (2004) The role of α -adrenoceptor mechanism(s) in morphine-induced conditioned place preference in female mice. *Pharmacol Biochem Behav* 78: 135-141
98. **Maldonado R** (1997) Participation of noradrenergic pathways in the expression of opiate withdrawal: biochemical and pharmacological evidence. *Neurosci Biobehav Rev* 1: 91-104
99. **Fuertes G, Milanés MV, Rodríguez-Gago M, Marín MT, Laorden ML** (2000) Changes in hypothalamic paraventricular nucleus catecholaminergic activity after acute and chronic morphine administration. *Eur J Pharmacol* 388: 49-56
100. **Dunn AJ, Swiergiel AH** (2008) The role of corticotropin-releasing factor and noradrenaline in stress-related responses, and the inter-relationships between the two systems. *Eur J Pharmacol* 583: 186-193

101. **Pacak K, Palkovits M, Kopin IJ, Goldstein DS** (1995) Stress-induced norepinephrine release in the hypothalamic paraventricular nucleus and pituitary-adrenocortical and sympathoadrenal activity: in vivo microdialysis studies. *Front Neuroendocrinol* 16: 89-150
102. **Quirarte GL, Galvez R, Roozendaal B, McGaugh JL** (1998) Norepinephrine release in the amygdala in response to footshock and opioid peptidergic drugs. *Brain Res* 808: 134-140
103. **Raber J, Koob GF, Bloom FE** (1995) Interleukin-2 (IL-2) induces corticotropin-releasing factor (CRF) release from the amygdala and involves a nitric oxide-mediated signalling; comparison with the hypothalamic response. *J Pharmacol Exp Ther* 272: 815-824
104. **Cunningham ET, Sawchenko PE** (1988) Anatomical specificity of noradrenergic inputs to the paraventricular and supraoptic nuclei of the rat hypothalamus. *J Comp Neurol* 274: 60-76
105. **Sawchenko PE, Swanson LW** (1982) The organization of noradrenergic pathways from the brainstem to the paraventricular and supraoptic nuclei in the rat. *Brain Res Rev* 4: 275-325
106. **Daftary SS, Boudaba C, Tasker JG** (2000) Noradrenergic regulation of parvocellular neurons in the rat hypothalamic paraventricular nucleus. *Neuroscience* 96: 743-751
107. **Vargas ML, Martínez-Piñero MG, Milanés MV** (1997) Neurochemical activity of noradrenergic neurons and pituitary-adrenal response after naloxone-induced withdrawal: the role of calcium channels. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 355: 501-506
108. **Laorden ML, Fuertes G, González-Cuello A, Milanés MV** (2000) Changes in catecholaminergic pathways innervating paraventricular nucleus and pituitary-adrenal axis response during morphine dependence: implication of α_1 - and α_2 -adrenoceptors. *J Pharmacol Exp Ther* 293: 578-584
109. **Gray TS, Magnuson DJ** (1987) Neuropeptide neuronal efferents from the bed nucleus of the stria terminalis and central amygdaloid nucleus to the dorsal vagal complex in the rat. *J Comp Neurol* 262: 365-374
110. **Sinha R** (2007) The role of stress in addiction relapse. *Curr Psych Report* 9: 388-395
111. **Robinson TE, Kolb B** (1999) Alterations in the morphology of dendrites and dendritic spines in the nucleus accumbens and prefrontal cortex following repeated treatment with amphetamine or cocaine. *Eur J Neurosci* 11: 1598-1604
112. **Liston C, Miller MM, Goldwater DS, Radley JJ, Rocher AB, Hof PR, Morrison JH, McEwen BS** (2006) Stress-Induced Alterations in Prefrontal Cortical Dendritic Morphology Predict Selective Impairments in Perceptual Attentional Set-Shifting. *J Neurosci* 26: 7870-7874
113. **Shaw-Lutchman TZ, Barrot M, Wallace T, Gilden L, Zachariou V, Impey S, Duman RS, Storm D, Nestler EJ** (2002) Regional and Cellular Mapping of cAMP Response Element-Mediated Transcription during Naltrexone-Precipitated Morphine Withdrawal. *J Neurosci* 22: 3663-3672

114. **Ignar DM, Kuhn CM** (1990) Effects of specific μ and κ opiate tolerance and abstinence on hypothalamo-pituitary-adrenal axis secretion in the rat. *J Pharmacol Exp Ther* 255: 1287-1295
115. **Borowsky B, Kuhn CM** (1993) GBR12909 stimulates hypothalamo-pituitary-adrenal activity by inhibition of uptake at hypothalamic dopaminergic neurons. *Brain Res* 613: 251-258
116. **Benwell ME, Balfour DJ** (1979) Effects of nicotine administration and its withdrawal on plasma corticosterone and brain 5-hydroxyindoles. *Psychopharmacology (Berl)* 63: 7-11
117. **Spencer RL, McEwen BS** (1990) Adaptation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis to chronic ethanol stress. *Neuroendocrinology* 52: 481-489
118. **Harfstrand A, Fuxe K, Cintra A, Agnati LF, Zini I, Wikstrom AC, Okret S, Yu ZY, Goldstein M, Steinbusch H, Verhofstad A, Gustafsson JA** (1986) Glucocorticoid Receptor Immunoreactivity in Monoaminergic Neurons of Rat Brain. *PNAS* 83: 9779-9783
119. **Elman I, Lukas SE, Karlsgodt KH, Gasic GP, Breiter HC** (2003) Acute cortisol administration triggers craving in individuals with cocaine dependence. *Psychopharmacol Bull* 37: 84-89
120. **Sinha R, Fuse T, Aubin LR, O'Malley SS** (2000) Psychological stress, drug-related cues and cocaine craving. *Psychopharmacology* 152: 140-148
121. **Piazza PV, Maccari S, Deminiere J, Moal ML, Mormede P, Simon H** (1991) Corticosterone Levels Determine Individual Vulnerability to Amphetamine Self-Administration. *PNAS* 88: 2088-2092
122. **Piazza PV, Rougé-Pont F, Deminière JM, Kharoubi M, Le Moal M, Simon H** Dopaminergic activity is reduced in the prefrontal cortex and increased in the nucleus accumbens of rats predisposed to develop amphetamine self-administration. *Brain Res* 567: 169-174
123. **Goeders NE** (1997) A neuroendocrine role in cocaine reinforcement. *Psychoneuroendocrinology* 22: 237-259
124. **Piazza PV, Moal ML** (1996) Pathophysiological Basis of Vulnerability to Drug Abuse: Role of an Interaction Between Stress, Glucocorticoids, and Dopaminergic Neurons. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 36: 359-378
125. **Schluger JH, Borg L, Ho A, Kreek MJ** (2001) Altered HPA axis responsivity to metyrapone testing in methadone maintained former heroin addicts with ongoing cocaine addiction. *Neuropsychopharmacology* 24: 568-575
126. **Kreek MJ, Raganath J, Plevy S, Hamer D, Schneider D** (1984) ACTH, cortisol and beta-endorphin response to metyrapone testing during chronic methadone maintenance treatment in humans. *Neuropeptides* 5: 277-278
127. **Sarnyai Z, Bíró E, Gardi J, Vecsernyés M, Julesz J, Telegdy G** (1995) Brain corticotropin-releasing factor mediates 'anxiety-like' behavior induced by cocaine withdrawal in rats. *Brain Res* 675: 89-97

128. **Rassnick S, Heinrichs SC, Britton KT, Koob GF** (1993) Microinjection of a corticotropin-releasing factor antagonist into the central nucleus of the amygdala reverses anxiogenic-like effects of ethanol withdrawal. *Brain Res* 605: 25-32
129. **Skelton KH, Oren D, Gutman DA, Easterling K, Holtzman SG, Nemeroff CB, Owens MJ** (2007) The CRF1 receptor antagonist, R121919, attenuates the severity of precipitated morphine withdrawal. *Eur J Pharmacol* 571: 17-24
130. **Wang J, Fang Q, Liu Z, Lu L** (2006) Region-specific effects of brain corticotropin-releasing factor receptor type 1 blockade on footshock-stress- or drug-priming-induced reinstatement of morphine conditioned place preference in rats. *Psychopharmacology* 185: 19-28
131. **Gass JT, Olive MF** (2007) Reinstatement of Ethanol-Seeking Behavior Following Intravenous Self-Administration in Wistar Rats. *Alcohol Clin Exp Res* 31: 1441-1445
132. **Kreibich AS, Blendy JA** (2004) cAMP Response Element-Binding Protein Is Required for Stress But Not Cocaine-Induced Reinstatement. *J Neurosci* 24: 6686-6692
133. **Zislis G, Desai TV, Prado M, Shah HP, Bruijnzeel AW** (2007) Effects of the CRF receptor antagonist d-Phe CRF(12-41) and the α_2 -adrenergic receptor agonist clonidine on stress-induced reinstatement of nicotine-seeking behavior in rats. *Neuropharmacology* 53: 958-966
134. **Erb S, Salmaso N, Rodaros D, Stewart J** (2001) A role for the CRF-containing pathway from central nucleus of the amygdala to bed nucleus of the stria terminalis in the stress-induced reinstatement of cocaine seeking in rats. *Psychopharmacology* 158: 360-365
135. **Erb S, Stewart J** (1999) A Role for the Bed Nucleus of the Stria Terminalis, But Not the Amygdala, in the Effects of Corticotropin-Releasing Factor on Stress-Induced Reinstatement of Cocaine Seeking. *J Neurosci* 19: 35RC
136. **Lu L, Liu D, Ceng X** (2001) Corticotropin-releasing factor receptor type 1 mediates stress-induced relapse to cocaine-conditioned place preference in rats. *Eur J Pharmacol* 415: 203-208
137. **Shaham Y, Funk D, Erb S, Brown TJ, Walker CD, Stewart J** (1997) Corticotropin-Releasing Factor, But Not Corticosterone, Is Involved in Stress-Induced Relapse to Heroin-Seeking in Rats. *J Neurosci* 17: 2605-2614
138. **Shaham Y, Erb S, Leung S, Buczek Y, Stewart J** (1998) CP-154,526, a selective, non-peptide antagonist of the corticotropin-releasing factor1 receptor attenuates stress-induced relapse to drug seeking in cocaine- and heroin-trained rats. *Psychopharmacology* 137: 184-190
139. **Wang B, Shaham Y, Zitzman D, Azari S, Wise RA, You ZB** (2005) Cocaine Experience Establishes Control of Midbrain Glutamate and Dopamine by Corticotropin-Releasing Factor: A Role in Stress-Induced Relapse to Drug Seeking. *J Neurosci* 25: 5389-5396
140. **Wang JQ, Fibuch EE, Mao L** (2007) Regulation of mitogen-activated protein kinases by glutamate receptors. *J Neurochem* 100: 1-11

141. **Erb S, Hitchcott PK, Rajabi H, Mueller D, Shaham Y, Stewart J** (2000) α_2 adrenergic receptor agonists block stress-induced reinstatement of cocaine seeking. *Neuropsychopharmacology* 23: 138-150
142. **Shaham Y, Highfield D, Delfs J, Leung S, Stewart J** (2000) Clonidine blocks stress-induced reinstatement of heroin seeking in rats: an effect independent of locus coeruleus noradrenergic neurons. *Eur J Neurosci* 12: 292-302
143. **Highfield D, Yap J, Grimm JW, Shalev U, Shaham Y** (2001) Repeated lofexidine treatment attenuates stress-induced, but not drug cues-induced reinstatement of a heroin-cocaine mixture (speedball) seeking in rats. *Neuropsychopharmacology* 25: 320-331
144. **Leri F, Flores J, Rodaros D, Stewart J** (2002) Blockade of Stress-Induced But Not Cocaine-Induced Reinstatement by Infusion of Noradrenergic Antagonists into the Bed Nucleus of the Stria Terminalis or the Central Nucleus of the Amygdala. *J Neurosci* 22: 5713-5718
145. **Nestler EJ** (2001) Molecular basis of long-term plasticity underlying addiction. *Nat Rev Neurosci* 2: 119-128
146. **Di Chiara G, Bassareo V** (2007) Reward system and addiction: what dopamine does and doesn't do. *Curr Opin Pharmacol* 7: 69-76
147. **Kreek MJ, Nielsen DA, Butelman ER, LaForge KS** (2005) Genetic influences on impulsivity, risk taking, stress responsivity and vulnerability to drug abuse and addiction. *Nat Neurosci* 8: 1450-1457
148. **Sinha R, Garcia M, Paliwal P, Kreek MJ, Rounsaville BJ** (2006) Stress-Induced Cocaine Craving and Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Responses Are Predictive of Cocaine Relapse Outcomes. *Arch Gen Psychiatry* 63: 324-331
149. **Bobrovskaya L, Cheah TB, Bunn SJ, Dunkley PR** (1998) Tyrosine hydroxylase in bovine adrenal chromaffin cells: angiotensin-II-stimulated activity and phosphorylation of Ser¹⁹, Ser³¹, and Ser⁴⁰. *J Neurochem* 70: 2565-2573
150. **Dunkley PR, Bobrovskaya L, Graham ME, von Nagy-Felsobuki EI, Dickson PW** (2004) Tyrosine hydroxylase phosphorylation: regulation and consequences. *J Neurochem* 91: 1025-1043
151. **Haycock JW** (1993) Multiple signaling pathways in bovine chromaffin cells regulate tyrosine hydroxylase phosphorylation at Ser¹⁹, Ser³¹ and Ser⁴⁰. *Neurochem Res* 18: 15-26
152. **Herman JP, Figueiredo H, Mueller NK, Ulrich-Lai Y, Ostrander MM, Choi DC, Cullinan WE** (2003) Central mechanisms of stress integration: hierarchical circuitry controlling hypothalamo-pituitary-adrenocortical responsiveness. *Front Neuroendocrinol* 24: 151-180
153. **Atkins CM, Selcher JC, Petraitis JJ, Trzaskos JM, Sweatt JD** (1998) The MAPK cascade is required for mammalian associative learning. *Nat Neurosci* 1: 602-609
154. **Paxinos G, Watson C** (1998) The rat brain in stereotaxic coordinates. Academic Press, San Diego, Fourth edn

155. **Palkovits M** (1973) Isolated removal of hypothalamic or other brain nuclei of the rat. *Brain Res* 59: 449-450
156. **Hamlin AS, Buller KM, Day TA, Osborne PB** (2004) Effect of naloxone-precipitated morphine withdrawal on c-fos expression in rat corticotropin-releasing hormone neurons in the paraventricular hypothalamus and extended amygdala. *Neurosci Lett* 362: 39-43
157. **Le Guen S, Gestreau C, Besson JM** (2003) Morphine withdrawal precipitated by specific μ , δ or κ opioid receptor antagonists: a c-Fos protein study in the rat central nervous system. *Eur J Neurosci* 17: 2425-2437
158. **Houshyar H, Manalo S, Dallman MF** (2004) Time-Dependent Alterations in mRNA Expression of Brain Neuropeptides Regulating Energy Balance and Hypothalamo-Pituitary-Adrenal Activity after Withdrawal from Intermittent Morphine Treatment. *J Neurosci* 24: 9414-9424
159. **Herman JP, Schafer MK, Thompson RC, Watson SJ** (1992) Rapid regulation of corticotropin-releasing hormone gene transcription in vivo. *Mol Endocrinol* 6: 1061-1069
160. **Ma XM, Levi A, Lightman SL** (1997) Rapid changes of heteronuclear RNA for arginine vasopressin but not for corticotropin releasing hormone in response to acute corticosterone administration. *J Neuroendocrinol* 9: 723-728
161. **Watts AG** (1991) Ether anesthesia differentially affects the content of prepro-corticotropin-releasing hormone, prepro-neurotensin/neuromedin N and prepro-enkephalin mRNAs in the hypothalamic paraventricular nucleus of the rat. *Brain Res* 544: 353-357
162. **Makino S, Smith MA, Gold PW** (1995) Increased expression of corticotropin-releasing hormone and vasopressin messenger ribonucleic acid (mRNA) in the hypothalamic paraventricular nucleus during repeated stress: association with reduction in glucocorticoid receptor mRNA levels. *Endocrinology* 136: 3299-3309
163. **Kovács KJ, Sawchenko PE** (1996) Regulation of stress-induced transcriptional changes in the hypothalamic neurosecretory neurons. *J Mol Neurosci* 7: 125-133
164. **Helmreich DL, Itoi K, Lopez-Figueroa MO, Akil H, Watson SJ** (2001) Norepinephrine-induced CRH and AVP gene transcription within the hypothalamus: differential regulation by corticosterone. *Mol Brain Res* 88: 62-73
165. **Cole RL, Sawchenko PE** (2002) Neurotransmitter Regulation of Cellular Activation and Neuropeptide Gene Expression in the Paraventricular Nucleus of the Hypothalamus. *J Neurosci* 22: 959-969
166. **Borsook D, Falkowski O, Smirnova O** (1998) Proenkephalin Gene Regulation in the Paraventricular Nucleus by GABA: Interactions with Opioid Systems in a Transgenic Model. *J Neurochem* 70: 604-616
167. **Bali B, Kovacs KJ** (2003) GABAergic control of neuropeptide gene expression in parvocellular neurons of the hypothalamic paraventricular nucleus. *Eur J Neurosci* 18: 1518-1526

168. **Frenois F, Cador M, Caille S, Stinus L, Le Moine C** (2002) Neural correlates of the motivational and somatic components of naloxone-precipitated morphine withdrawal. *Eur J Neurosci* 16: 1377-1389
169. **Sheward WJ, Coombes JE, Bicknell RJ, Fink G, Russell A** (1990) Release of oxytocin but not corticotrophin-releasing factor-41 into rat hypophysial portal vessel blood can be made opiate dependent. *J Endocrinol* 124: 141-150
170. **Johnstone LE, Brown CH, Meeren HKM, Vuijst CL, Brooks PJ, Leng G, Russell JA** (2000) Local morphine withdrawal increases c-fos gene, Fos protein, and oxytocin gene expression in hypothalamic magnocellular neurosecretory cells. *J Neurosci* 20: 1272-1280
171. **Johnstone LE, Russell JA, Pfaff DW, Douglas AJ, Brooks PJ** (1995) Rapid stimulation of oxytocin gene expression in supraoptic nucleus neurones during morphine withdrawal in rats. *Adv Exp Med Biol* 395: 205-206
172. **Brown CH, Russell JA** (2004) Cellular Mechanisms Underlying Neuronal Excitability during Morphine Withdrawal in Physical Dependence: Lessons from the Magnocellular Oxytocin System. *Stress* 7: 97-107
173. **Brown CH, Stern JE, Jackson KLM, Bull PM, Leng G, Russell JA** (2005) Morphine withdrawal increases intrinsic excitability of oxytocin neurons in morphine-dependent rats. *Eur J Neurosci* 21: 501-512
174. **Swanson LW, Kuypers HG** (1980) The paraventricular nucleus of the hypothalamus: cytoarchitectonic subdivisions and organization of projections to the pituitary, dorsal vagal complex, and spinal cord as demonstrated by retrograde fluorescence double-labeling methods. *J Comp Neurol* 194: 555-570
175. **Iredale PA, Alvaro JD, Lee Y, Terwilliger R, Chen YL, Duman RS** (2000) Role of Corticotropin-Releasing Factor Receptor-1 in Opiate Withdrawal. *J Neurochem* 74: 199-208
176. **Funada M, Hara C, Wada K** (2001) Involvement of corticotropin-releasing factor receptor subtype 1 in morphine withdrawal regulation of the brain noradrenergic system. *Eur J Pharmacol* 430: 277-281
177. **Muller DL, Unterwald EM** (2004) In vivo regulation of extracellular signal-regulated protein kinase (ERK) and protein kinase B (Akt) phosphorylation by acute and chronic morphine. *J Pharmacol Exp Ther* 3010: 774-782
178. **Asensio VJ, Miralles A, Garcia-Sevilla JA** (2006) Stimulation of mitogen-activated protein kinase kinases (MEK1/2) by μ -, δ - and κ -opioid receptor agonists in the rat brain: Regulation by chronic morphine and opioid withdrawal. *Eur J Pharmacol* 539: 49-56
179. **Lesscher HMB, Burbach JPH, Van Ree JM, Gerrits MAFM, Aantaa R** (2003) ERK1/2 activation in rat ventral tegmental area by the μ -opioid agonist fentanyl: An in vitro study. *Neuroscience* 116: 139-144
180. **Ortiz J, Harris HW, Guitart X, Terwilliger RZ, Haycock JW, Nestler EJ** (1995) Extracellular signal-regulated protein kinases (ERKs) and ERK kinase (MEK) in brain: regional distribution and regulation by chronic morphine. *J Neurosci* 15: 1285-1297

181. **Berhow MT, Hiroi N, Nestler EJ** (1996) Regulation of ERK (Extracellular Signal Regulated Kinase), Part of the Neurotrophin Signal Transduction Cascade, in the Rat Mesolimbic Dopamine System by Chronic Exposure to Morphine or Cocaine. *J Neurosci* 16: 4707-4715
182. **Kumer SC, Vrana KE** (1996) Intricate regulation of tyrosine hydroxylase activity and gene expression. *J Neurochem* 67: 443-462
183. **Salvatore MF, Garcia-Espana A, Goldstein M, Deutch AY, Haycock JW** (2000) Stoichiometry of tyrosine hydroxylase phosphorylation in the nigrostriatal and mesolimbic systems in vivo: Effects of acute haloperidol and related compounds. *J Neurochem* 75: 225-232
184. **Haycock JW, Haycock DA** (1991) Tyrosine hydroxylase in rat brain dopaminergic nerve terminals. Multipl-site phosphorylation in vivo and in synaptosomes. *J Biol Chem* 266: 5650-5657
185. **Bobrovskaya L, Gilligan C, Bolster EK, Flaherty JJ, Dickson PW, Dunkley PR** (2007) Sustained phosphorylation of tyrosine hydroxylase at serine 40: a novel mechanism for maintenance of catecholamine synthesis. *J Neurochem* 100: 479-489
186. **Boundy VA, Gold SJ, Messer CJ, Chen J, Son JH, Joh TH, Nestler EJ** (1998) Regulation of tyrosine hydroxylase promoter activity by chronic morphine in TH9.0-lacZ transgenic mice. *J Neurosci* 18: 9989-9995
187. **Gizang E, Ziff EB** (1994) Fos family members successively occupy the tyrosine hydroxylase gene AP-1 site after nerve growth factor or epidermal growth factor stimulation and can repress transcription. *Mol Endocrinol* 8: 249-262
188. **Stachowiak MK, Rigual RJ, Lee PHK, Viveros OH, Hong JS** (1988) Regulation of tyrosine hydroxylase and phenyl-ethanolamine N-methyltransferase mRNA levels in the sympathoadrenal system by the pituitary-adrenocortical axis. *Mol Brain Res* 3: 275-286
189. **Hagerty T, Fernandez E, Lynch K, Wang SS, Morgan WW, Strong R** (2001) Interaction of a glucocorticoid-responsive element with regulatory sequences in the promoter region of the mouse tyrosine hydroxylase gene. *J Neurochem* 78: 1379-1388
190. **Pozzi L, Häkansson K, Usiello A, Borgkvist A, Lindskog M, Greengard P, Fisone G** (2003) Opposite regulation by typical and atypical anti-psychotics of ERK1/2, CREB and Elk-1 phosphorylation in mouse dorsal striatum. *J Neurochem* 86: 451-459
191. **Haycock JW, Ahn NG, Cobb MH, Krebs EG** (1992) ERK1 and ERK2, two microtubule-associated protein 2 kinases, mediate the phosphorylation of tyrosine hydroxylase at serine-31 *in situ*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 2365-2369
192. **Kyriakis JM, Avruch J** (2001) Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol Rev* 81: 807-869
193. **Cerezo M, Laorden ML, Milanes MV** (2002) Inhibition of protein kinase C but not protein kinase A attenuates morphine withdrawal excitation of rat hypothalamus-pituitary-adrenal axis. *Eur J Pharmacol* 452: 57-66

194. **Deroche-Gamonet V, Sillaber I, Aouizerate B, Izawa R, Jaber M, Ghozland S, Kellendonk C, Le Moal M, Spanagel R, Schutz G, Tronche F, Piazza PV** (2003) The Glucocorticoid Receptor as a Potential Target to Reduce Cocaine Abuse. *J Neurosci* 23: 4785-4790
195. **Shalev U, Marinelli M, Baumann M, Piazza PV, Shaham Y** (2003) The role of corticosterone in food deprivation-induced reinstatement of cocaine seeking in the rat. *Psychopharmacology* 168: 170-176
196. **Fuxe K, Cintra A, Härfstrand A, Agnati LF, Kalia M, Zoli M, Wikström AC, Okret S, Aronsson M, Gustafsson JA** (1987) Central glucocorticoid receptor immunoreactive neurons: new insights into the endocrine regulation of the brain. *Ann N Y Acad Sci* 512: 362-393
197. **Rooszendaal B, Okuda S, de Quervain DJF, McGaugh JL** (2006) Glucocorticoids interact with emotion-induced noradrenergic activation in influencing different memory functions. *Neuroscience* 138: 901-910
198. **Rusnak M, Kvetnansk R, Jelokova J, Palkovits M** (2001) Effect of novel stressors on gene expression of tyrosine hydroxylase and monoamine transporters in brainstem noradrenergic neurons of long-term repeatedly immobilized rats. *Brain Res* 899: 20-35
199. **Plotsky PM** (1987) Facilitation of immunoreactive corticotropin-releasing factor secretion into the hypophysial-portal circulation after activation of catecholaminergic pathways or central norepinephrine injection. *Endocrinology* 121: 924-930
200. **Berhow MT, Russel DS, Terwilliger RZ, Beitner-Johnson D, Self DW, Lindsay RM, Nestler EJ** (1995) Influence of neurotrophic factors on morphine- and cocaine-induced biochemical changes in the mesolimbic dopamine system. *Neuroscience* 68: 969-979
201. **Germano CMR, de Castro M, Rorato R, Laguna MT, Antunes-Rodrigues J, Elias CF, Elias LLK** (2007) Time course effects of adrenalectomy and food intake on cocaine- and amphetamine-regulated transcript expression in the hypothalamus. *Brain Res* 1166: 55-64
202. **Drazen DL, Wortman MD, Schwartz MW, Clegg DJ, van Dijk G, Woods SC, Seeley RJ** (2003) Adrenalectomy Alters the Sensitivity of the Central Nervous System Melanocortin System. *Diabetes* 52: 2928-2934
203. **Aston-Jones G, Delfs JM, Druhan J, Zhu Y** (1999) The bed nucleus of the stria terminalis. A target site for noradrenergic actions in opiate withdrawal. *Ann N Y Acad Sci* 877: 486-498
204. **Delfs JM, Zhu Y, Druhan JP, Aston-Jones G** (2000) Noradrenaline in the ventral forebrain is critical for opiate withdrawal-induced aversion. *Nature* 403: 430-434
205. **Wong DL, Tank AW** (2007) Stress-induced catecholaminergic function: Transcriptional and post-transcriptional control. *Stress* 10: 121-130
206. **Izawa R, Jaber M, Deroche-Gamonet V, Sillaber I, Kellendonk C, Le Moal M, Tronche F, Piazza PV** (2006) Gene expression regulation following behavioral sensitization to cocaine in transgenic mice lacking the glucocorticoid receptor in the brain. *Neuroscience* 137: 915-924

207. **Fürst R, Zahler S, Vollmar AM** (2008) Dexamethasone-induced expression of endothelial MKP-1 involves activation of the transcription factors AP-1 and CREB and the generation of ROS. *Endocrinology* Apr 10. [Epub ahead of print]:
208. **Cote-Vélez A, Pérez-Martínez L, Charli JL, Joseph-Bravo P** (2008) The PKC and ERK/MAPK Pathways Regulate Glucocorticoid Action on TRH Transcription. *Neurochem Res* Apr 22. [Epub ahead of print]:

IX. MEMORIA EN INGLÉS



UNIVERSITY OF MURCIA
Faculty of Medicine
Department of Pharmacology



**Cellular and molecular changes in the
stress-responsive system during
morphine dependence**

Cristina Núñez Parra
2008

Report to apply for the “European Doctorate Mention”



INTRODUCTION

Currently, the development of new pharmacological strategies aimed at avoiding relapsing in drug intake is one of the important challenges in Pharmacology. Thus, only by means of the study and characterization of the molecular and cellular pathways involved in addiction, new efficient pharmacological targets will be addressed in order to lessen its devastating effects.

1. Neurobiology of addiction

Drug addiction, also known as drug dependence, is a chronically relapsing disorder characterized by (a) compulsion to seek and take the drug, (b) loss of control in limiting intake, and (c) emergence of a negative emotional state (e.g., dysphoria, anxiety, irritability) when access to the drug is prevented [1]. Tolerance and withdrawal symptoms may be present, but they do not necessarily signal addiction. Rather, the essential elements consist of persistent and recurrent drug-seeking behaviour at the expense of pursuit of normal rewards [2].

Addiction is characterised as a series of events initiated by the acute rewarding effects of drugs followed by a transition into chronic drug use. This idea of positive reinforcement by drugs of abuse has been widely seen as a primary factor behind drug dependence [3]. Additionally, long-term drug use often results in aversive psychological and physiological effects if intake is withheld, thus resulting in continued use as a means to avoid the aversive consequences of drug withdrawal (that is, negative reinforcement) [4, 5]. The cyclical nature of chronic drug use, involving periods of drug abstinence and subsequent relapse, highlights the presence of this disease throughout the

lifetime of an individual. Many factors (genetic, environmental) contribute to the vulnerability to enter in the addiction cycle (Fig. 1) [6, 7].

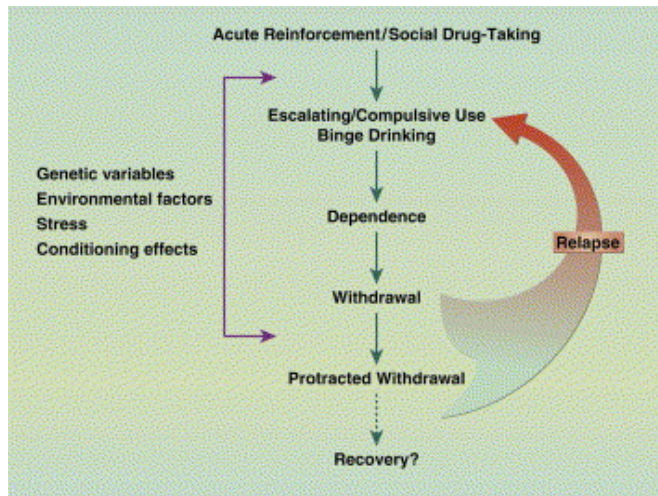


Figure 1. Stages of addiction to drug of abuse. Drug-taking begins with social drug-taking and acute reinforcement and sometimes, for some individuals, then moves in a pattern of escalating compulsive use and finally to dependence, withdrawal and protracted abstinence. Relapse is likely to occur and the cycle is repeated. Reproduced from Le Moal and Koob (2007).

An important goal of neurobiological research is to identify the neuroadaptations, or neuronal plasticity, within specific neurocircuits that mediate the transition from occasional, controlled drug use and the loss of behavioural control over drug seeking and drug taking that defines chronic addiction.

1.1. Cellular and molecular mechanisms

Drug addiction results from adaptations in specific brain neurons caused by repeated exposure to a drug of abuse. The adaptations that drug exposure elicits in individual neurons alter the functioning of those neurons, which in turn alters the functioning of the neural circuits in which those neurons operate. This leads eventually to the complex behaviours that characterize an addicted state [8].

The initial event leading to addiction involves the acute action of a drug on its target protein and on neurons that express that protein. Given that drugs are chemically different, their protein targets are different too. The action of each

drug on its target results in a series of molecular changes inside the neuron where they act, that include changes in signalling pathways as well as in transcription factors expression, that are ultimately responsible of long-term adaptive changes observed during addiction (Fig. 2).

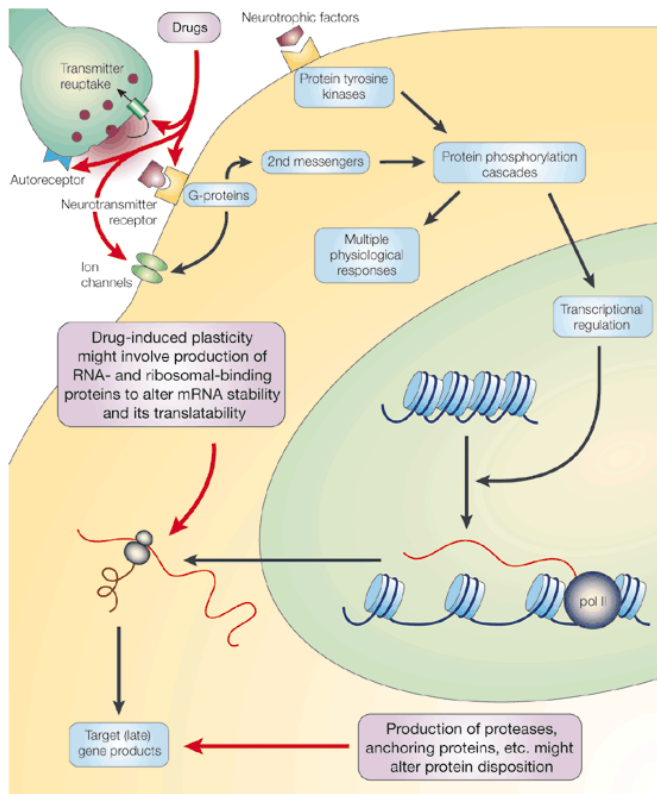


Figure 2. Drugs effects on their synaptic targets, localised in the cellular membrane, result in physiological responses by means of signalling pathways modifications. These responses include gene expression variations mediated by changes in transcription factors. Reproduced from Nestler (2001).

1.1.1. Signalling pathways

The best-established molecular adaptation to chronic drug exposure is up-regulation of the adenilate cyclase (AC)/adenosine 3', 5' -monophosphate (cAMP)/protein kinase A (PKA) pathway in different nuclei of the Central Nervous System (CNS). Acute opiate exposure inhibits the cAMP pathway whereas chronic opiate exposure leads to a compensatory up-regulation of the AC/cAMP/PKA pathway, which would represent a form of physiological tolerance to chronic drug intake (Fig. 3). Chronic opioids exposure also induces modifications in other signalling pathways involved in a great variety of

regulating processes that include proteins phosphorylation and gene expression regulation [8-11].

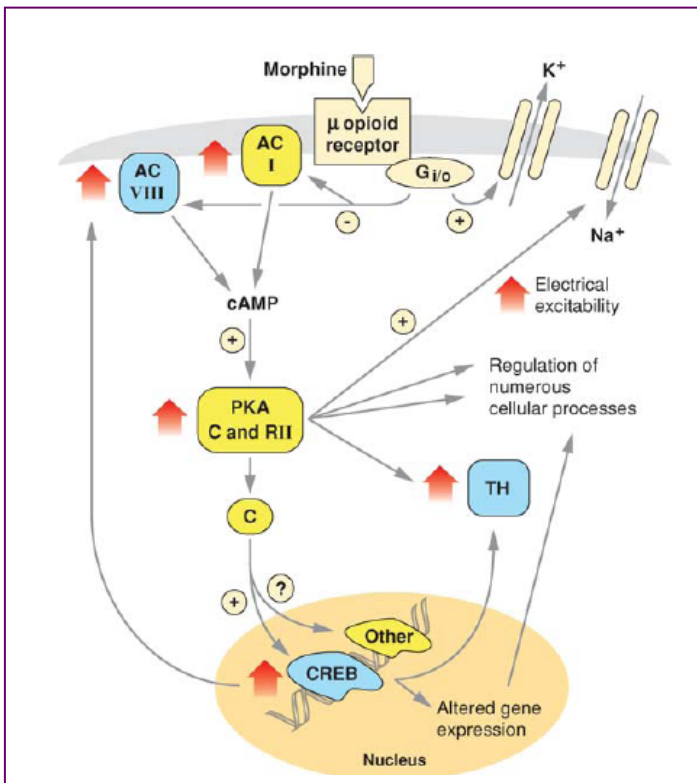


Figure 3. Simplified scheme illustrating the acute opioids actions on different areas of CNS (AC inhibition and, therefore, catalytic subunits of PKA will not act on transcription factor CREB, among others). Upward bold arrows summarize effects of chronic morphine administration. Reproduced from Hyman et al (2006).

Recent results show that during morphine withdrawal there is an increase in PKA activity in different brain areas of the CNS [12, 13]. In addition, in the same brain regions it has been characterized that different protein kinase C (PKC) isoforms are involved in the adaptive changes observed during chronic morphine treatment and withdrawal [9, 14, 15].

Extracellular signal-regulated protein kinases (ERK), members of the mitogens-activated protein kinases, translate a big variety of extracellular stimuli into different intracellular responses, and are involved in several processes in the CNS, including drug addiction [16, 17]. Additionally, it has been shown that, following chronic morphine administration, the catalytic activity of ERK_{1/2}, which is related to their phosphorylation state, is regulated in a different way in several brain regions. In parallel, several studies have

established that ERKs regulation in the different brain areas is a key point in tolerance and dependence processes after several drugs administration [18, 19].

1.1.2. Transcription factors and gene expression

Repeated exposure to a drug of abuse could alter gene expression in the brain by many mechanisms. These include altered rates of transcription of genes, altered processing of primary RNA transcripts into mature mRNAs, altered translation of these mRNAs into proteins, altered processing of proteins, and altered trafficking of mature proteins to their intracellular sites of action [11].

CREB and related proteins were described originally as transcription factors that mediate the effects of the cAMP second messenger pathway on gene expression. This occurs via phosphorylation of CREB on a single Serine residue (Ser) 133 by PKA. Once phosphorylated, CREB dimers bound to specific CRE (cAMP response element) sites on target genes and can interact with the basal transcriptional complex to regulate gene transcription. More recently, several other protein kinases, including Ca²⁺ activated and growth factor activated kinases, have also been shown to phosphorylate Ser133 of CREB and to thereby regulate the transcription of target genes through CREB [20-22].

Many genes have CRE sites in their promoters, including neuropeptides (CRF: corticotropine releasing factor, prodynorphine, proenkephaline), neurotransmitter synthesizing enzymes (TH: tyrosine hydroxylase, the rate-limiting enzyme in catecholamine biosynthesis), neurotransmitter receptors, signalling proteins, and other transcription factors (CREB, c-Fos, Jun D) [22, 23].

First evidences that CREB is involved in different stages of addiction come from studies in the locus coeruleus (LC), the main noradrenergic nucleus

in the brain, which regulates the attention states. This region is considered an important area in opioids dependence and withdrawal [8, 10]. It has been shown that CREB has a pivotal role in the adaptive processes that are triggered after chronic drug exposure, since CREB activation via AMPc/PKA in the nucleus accumbens (NAc, principal receptor nucleus for the dopaminergic afferences in the reward system) during chronic drug intake decreases the rewarding effects of cocaine, opiates, and sucrose, a natural reward [24-26]. It has been suggested that this effect is owed to the fact that CREB promotes dynorphine gene expression in the NAc, and this neuropeptide acts on opioid receptor κ in ventral tegmental area (VTA) dopaminergic neurons inhibiting dopamine (DA) release (Fig. 4) [2, 27, 28]. In addition, it has been shown that knock-out (KO) mice for CREB in several tissues exhibit lower morphine dependence and withdrawal [29].

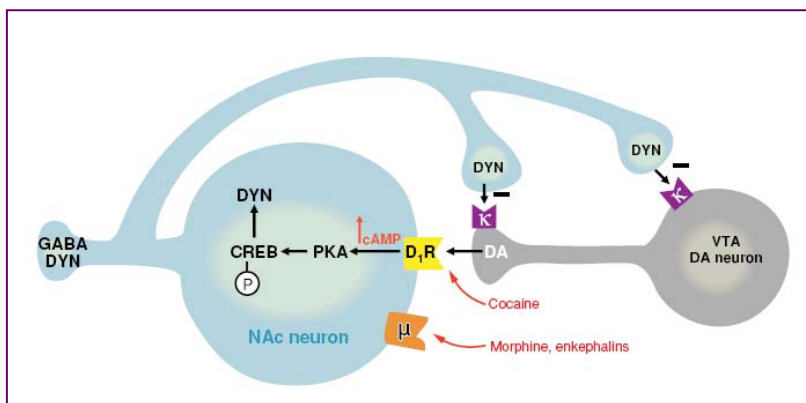


Figure 4. Schematic diagram showing CREB-induced dynorphine gene expression and the subsequent opioid receptor κ stimulation in the VTA. Reproduced from Hyman et al (2007).

Immediate early genes (IEG) are a class of genes whose expression is induced within minutes of exposure to a stimulus. Of particular interest in the study of addiction are the Fos and Jun families of IEG, which encode transcription factors. The Fos family of transcription factors includes c-Fos, FosB, Fra-1 and -2, and Δ FosB (a truncated splice variant of full-length FosB, that lacks a portion of the C-terminal transactivation domain present in other Fos proteins; [30]). Fos family members heterodimerize with Jun family transcription factors (c-Jun, JunB, JunD) to form the activator protein-1 (AP-1)

complex. The AP-1 complex binds to specific DNA sequences in the promoters of various target genes. AP-1 complexes can act as either a transcriptional inducer or repressor, depending on the specific AP-1 binding site and promoter in question (Fig. 5) [22].

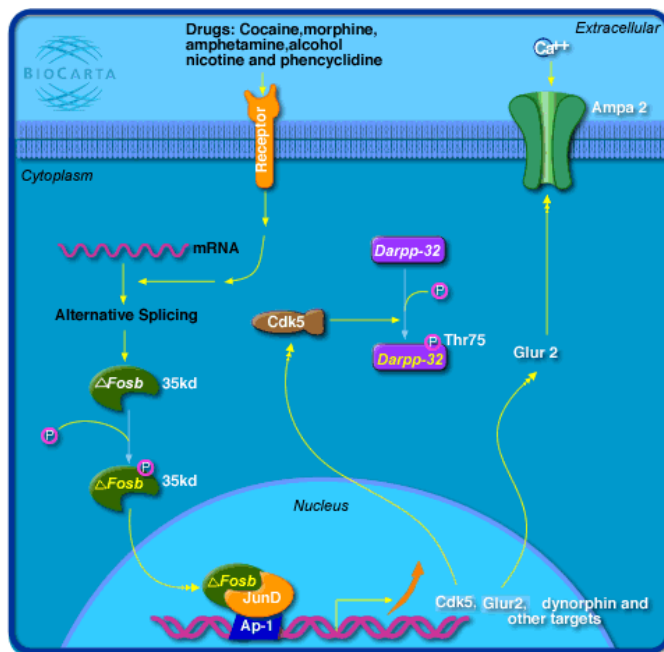


Figure 5. Schematic diagram of drug-induced phosphorylation and dimerization of Δ Fos B, which results in modified gene expression and, therefore, neuronal activity. Reproduced from Biocarta (consulted on 14/05/2008).

Acute exposure to drugs of abuse rapidly induces all Fos family members. With continued drug exposure, levels of these proteins decline rapidly toward basal levels within 8–12 h. However, biochemically modified isoforms of Δ FosB exhibit a very different expression pattern. Acutely, Δ FosB expression is only modestly induced, but it persists long after the other Fos family members have returned to basal levels. As a result, Δ FosB levels gradually accumulate with repeated drug exposure in the NAc and other CNS areas [31–34]. In addition, because of its stability, Δ FosB levels persist for week or months after the drug is withdrawn (Fig. 6), suggesting that its dynamics allows it to play a longer-term role in subsequent regulation of gene expression [22].

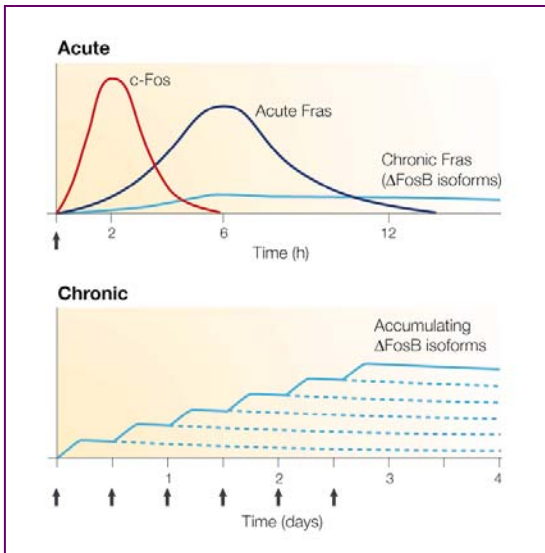


Figure 6. Gradual accumulation of Δ FosB versus the rapid and transient induction of acute Fos family proteins in brain alters acute drug exposure (top graph). Stable isoforms (35 – 37 kDa) of Δ FosB are also induced at low levels following a single acute stimulus but persist in brain for long periods due to their stability (bottom graph). Reproduced from McClung et al (2004).

Nowadays, numerous genes with AP-1 sites in their promoters have been identified. Genes that encode endogenous opioid system neuropeptides have been the most studied, such as proenkephaline and prodynorphine [35, 36]. Other proteins whose expression is regulated by Fos/AP-1 are some neurotransmitter synthesizing enzymes, such as TH [37]. CRF gene has been suggested as a potential target of AP-1, although the union of Fos/Jun dimer on this sequence has not characterized yet. It has been hypothesized that the activation of CRF gene expression would be via CREB, which expression is at the same time induced by c-Fos, because it has the AP-1 sequence in its promoter [36].

Therefore, drugs of abuse promote long-term changes within the neural circuits that mediate in addiction. These changes are caused by intracellular signalling pathways modifications that lead to an increase of transcription factors activity on their target genes (Fig. 7) [38].

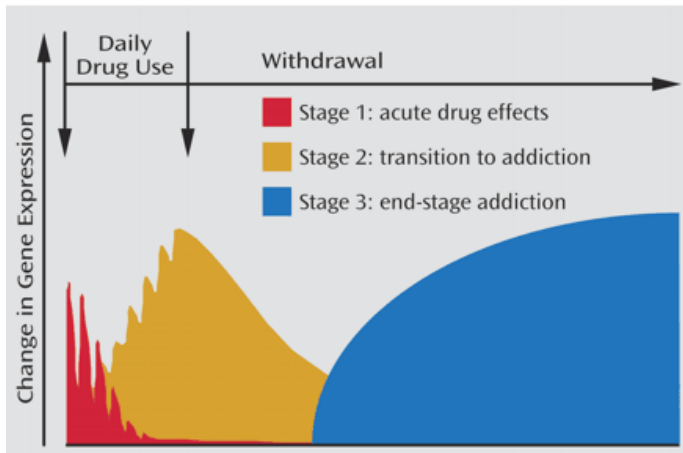


Figure 7. Stages of Addiction. The adaptive changes in each phase of the addiction cycle include changes in gene expression. Reproduced from Kalivas and Volkow (2005).

2. Neural circuits involved in addiction

Addiction involves long-term plasticity in the activity of neural circuits that regulate two opposite emotional states: the underactivation of natural motivational systems, such that the reward system, becomes compromised and that an antireward system, also called brain stress system, becomes recruited to provide the powerful motivation for drug seeking associated with compulsive use [1].

A key element of drug abuse is a neuroadaptation within the brain reward system during the development of addiction, and one must understand the neurobiological bases for acute drug reward to understand how the reward systems change with the development of addiction. A principal focus of research on the neurobiology of the positive reinforcing effects of drugs with dependence potential has been on the activation of the circuitry related to the origins and terminals of the mesocorticolimbic system (Fig. 8). Additionally, an important role for opioid peptides in drug reward, independent of a direct action on DA neurons, has been proposed. Together, these results suggest that multiple parallel pathways mediate drug reward [39].

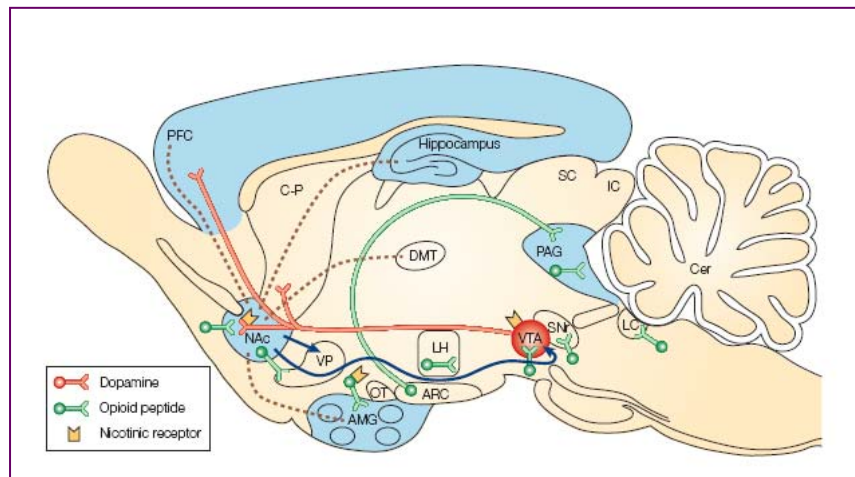


Figure 8. Neural circuits involved in addiction. NAc: nucleus accumbens; VTA: ventral tegmental area. AMG: amygdala; PFC: prefrontal cortex. Reproduced from Nestler (2001).

Specific components of the basal forebrain associated with the amygdala (AMG) also have been identified with drug reward, particularly alcohol [40]. One hypothetical construct, the extended amygdala, includes not only the central nucleus of the amygdala (CeA), but also the bed nucleus of the stria terminalis (BNST) and a transition zone in the medial subregion of the NAc (shell of the NAc) [39].

The neural substrates and neuropharmacological mechanisms for the negative motivational effects of drug withdrawal may involve disruption of the same neural systems implicated in the positive reinforcing effects of drugs. Measures of brain reward function during acute abstinence of all major drugs with dependence potential have revealed increase in brain reward thresholds [41].

Different neurochemical systems involved in stress modulation also may be engaged within the neurocircuitry of the brain stress systems in an attempt to overcome the chronic presence of the perturbing drug and to restore normal function despite the presence of drug. Both the hypothalamic-pituitary-adrenal

(HPA) axis and the brain stress system are dysregulated by chronic administration of drugs with dependence potential, with a common response of elevated adrenocorticotrope hormone (ACTH), glucocorticoids (GC) and CRF during acute withdrawal [41, 42]. Indeed, acute drug withdrawal also may increase the activity of noradrenergic pathways innervating CeA and the hypothalamic paraventricular nucleus (PVN, main source of hypothalamic CRF) [43, 44], and decrease levels of neuropeptide Y (NPY) in the central and medial nuclei of the AMG [45]. All these processes are involved, at least in part, in the negative motivational states during drug withdrawal. Therefore, CRF would have a key role in the increase of drug intake related to dependence.

2.1. Mesocorticolimbic system

During the last decades, the major part of studies about addiction has been focused on the mesocorticolimbic system, which includes the VTA dopaminergic neurons projecting to NAc, the major component of the ventral striatum, to the PFC and to the AMG. In addition to the NAc, the AMG and PFC play critical roles in the valuation of rewards and the establishment of reward-associated memories [46, 47]. As the neural circuits for the reinforcing effects of drugs with dependence potential have evolved, the role of neurotransmitters/neuromodulators also has evolved, and those that have been identified to have a role in the acute reinforcing effects of drugs of abuse in these basal forebrain areas: mesolimbic DA, opioid peptides, γ -aminobutyric acid (GABA), glutamate, endocannabinoids, and serotonin (Table 1) [39].

Table 1. Neurobiological substrates mediating in the positive reinforcing effects of drugs.

Drug of abuse	Neurotransmitter	Site
Cocaine and amphetamines	Dopamine	Nucleus accumbens
	γ -aminobutyric acid	Amygdala
Opiates	Opioid peptides	Nucleus accumbens
	Dopamine	Ventral tegmental area
	Endocannabinoids	
Nicotine	Nicotinic acetylcholine	Nucleus accumbens
	Dopamine	Ventral tegmental area
	γ -aminobutyric acid	Amygdala
	Opioid peptides	
Δ^9 -Tetrahydrocannabinol	Endocannabinoids	Nucleus accumbens
	Opioid peptides	Ventral tegmental area
	Dopamine	
Alcohol	Dopamine	Nucleus accumbens
	Opioid peptides	Ventral tegmental area
	γ -aminobutyric acid	Amygdala
	Endocannabinoids	

Reproduced from Koob and Le Moal (2008).

There is now considerable evidence that all major drugs converge in a common circuitry in this system. Each drug administered acutely, regardless its distinct mechanism of action, activate dopaminergic transmission from VTA to NAc and PFC (Fig. 9). Psychoestimulants, such as cocaine or methamphetamine, increase the VTA DA neuronal activity by blocking DA reuptake, thereby increasing DA release and activating feedback mechanisms. Opioids and ethanol inhibit GABAergic interneurons in the VTA, which disinhibits VTA dopaminergic neurons, whereas nicotine exerts direct actions on DA neurons by acting on nicotinic acetylcholine receptors increasing in that way this neurotransmitter release. Despite their high-abuse liability, the mechanism of action of cannabinoids is still poorly understood. It has been suggested that they stimulate CB1 receptors in the VTA inhibiting presynaptic GABA release and increasing in that way DA release [48]. In addition, several drugs seem to activate the brain's endogenous opioid and cannabinoid systems within the VTA-NAc pathway, as exemplified by reduced drug effects in cannabinoid and opioid receptor KO mice, which further underscores shared acute mechanism of drug action [49].

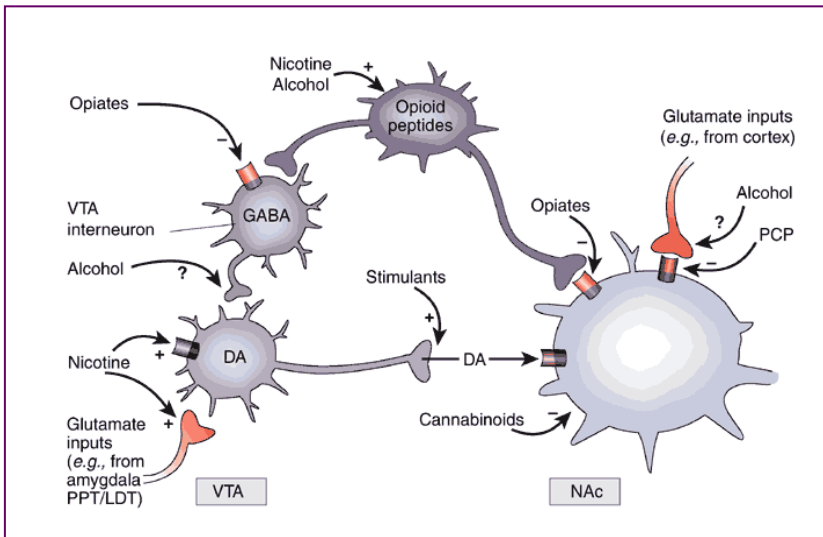


Figure 9. Highly simplified scheme of converging acute actions of drugs of abuse on the VTA-NAc. Drugs of abuse, despite diverse initial actions, produce an increase in DA release in the NAc. Reproduced from Nestler (2005).

Opioids act on a variety of opioids receptors subtypes, μ , δ y κ . However, it is predominantly their action with μ receptors, which are widely distributed across a variety of brain regions, including the cortex, striatum, thalamus, hippocampus, LC, in addition to the VTA, NAc and AMG via direct actions on interneurons, that appear to mediate their behavioural and reinforcing properties [50].

DA released by VTA neurons acts on NAc, PFC and AMG D_1 receptors coupled to G_s proteins, activating AMPc/PKA/CREB pathway and, therefore, the expression of important genes involved in addiction, such as c-Fos or prodynorphine. The role of presynaptic D_2 receptors has been widely studied by agonist and antagonist administration and has been resulted in very complex data. Image studies by positron emission tomography (PET) and single photon emission computed tomography of addictive users of ethanol, cocaine, methamphetamine, and heroine have revealed reductions of D_2 receptor density in the ventral striatum that persist long after detoxification [28]. More recently, an important role for presynaptic D_3 receptors in drug dependence has been hypothesized. Selective antagonist administration has revealed that D_3 receptors may play an important role in drug-induced reward, drug-taking, and cue-, drug-, and stress-induced reinstatement of drug-seeking behaviour [51].

Chronic exposure to drugs of abuse causes numerous common adaptations in the VTA-NAc-PFC. For example, there is a dysregulation of the brain reward system, which can be considered as a homeostatic response to the continuous activation of this neural circuit (Fig. 10). The adaptive changes in PFC alter its activity, leading to reductions in behavioural control and decision-making skills, and overlaps between limbic and cortical areas involved in addiction and memory that results in maladaptive associative learning [50].

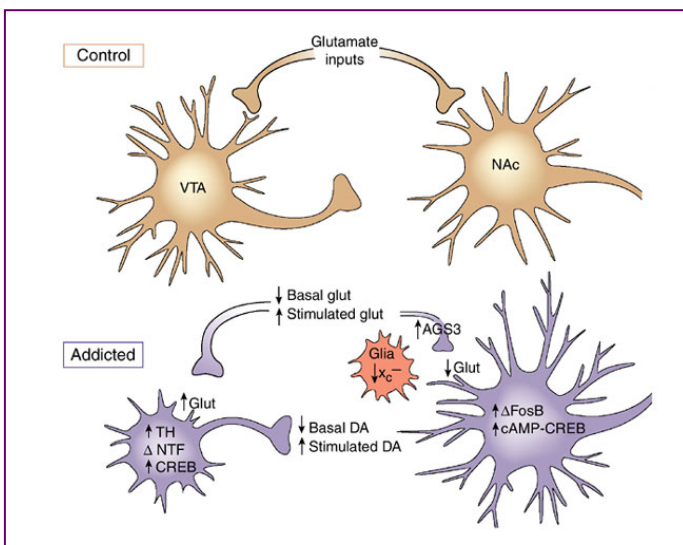


Figure 10. Diagram of common adaptive changes in the mesocorticolimbic system after chronic drug exposure. Reproduced from Nestler (2005).

Chronic administration of any of several drugs of abuse, including cocaine, amphetamine, opioids, alcohol and nicotine increases levels of TH in the VTA. Concomitantly, decreased TH levels or activity in the VTA nerve terminals in the NAc are reported under certain experimental conditions. This latter adaptation could mediate the reduction in dopaminergic signalling seen after chronic drug exposure [49]. In addition, chronic drug exposure seems to sensitize the DA system, with greater increases in dopaminergic transmission occurring in response to the drug in question and to drug-associated cues [49, 52, 53]. Moreover, during acute withdrawal, there is decreased activity of the mesocorticolimbic DA system as well as decreased activity in opioid peptide, GABA, and glutamate in the NAc or AMG [39].

Human imaging studies of addicts during withdrawal or protracted abstinence give results that show decreases in DA D₂ receptors (hypothesized to reflect hypodopaminergic functioning) and hypoactivity of the orbitofrontal-infralimbic cortex system [54]. Decreases in reward neurotransmitter function have been hypothesized to contribute significantly to the negative motivational state associated with acute drug abstinence and may trigger long-term biochemical changes that contribute to the clinical syndrome of protracted abstinence and vulnerability to relapse (Table 2) [39].

Table 2. Neurotransmitters involved in aversive motivational states during withdrawal of drug of abuse.

Neurotransmitter	Functional effect
↓ Dopamine	“Dysphoria”
↓ Serotonin	“Dysphoria”
↓ γ -Aminobutyric acid	Anxiety, panic attacks
↓ Neuropeptide Y	Antistress
↑ Dynorphin	“Dysphoria”
↑ Corticotropin-releasing factor	Stress
↑ Norepinephrine	Stress

Reproduced from Koob and Le Moal (2008).

Acute exposure to drugs of abuse promotes an increase of activity in the reward circuit as well as the brain stress system. During chronic drug intake and in the state known as addiction, the brain reward system is in a major underactivated state while the brain stress system is highly activated. Protracted abstinence is characterized by a return toward a normal state but with residual activation of the brain stress systems and residual underactivation of the brain reward system (Fig. 11) [5].

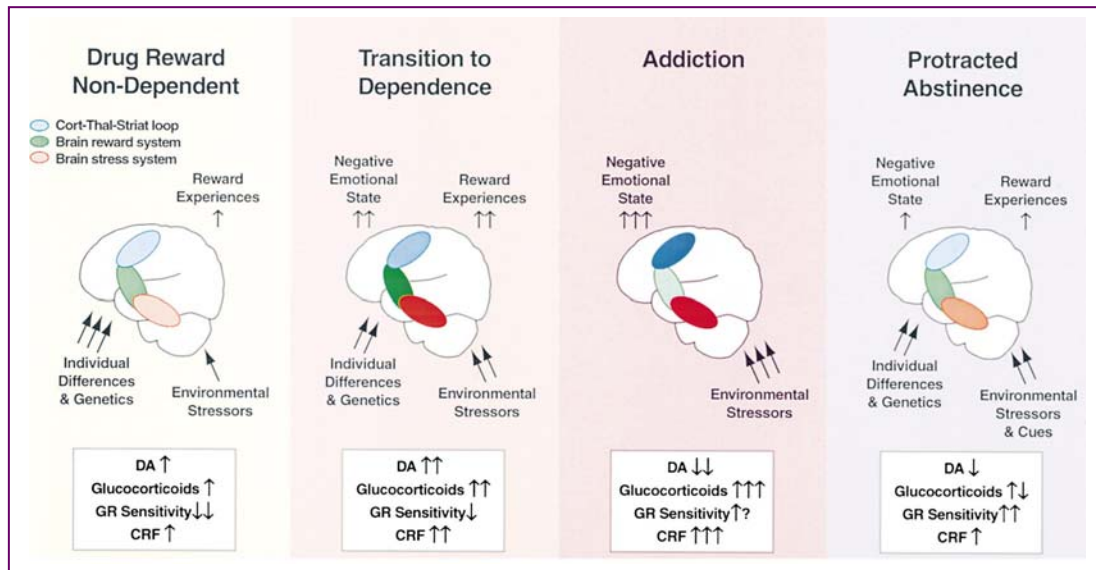


Figure 11. Scheme showing transition from initial drug intake to addiction and to protracted abstinence. Reproduced from Koob and Le Moal (2001).

2.2. Brain stress system

In contrast to initial increases in neurotransmitter activity following acute drug exposure, recent research indicates that chronic administration leads to changes that are more complex in the activity of the NAc, especially during prolonged withdrawal. Similarly, all drugs of abuse have been shown to produce dysregulations in brain stress systems [42, 55, 56]. These persistent alterations in stress hormone systems, receptor and/or neurotransmitter activity may represent compensatory mechanisms involving neuroadaptations aimed at restoring homeostatic function in response to the presence to the drug. As such, these changes could contribute significantly to negative emotional states characteristics of acute drug withdrawal, as well as enhanced sensitivity to stressful stimuli, both of which could result in greater vulnerability to relapse during abstinence in humans [50, 57, 58].

CRF is released from two brain regions to participate in two separate (but connected) stress systems. In the HPA axis stress system (Fig. 12), CRF neurons in the parvocellular region of the hypothalamic PVN regulate the release of

pituitary ACTH and adrenal glucocorticoids (GC). In the extrahypothalamic stress system, CRF neurons in the CeA and the BNST project to the LC and increase the firing rate of LC neurons, resulting in increased noradrenaline (NA) in the terminal fields of this ascending noradrenergic system, which leads to an increase in CeA and BNST activity. The activation of the CRF neurons of the PVN is associated with increased activity, mainly in the nucleus tractus solitarius (NTS) [28].

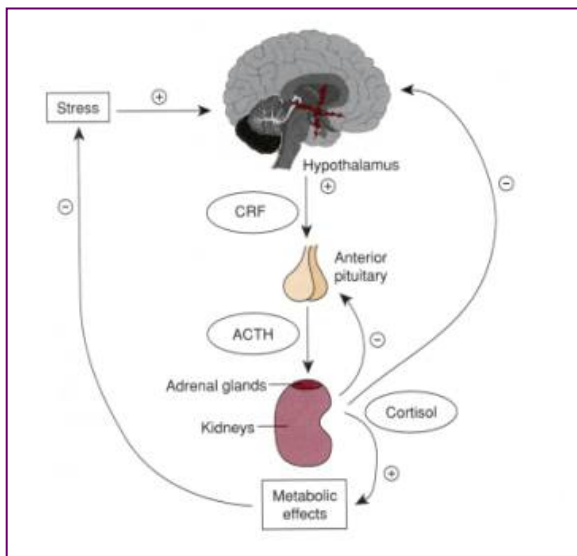


Figure 12. HPA axis. Cells in hypothalamus produce CRF in response to most any type of stress physical or psychological. The hypothalamus secretes CRF, which in turn binds to specific receptors on pituitary cells, which produce ACTH. ACTH is then transported to its target in the adrenal gland stimulating the production of GC. The release of GC initiates a series of metabolic effects aimed at alleviating the harmful effects of stress through negative feedback to both the hypothalamus and the anterior pituitary, which decreases the concentration of ACTH and GC. Reproduced from <http://www.montana.edu/> (15/05/2008).

Either stress system can contribute to both a pre-existing vulnerability to use drugs addictively and later vulnerability to relapse. The HPA stress system seems to have more important role in the initiation of drug seeking and in the maintenance of drug taking behaviour, while the extrahypothalamic stress system seems to have more important role in the motivational effects of both protracted abstinence and stress-induced reinstatement [28].

2.2.1. Hypothalamic CRF System

The hypothalamic PVN, which is the apex of the HPA axis, is divided in two regions, the magnocellular region, whose more important neuropeptides are arginine-vasopressin (AVP) and oxytocin (OT), and the parvocellular region, which is the main localization of hypothalamic CRF neurons. Indeed,

this region also synthesizes and releases AVP. This neuropeptide potentiates CRF action on pituitary ACTH release. Thus, AVP is also involved in HPA axis responses to stressful stimuli [59-62].

The parvocellular part of the PVN can be divided in other subregions (Fig. 13). The medial parvocellular zone (mdp) send CRF projections to the median eminence to induce ACTH and GC release, whereas other neuronal groups in dorsal parvocellular (dp) and medial ventral parvocellular (mpv) subdivisions send descending projections to other hypothalamic areas, to brainstem nuclei and to the spinal cord, influencing autonomic nervous system responses [63].

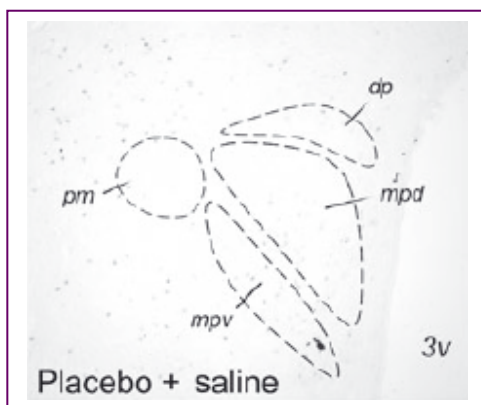


Figure 13. PVN subdivisions: dp, dorsal parvocellular; mpd, dorsal aspect of medial parvocellular; mpv, ventral aspect of medial parvocellular; pm, posterior magnocellular subdivision; 3V, third ventricle.

The HPA axis is involved in different stages of addiction cycle. Acute cortisol administration has been found to precipitate cocaine craving in human addicts [64], as has stress [65]. Stress has also been demonstrated to increase drug self-administration in animal models [66]. The stress-charged drive to self-administer drugs of abuse has been linked to increased activation of the mesocorticolimbic dopaminergic system, which is mediated by GC release [66-69].

Morphine dependence induces very complex cellular and molecular adaptive changes within the HPA axis. Previous data from our laboratory have

demonstrated an increase in HPA axis activity after acute morphine administration, as well as after naloxone-induced morphine withdrawal, as shown by an enhancement in corticosterone plasma levels [44, 70]. In addition, adaptive changes have been reported in a variety of signalling pathways and gene expression after acute and chronic morphine exposure, and during morphine withdrawal. There is an increase in c-Fos expression after acute morphine administration [71], while during chronic morphine exposure c-Fos expression turn back to basal levels, and augment again during naloxone-induced morphine withdrawal [72-74]. In addition, it has been characterized several signalling pathways involved in the increase in c-Fos expression during morphine withdrawal. Chronic administration of a protein kinase C inhibitor (calphostin C) blocks the enhancement in c-Fos expression in PVN after naloxone administration to morphine dependent rats. Similar results were observed following chronic administration of a PKA inhibitor (HA-1004) as well as an L-type calcium channels antagonist (nimodipine) [13, 15, 72, 75].

Contradictory data have been described concerning the effect of chronic morphine administration and naloxone-induced morphine withdrawal on hypothalamic CRF and AVP. In contrast to our previous data indicating no changes in AVP mRNA content and a decrease in CRF mRNA levels in the PVN during chronic morphine treatment [76], other studies have shown no significant changes in CRF mRNA levels in the PVN [77, 78], while increased CRF mRNA signals were detected by others [79, 80]. During morphine withdrawal a bigger drop in CRF mRNA levels in PVN was reported by our laboratory, whereas others have not found any changes in CRF mRNA content [78].

2.2.2. Extrahypothalamic CRF system

As stated above, the extended amygdala is composed of the CeA, the BNST and a transition zone in the medial subregion of the NAc (shell of the NAc). The extended amygdala receives numerous afferents from limbic structures such as the basolateral amygdala (BLA) and hippocampus and sends efferents to the medial part of the ventral pallidum and to the lateral hypothalamus, thus further defining the specific brain areas that interface classical limbic (emotional) structures with the extrapyramidal motor system. Regions of the extended amygdala (including the CeA) contain high amounts CRF terminals, cell bodies, and receptors and comprise part of the extrahypothalamic CRF-stress system (Fig. 14) [39, 81].

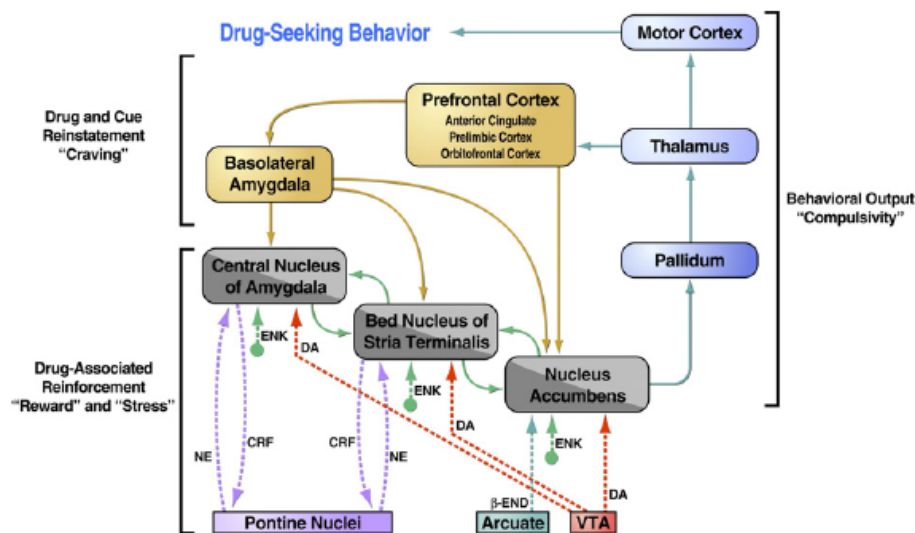


Figure 14. The three major neurocircuits that underlie addiction. A drug-reinforcement circuit is comprised of the extended amygdala including the CeA, the BNST, and the transition zone in the shell of the NAc. Reproduced from Le Moal and Koob (2007).

Numerous studies have demonstrated the involvement of the extended amygdala CRF system in mediating the behavioral responses associated with fear and anxiety [82]. Extended amygdala nuclei and its neurotransmitter systems have been related with the positive reinforcing effects of drugs, as well as negative reinforcing effects of drugs withdrawal. Administration of D₁

antagonists at the NAc, the CeA and the BNST levels is particularly effective blocking cocaine self-administration [83, 84]. In addition, acute drugs administration promotes an increase in dopaminergic transmission in the shell of NAc [85, 86].

During ethanol withdrawal, extrahypothalamic CRF systems become hyperactive, with an increase in extracellular CRF within the CeA and BNST of dependent rats [43, 87-89], and this dysregulation of brain CRF systems is hypothesized to underlie both the enhanced anxiety-like behaviours and the enhanced ethanol self-administration associated with ethanol withdrawal. These data suggest an important role of CRF, primarily within the CeA, in mediating the increased self-administration associated with dependence. Similar results have been observed with the increased intravenous self-administration associated with extended access to heroin [39], cocaine [90], and nicotine [39, 91].

NPY has been suggested to be involved in neuroadaptations observed during addiction. The role of NPY in dependence perhaps may be best viewed as an inhibitor of neuronal excitability [92], and it is important to note that NPY and CRF have been hypothesized to have reciprocal actions in mediating behavioural responses to stressors [93]. Thus, one may speculate that during acute withdrawal, and perhaps extended to protracted abstinence, decreases in NPY activity may accompany increases in CRF activity further potentiating the neurochemical brain stress system contribution to allostasis in the reward system [5].

2.3. Noradrenergic pathways

Evidence for the involvement of NE in motivation-reward has emerged from studies of self-administration, conditioned-place preference (CPP), reinstatement, and locomotor activation. The LC noradrenergic system regulates

the activity of the ascending DA pathways [94]. They meet in the VTA, where noradrenergic neurons modulate the DA cell firing pattern via excitatory postsynaptic α_1 -adrenoceptors [95]. The LC noradrenergic system also regulates the mesencephalic dopaminergic system indirectly, via the PFC. DA release in the PFC is regulated by local noradrenergic nerve terminals, and electrical stimulation of the LC neurons increases both extracellular DA and NE in the PFC [96]. When NE release is blocked, DA release is similarly attenuated. If the NE block is chronic, the DA system gradually compensates by upregulating high-affinity state of postsynaptic DA receptors (i.e., increasing their density) [97]. This process results in hypersensitivity to psychostimulants and to any other substance (or behaviour), that increases intrasynaptic DA levels [28].

Ethanol self-administration was found to be attenuated by an agonist at the α_2 autoreceptor that reduces NE transmission, and to be enhanced by blockade of this receptor [98]. While wildtype mice readily self-administer cocaine or morphine orally, α_1 KO mice were found not to do so [99]. Establishment of CPP for opiates seems to require intact noradrenergic function. Morphine CPP in mice was shown to be attenuated by either clonidine (an α_2 -agonist) or prazosin (an α_1 antagonist) and to be increased by yohimbine (an α_2 antagonist). All these data show that positive reinforcing effects of drugs of abuse are dependent on noradrenergic function [28].

Several studies support the LC involvement in opioids tolerance and dependence. One of the earliest studies showed that the electrical stimulation of the LC produces several behavioural and physiological signs that are similar to the opioids abstinence syndrome in opiate naïve monkeys. In addition, abstinence to opioids was also demonstrated by an enhancement in the turnover of NA and TH activity into the LC, and by an enhancement in the levels of 3-

methoxy-4-hydroxy-phenetiliglycol (MHPG), the principal NA metabolite in brain, in terminal regions such as cerebral cortex and hippocampus [100].

Numerous studies have supported the importance of the brainstem noradrenergic afferents to the brain stress system, the pivotal role of NA as a neurotransmitter modulating this system as well as the NA-CRF interactions (Fig. 15) [28, 55, 70, 101, 102].

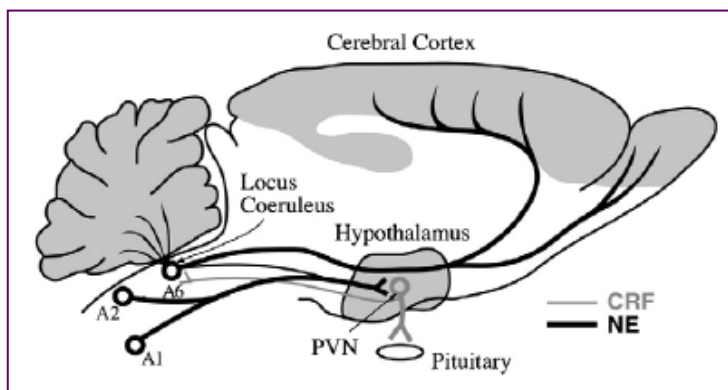


Figure 15. Simplified diagram indicating the two major ascending noradrenergic projection systems, the dorsal LC system, and the ventral A1/A2 (VLM/NTS) system and their interactions with PVN CRF-containing neurons. Reproduced from Dunn and Swiergiel (2008).

The LC (cellular group A₆) is a major source of projections to the BNST and the CeA. Most of the evidence for CRF-NA interactions to date have been focused on the LC. Stress induces NA release in the BNST [103] as well as in the CeA [104], and also stimulates the release of CRF in the CeA [105]. The hypothalamic PVN is densely innervated by noradrenergic afferents, the cell bodies of which originate primarily in the A₂ (NTS) and A₆ (LC) cell groups. The A₂ inputs are most heavily distributed in the parvocellular part of the PVN, while the A₆ cells project primarily to the periventricular zone [106, 107]. At the ultrastructural level, several studies have confirmed the noradrenergic innervation of CRF neurons of the PVN. Also it has been demonstrated the presence of α_1 and α_2 adrenoceptors on the CRF neurons in the PVN [108, 109]. Nowadays it is well known that NA release stimulates CRF neuron to activate the HPA axis [102, 110, 111]. There are also evidences supporting that the CRF neurons in the PVN innervate noradrenergic brainstem nuclei [112]. All these

data support the existence of a NA-CRF loop in which NA would stimulate the release of CRF in the CeA, the BNST and the PVN, and this CRF from these nuclei would induce the release of NA by the brainstem noradrenergic areas (Fig. 16) [55].

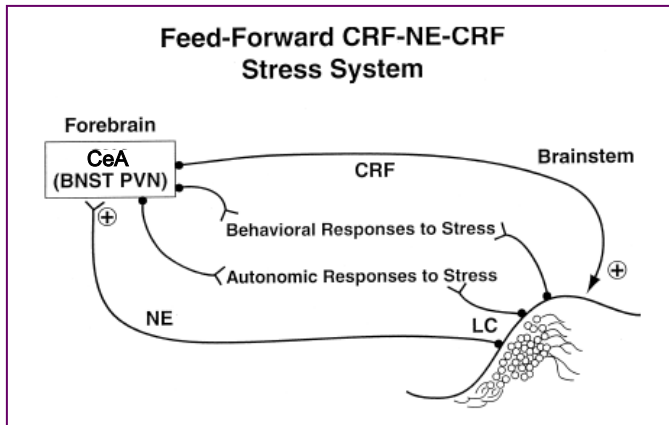


Figure 16. Diagram describing a feed-forward system whereby CRF could activate brainstem noradrenergic activity, which in turn activate forebrain CRF activity, effectively closing the loop. Reproduced from Koob (1999).

It has been reported a hyperactivity of the NTS after opioids exposure, which in turn activates the HPA axis via stimulation of the CRF neurons in the parvocellular part of the PVN. After acute administration of morphine there is an increase in NA turnover [44, 111], as well as during naloxone-induced morphine withdrawal [70]. Concomitantly, it has been described an increase in c-Fos expression in the noradrenergic neurons of the NTS after acute morphine administration and during morphine withdrawal, which signals a hyperactivity of this nucleus [73, 74]. In addition, TH activity augments in the PVN after naloxone administration to morphine dependent rats [75].

NA has been hypothesized to act on α -adrenoceptors in the CRF neurons of the PVN. However, a role for β -adrenoceptors has not ruled out. Previous data from our laboratory have shown that α_1 , α_2 and β antagonists administration blocks the increase in corticosterone release after acute morphine administration [44] and during morphine withdrawal [111]. In addition, chronic administration of these antagonists also inhibits c-Fos expression during morphine withdrawal in the parvocellular part of the PVN [74]. These results

suggest that noradrenergic projections from the NTS to the PVN are involved in morphine dependence. A summary of the neural circuits involved in the reinforcing effects of drugs of abuse is shown in Fig. 17.

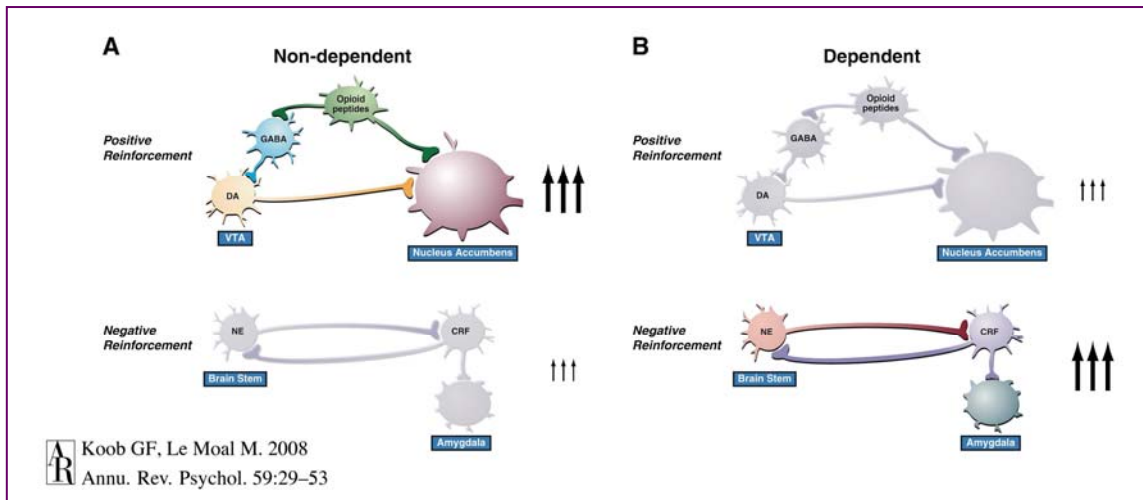


Figure 17. A: Neural circuits involved in the positive rewarding properties of drugs of abuse after their acute administration. During drugs dependence, there is a recruitment in the negative reinforcement. Reproduced from Koob and Le Moal (2008).

3. Stress and Addiction

Although many factors can contribute to initial and continued drug use, exposure to either psychological or physiological stress at any point in the addiction cycle seems to worsen this disease, augmenting all drug-seeking behaviours, including initial drug taking, drug craving, and relapse [6, 56, 113].

It has been stated that stress and addiction involve the same brain neurocircuitry, not only the brain stress system, but also the reward pathway. Exposure to either drugs of abuse or stress produces similar alterations in the electrophysiology of neurons in the mesolimbic DA reward pathway in animals. Enhanced excitatory synaptic transmission occurs in VTA DA neurons following exposure to either stress or any one of several drugs of abuse, including cocaine, nicotine, and alcohol [67]. Molecular changes associated with stress exposure and drug addiction are also similar. Chronic stress increases

Δ FosB levels in the NAc as well as in the frontal cortex and basolateral amygdala (BLA) [114]. Various stressors activate the HPA axis and are associated with increased phosphorylation of CREB in several regions of the brain [115], including the NAc [24]. Thus, stress and addictive drugs might act through common molecular mechanisms within similar brain circuits to perpetuate the addiction cycle.

Most physiological stressors exert their effects on the HPA axis, the primary endocrine stress pathway. CRF is secreted from the PVN to stimulate the output of ACTH. Following its release from the anterior pituitary, ACTH subsequently stimulates the secretion of adrenal GC – cortisol in humans and corticosterone in animals – into the bloodstream. The HPA axis is activated in rodents and nonhuman primates following acute administration of many addictive substances – including cocaine, amphetamine, ethanol, opiates, and nicotine – and causes increased ACTH and corticosterone levels in plasma [42]. Chronic administration of drugs of abuse in the same animal models results in either a sustained increase in HPA axis function, in the case of cocaine and amphetamine, or a reduced effect of the initial activating effects of the drug, in the case of morphine, nicotine, and alcohol [116-119]. Human studies demonstrate similar perturbations following illicit drug use, with slight differences.

Stress, through activation of the HPA axis and the release of GC influences many regions of the brain, including DA neurons, which express glucocorticoid receptors (GR) [120]. The interaction of GC with the mesocorticolimbic DA system may have a significant impact on vulnerability to self-administer drugs of abuse. In basal condition, GC secretion and DA release are low, as the result of sensitivity to drug of abuse. An acute stress causes an increase in GC secretion, which, by enhancing the release of DA, results in an

increase in the sensitivity to the reinforcing effects of drugs of abuse, and thus in an increase in self-administration. The repeated exposure to stress and a consequent repeated increase in the concentration of GC progressively impair GC negative feedback by decreasing the number of central GR in the hippocampus. This produces a long-lasting increase in the secretion of GC and an increase in the release of DA in the NAc and that explains why, after repeated stress, an increase in the sensitivity to drugs is found also weeks after the end of the stressor exposure [7]. Acute cortisol administration has been found to precipitate cocaine craving in human addicts [64], as has stress [65]. Moreover, rats receiving repeated injections of corticosterone acquire cocaine self-administration at a lower dose than do rats that self-administer vehicle; in addition, rats that normally do not self-administer drugs, i.e., that do not react to the novel environment, have a lower stress axis reactivity but become prone to get drugs after stress or corticosterone administration [121, 122]. Conversely, surgical adrenalectomy and blockade of GRs (and also CRF receptors) tend to suppress drug self-administration in rats [7, 123, 124]. Furthermore, GR antagonists decrease extracellular DA levels in the NAc [69], similar to the decrease observed following an adrenalectomy [68]. These results suggest that the DA increase observed in rodents following either drug administration or stress is dependent, at least in part, on the release of corticosterone from the HPA axis and the subsequent activation of GR. Thus, the HPA axis mediates the positive reinforcing effects of drugs and self-administration/vulnerability to drug intake [6, 7].

Abnormalities in stress circuitry continue following the cessation of drug taking, in both immediate and long-term withdrawal. Activation of the HPA axis, as evidenced by a marked increase in corticosterone levels, occurs following acute withdrawal from most drugs of abuse both in humans and in animal models. Interestingly, following this initial activation, basal cortisol and

corticosterone levels return to normal in humans and rodents, respectively [42]. However, during long-term withdrawal from psychostimulants and opiates, the HPA axis displays an augmented response upon exposure to a stressor. In former cocaine and opiate addicts, increased levels of ACTH and cortisol were measured following administration of the chemical stressor metyrapone [125, 126]. Together, these studies demonstrate alterations in the responsiveness of the HPA axis to a stressor during long-term withdrawal, which might play a role in the ability of stressors to reinstate drug seeking well after the drug is removed [6]. However, the role of the hypothalamic CRF during drug withdrawal is not clear yet. The blockade of the CRF system with antagonists or antibodies decreases the anxiety observed in this acute withdrawal phase [127-129]. CRF 1-receptor (CRF1R) antagonists decreased the physical symptoms of morphine withdrawal in dependent rats [129]. The data suggest that the CRF system plays a role in the psychological as well as the physical symptoms of acute withdrawal from addictive drugs. However, the role of CRF or stress circuitry in long-term withdrawal has yet to be elucidated [6].

A distinct circuitry involving CRF in the extended amygdala has been delineated in mediating stress-induced relapse. The significance of this pathway in the addiction cycle is evident primarily in relapse or reinstatement. Several laboratories have demonstrated that exposure to an acute stressor can effectively reinstate drug seeking of various drugs, including opiates, psychostimulants, alcohol, and nicotine [130-133]. Inactivation of the CRF projection from the CeA to the BNST blocks stress-induced cocaine reinstatement [134]. Specifically, CRF1R localized in the BNST, but not the AMG or NAc, mediate stress-induced relapse into drug seeking [134, 135]. Interestingly, selective CRFR1 antagonists attenuate stress-induced reinstatement of cocaine or opiate seeking [130, 136] but have no effect on drug-induced reinstatement [137, 138]. These data demonstrate that stress stimulation of the CRF-containing pathway, originating

in the AMG and extending into the BNST, and subsequent activation of CRFR1 localized in the BNST, triggers drug seeking in previously addicted animals [6].

Recently, CRF has been detected in the VTA, the site of origin of the DA neurons of the reward pathway. In both cocaine-naive and cocaine-experienced rats, CRF is released into the VTA following an acute footshock; however, the source of this CRF is not known [139]. In cocaine-experienced animals, glutamate and DA are released in the VTA in conjunction with CRF in response to a stressor. This release of glutamate and DA is dependent upon CRF and subsequent activation of its receptors, as local injections of CRF antagonists into the VTA attenuated the release of these two neurotransmitters [139, 140]. In addition, administration of CRF2R antagonists, but not CRF1R antagonists, locally into the VTA blocked the ability of footshock to reinstate cocaine seeking in a self-administration paradigm [140]. Taken together, these studies suggest a role for CRF in modulating DA cell activity, specifically following drug experience [6].

Noradrenergic function appears to be critical also in stress-induced reinstatement of drug-seeking for multiple classes of abused drugs. Noradrenergic antagonists were found to block stress-induced reinstatement [135, 141, 142]. The brain sites for these effects appear to have been the ventral noradrenergic bundle projections to the BNST. Neurotoxin-specific lesions of the ventral noradrenergic bundle were found to attenuate stress-induced reinstatement of heroin responding [141], and local injection of a β -adrenergic receptor antagonist into the BNST also blocked stress-induced reinstatement in cocaine-trained rats [143]. The conditioned release of NA in the BNST in response to stressors may elevate anxiety, which then augments the reward value of drugs through negative reinforcement processes [144].

AIMS

There is now considerable evidence, from animals models and more recently from humans, that all drugs of abuse converge on a common circuitry in the brain limbic system [5, 49, 145, 146]. Most attention has been given to the mesocorticolimbic pathways, although more recent works have established that several additional areas are also essential for chronic changes in reward associated with addiction. These regions include the hypothalamus and the brain stress system, among others [147]. In humans, stress has been long recognized as a major factor contributing to the development and perpetuation of drug addiction. For example, psychological stress elevates drug cravings, and stress-induced HPA axis responses predict amounts of subsequent drug use [39, 148]. A growing body of evidence suggests that CRF neuronal activity in the brain stress systems and hypothalamus represents an important element in the neurobiology of drugs addiction.

Recently, it has been shown that most drugs of abuse produce dysregulations in the HPA axis and the brain stress systems, for example, alterations in ACTH, corticosterone, CRF and NA activity [5, 7, 39, 55, 71]. These persistent alterations in stress hormone systems, receptors and neurotransmitters activity may represent compensatory mechanisms involving neuroadaptations aimed at restoring homeostatic function in response to the presence of the drug. As such, these changes could contribute significantly to negative emotional states characteristic of acute drug withdrawal, as well as enhanced sensitivity to stressful stimuli, both of which may result in great vulnerability to relapse during abstinence. Vulnerability to relapse constitutes one of the most significant problems for the long-term treatment of drug dependence [1, 7, 28, 147]. Activation of the brain stress systems may contribute not only to the negative motivational state associated with acute abstinence, but

also to the vulnerability to stressors observed during abstinence in humans. Neurotransmitters/neuromodulators systems implicated in stress-induced relapse include CRF, GC, and NA (brain anti-reward systems).

The identification of the neural substrates and the cellular and molecular neuroadaptations within specific neurocircuits that mediate the addiction is a primary goal of current opioid addiction research. **The goals of the present study** were to investigate the effects of chronic morphine administration and morphine withdrawal on several components of the HPA axis. We also examined the potential role of morphine dependence on the activity of NTS-A₂ noradrenergic cell group.

- **The first aim** of the present work was to reveal secretory, activational and transcriptional changes in the hypothalamus of morphine-dependent rats during naloxone-precipitated opioid withdrawal. This was accomplished by measuring corticosterone secretion, c-Fos induction and heteronuclear (hn) RNA levels of CRF and AVP in control and morphine dependent animals injected with saline or naloxone.
- The ERKs have been implicated in drug addiction [9], but their role in activation of paraventricular nucleus and NTS during morphine dependence remain poorly understood. **The second aim** was to determine the activation of ERK_{1/2} during morphine dependence and withdrawal as well as its involvement in morphine withdrawal-induced gene expression. To this end, we first evaluated in the PVN and NTS the changes in phosphorylation of ERK in morphine dependent rats in addition to total levels of ERK. We then investigated whether morphine withdrawal activates CRF-containing neurons in the PVN. Finally, we determined whether activation of ERK pathway contributes to morphine

withdrawal-induced activation of catecholaminergic neurons in the NTS and/or CRF neurons in the PVN.

- We have previously shown that morphine withdrawal but not chronic morphine treatment stimulates NA turnover in the PVN [111] as well as the activity of NTS-A₂ TH-positive neurons (as reflected by c-Fos expression; [74])[73]. This response was accompanied by a rise in TH enzymatic activity in the PVN [75]. Short-term regulation of catecholamine biosynthesis occurs through phosphorylation of TH, which enhances enzymatic activity. In particular, increases in the phosphorylation of Ser31 and Ser40 accelerate TH activity, thereby stimulating production of neurotransmitter [149, 150]. **The third aim** of the present work was to assess the changes in TH phosphorylation after chronic morphine administration and during morphine withdrawal in the PVN and brainstem catecholaminergic cell groups innervating the PVN. To this end, we first evaluated the changes in TH phosphorylation at Ser31 and Ser40 in addition to total levels of TH and TH enzymatic activity. It is known that phosphorylation of TH at each site is associated with distinct signalling pathways. Because ERK phosphorylates Ser31 *in vitro* and *in vivo* [149, 151], we then tested whether activation of the ERK kinase (MEK)-ERK_{1/2} pathway contributes to morphine withdrawal-induced TH phosphorylation at Ser31. This was accomplished by investigating the effects of SL327, a selective inhibitor of ERK activation, on levels of TH phosphorylated at Ser31.
- GC exert their feedback effects not only by inhibiting the secretion of CRF in the hypothalamic PVN, but also by modulating neuronal inputs to the PVN in the central stress pathways [152]. An important target of the GC action is the noradrenergic pathways from the brainstem (NTS-A₂) that

provide the major excitatory inputs to the PVN [107]. Given the prominent role of NTS in morphine withdrawal responsiveness at PVN level, it is important to determine whether the depletion of GC regulates TH function in the NTS-A₂. To address this question, **the fourth aim** of the present study was to examine the effects of bilateral adrenalectomy on TH gene expression, TH immunoreactivity levels and TH phosphorylation (activation) in the NTS-A₂ in morphine dependent rats and after naloxone-precipitated withdrawal. We also examined TH enzymatic activity in the PVN to determine whether the effects of morphine withdrawal on hypothalamic PVN require an intact noradrenergic pathway.

MATERIALS AND METHODS

1. Animals and treatments

Male Sprague-Dawley and Wistar rats (220–240 g at the beginning of the experiments) were housed four to five per cage under a 12-h light, 12-h dark cycle (light 08:00–20:00 h) in a room with controlled temperature (22 ± 2 °C), humidity ($50 \pm 10\%$), and food and water available *ad libitum* and prehandled for several days preceding the experiment to minimize stress. All surgical and experimental procedures were performed in accordance with the European Communities Council Directive of 24 November 1986 (86/609/EEC) and the local Committee (REGA ES300305440012).

Rats were rendered dependent on morphine by s.c. implantation of morphine base pellets (75 mg), one on day 1, two on day 3 and three on day 5, under light ether anaesthesia. This procedure has repeatedly been shown to induce dependence as measured behaviourally and biochemically. Control animals were implanted with placebo pellets containing lactose instead morphine on the same time schedule. On day 8, the animals pretreated with morphine or placebo pellets were injected with saline s.c. or naloxone (2 or 5 mg/kg s.c.). The weight gain of the rats was checked during treatment to ensure that the morphine was liberated correctly from the pellets. In addition, body weight loss was determined as the difference between the weight determined immediately before saline or naloxone injection and a second determination made 30, 60, 90 and 120 min later.

In order to determine the effect of inhibiting ERKs phosphorylation on the morphine withdrawal-induced changes in c-Fos expression and TH phosphorylation at the PVN and brainstem catecholaminergic areas as well as in HPA axis activity, c-Fos and TH phosphorylated at Ser31 (TH pSer31) levels, as

well as plasma corticosterone and ACTH concentrations were determined in morphine dependent and control rats treated with SL327 (a selective inhibitor of MEK; [153]), 1 h before the administration of naloxone or saline. This inhibitor was dissolved in dymethylsulfoxide (DMSO) 100% and injected intraperitoneally at an injection volume of 1 ml/kg and at doses 100 mg/kg.

2. Adrenalectomy

To investigate the possible involvement of elevated corticosterone during morphine dependence in the changes in TH gene and protein expression, TH phosphorylation in the NTS and TH activity in the PVN, rats were bilaterally adrenalectomized (ADX/C animals) via a dorsal approach under pentothal anesthesia (2 mg/100 g body weight; Hospira, Hoofddorp, Netherlands), and implanted s.c. with a slow-release corticosterone pellet (25 mg corticosterone, Sigma Chemicals, St Louis, MO, plus 75 mg cholesterol, 15 days release) at the time of adrenalectomy. The composition of corticosterone pellets was chosen because it provides adrenal steroid levels corresponding to circadian nadir. Control rats were subjected to the same surgical procedure (sham) without adrenal extirpation. ADX/C rats received 0.9% saline as drinking water to replace depleted sodium secondary to the loss of aldosterone after ADX. Sham and ADX/C rats were allowed to recover from surgery for 5 days before starting with morphine dependence procedure.

3. Immunohistochemistry

For c-Fos immunostaining, 2 h after naloxone or saline injections, rats were deeply anesthetized with pentobarbital (Nembutal 2 mg/100 g body weight) and quickly perfused through the ascending aorta with saline followed by 300 mL of ice-cold fixative (4% paraformaldehyde in 0.1 M/L borate buffer). Brains were post-fixed in the fixative for 3 h and then placed in KPBS (0.1 M potassium phosphate buffered saline, pH 7.2) containing 10% sucrose overnight.

Four series of 30 µm frontal sections were cut on freezing microtome collected in cryoprotectant and stored at -20° C until processing. After blocking with 0.3% H₂O₂ and 2% normal goat serum (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) tissue sections were incubated in primary anti-c-Fos antiserum (rabbit polyclonal, #sc-52, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA; 1:20000) for 72 h at 4° C. Antigens were visualized by conventional avidin-biotin-immunoperoxidase protocol (Vectastain ABC Elite Kit; Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). 3, 3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB; Sigma) reaction was intensified with nickelammonium sulfate. Sections were mounted onto chrome-alumn gelatine coated slides and coverslipped.

For phosphorylated ERK_{1/2} (pERK_{1/2}), TH pSer31 and TH pSer40 labelling, 60 and 90 min after administration of naloxone or saline, rats were deeply anaesthetized with an overdose of pentobarbital (100 mg/kg i.p.) and perfused transcardially with phosphate-buffered saline (PBS pH 7.4; 1 mM NaF) followed by fixative containing 4% paraformaldehyde in PBS. After removal of the perfused brains, they were post-fixed in the same fixative and stored at 4°C overnight. Free-floating coronal brain sections (30 µm thickness) throughout the rostrocaudal extend of the hypothalamus were obtained on a Vibratome (Leica, Nussloch, Germany), according to the Atlas of Paxinos and Watson [154], and stored in cryoprotectant at -20 °C until histochemical processing.

The sections were pre-incubated in absolute methanol containing 10% H₂O₂, and blocked with PBS containing 2% goat serum and 0.5% Triton-X-100. Sections were then incubated in pERK_{1/2} (1:1500; sc-7383, Santa Cruz Biotechnology), TH pSer31 (1:400; AB5423, Chemicon International) and TH pSer40 (1:400; AB5935, Chemicon International) antibodies overnight. Antigens were visualized by conventional avidin-biotin-immunoperoxidase protocol (Vectastain ABC Kit; Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA).

For double-label immunohistochemistries, c-Fos was revealed with DAB intensified with nickel in the first position, and the pERK_{1/2}, CRF or TH pSer31 were revealed with DAB in the second position. c-Fos immunohistochemistry was performed as described previously, using the same primary antibody at a dilution 1:3000.

4. *In situ* hybridization immunohistochemistry

Riboprobes for AVP and CRH hnRNAs, and for TH mRNA were transcribed from plasmids provided by Dr T.G. Sherman (Georgetown University), Dr A. Ericsson (The Salk Institute) and Dr. Zsuzsa Toth (Semmelweis University, Budapest), respectively in the presence of 35S-uridine triphosphate (DuPont–NEN, Boston, MA, USA). The template sequence corresponds to nucleotides 684–1068 of the TH cDNA (GenBank accession number M23598, provided by Dr. W.S. Young, NIMH, USA). Tissue sections were mounted onto poly-L-lysine-coated slides (for AVP and CRF hnRNAs), and onto SuperFrost Ultra Plus slides (Menzel GmbH, Braunschweig, Germany) for TH mRNA, postfixed with 4% paraformaldehyde, then digested with proteinase K at 37° C 20 min, acetylated, and dehydrated. 100 µL hybridization mixture containing ³⁵S-UTP-labeled riboprobe (107 dpm/mL) was pipetted onto the slides and hybridized overnight at 56° C. Sections were then rinsed in 4X SSC, digested with ribonuclease A at 37° C for 30 min, gradually desalted and washed in 0.1X SSC at 65–75° C for 30 min. Slides were exposed to image plates for 24–48 h and analyzed in Phosphoimager. For CRF and AVP hnRNAs, the slides were then dipped in NTB-3 nuclear emulsion (Eastman Kodak, Rochester, NY, USA) and exposed for 1–3 weeks at 4° C, developed in D-19 developer, and lightly counterstained with cresylviolet.

5. Image analysis

For c-Fos immunolabelling quantitative analysis, images were captured by means of Nikon Eclipse E600 microscope (Nikon Corporation, Tokyo, Japan) equipped with a CCD camera (AVC-D7CE, Sony, Tokyo, Japan). c-Fos positive cell nuclei were counted using the Macintosh-based NIH IMAGE 1.59 software (available on the Internet: <http://rsb.info.nih.gov/nih-image>). The boundaries of dorsal medial parvocellular (mpd) ventral medial parvocellular (mpv), dorsal parvocellular (dp) and posterior magnocellular (pm) subdivisions of the PVN were outlined and the number of positive profiles was recorded after thresholding the images to a common level. Total counts of the PVN were taken bilaterally at regularly spaced intervals and expressed as mean \pm S.E.M.

Semi-quantitative densitometric analysis of CRF and AVP hnRNAs in situ hybridization histochemistry was performed using the NIH IMAGE 1.59 software on nuclear emulsion coated slides. Optical density of inverted images was detected on a 256-unit grey level scale under identical lighting conditions using 'Uncalibrated O.D.' function. Integrated density, which reflects both the signal intensity and the number of pixels [number of pixels \cdot (mean - background)], were calculated in each slide. Since the number of pixels was included in the measurement, considerable care was taken to ensure equivalent areas were analyzed between animals. For reading CRH hnRNA signals, a rectangular frame (625 μm \cdot 525 μm) was used at 10X magnification. Since AVP hnRNA is distributed in two nonregularly spaced and adjoining compartments in the PVH, AVP signals were analyzed by outlining the borders of parvocellular and magnocellular parts based on the Nissl-stained sections. The three maximal values of a given animal were chosen and averaged to obtain a single integrated density value per region for each rat.

Evidence of pERK_{1/2}, as well as TH pSer 31 and pSer40 immunoreactivity was determined using a computer-assisted image analysis system, Q500MC (Leica, Madrid, Spain). This system consists of a light microscope (DMLB; Leica) connected to a video camera (Sony 151-AP; Sony, Madrid, Spain) and the image analysis computer. A square field (129 µm side) was superimposed upon the captured image (20X or 40X magnification) for use as a reference area. For the parvocellular part of the PVN, the number of positive neurons of both the right and left sides of three to four correlative sections was averaged per animal. For the NTS-A₂, the right and left sites of five to six sections were analysed and averaged per rat. Measures were also averaged in each experimental group for the PVN and NTS-A₂.

The same conventional light microscopy described above was used for double immunostaining. c-Fos positive-pERK_{1/2} positive, c-Fos positive-CRF positive or c-Fos-positive TH pSer31 positive neurons, were identified as cells with brown cytoplasmic deposits for pERK_{1/2}, CRF or TH pSer31-positive staining and blue/dark nuclear staining for c-Fos. A square field (129 µm) was superimposed upon captured image for use as reference area.

Densitometric analysis of the TH mRNA in situ hybridization histochemistry in the NTS was performed using the Advanced Image Data Analyser (AIDA 3.1) software on scanned images obtained by BASReader program (Raytest Isotopenmessgerate GmbH Straubenhardt, Germany). Brain regions and neurons were clearly distinguishable by their specific and distinct levels of TH mRNA expression. A 25 x 25 pixel square was used for the NTS. Hybridized tissue signal was corrected by subtraction of non-hybridized tissue area from the same section (as background) and expressed as corrected gray level.

6. Western blot analysis

Thirty, 60, 90 and 120 min after administration of naloxone or saline, rats were killed by decapitation. The hypothalamic tissue containing the PVN [155] and brainstem were dissected. The PVN and brainstem samples were placed in homogenization buffer [phosphate-buffered saline (PBS), 2% SDS, protease inhibitors plus a phosphatase inhibitor Cocktail Set], homogenized and sonicated for 30 s prior to centrifugation. Samples containing 40 µg of protein were loaded on a 10% SDS/polyacrylamide gel, electrophoresed and transferred onto polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes (Millipore Corp., Bedford, MA). Non-specific binding of antibodies was prevented by incubating membranes in 1% BSA in TBST. The blots were incubated overnight at 4 °C with the following primary antibodies: polyclonal anti-ERK (1:1000 dilution; sc-154, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA); monoclonal anti-pERK_{1/2} (1:1000; sc-7383, Santa Cruz Biotechnology), polyclonal anti-(c-Fos) (1:2000; sc-52, Santa Cruz); polyclonal anti-total TH (against phosphorylated and non-phosphorylated TH; 1:1000 dilution; AB152, Chemicon International, Temecula, CA); polyclonal anti-TH pSer31 (1:500; AB5423, Chemicon International); polyclonal anti-TH pSer40 (1:500; AB5935, Chemicon International) or polyclonal anti-β-actin (1:1000 dilution; #4967; Cell Signalling; Danvers, MA) in TBST with BSA. Immunoreactivity was detected with an enhanced chemiluminescence's Western-blot detection system (ECL, Amersham Ibérica, Madrid, Spain) and visualized by Amersham Hyper film-ECL. Quantification of immunoreactivity corresponding to total and phosphorylated ERKs (42 and 44 kDa), c-Fos (62 kDa), total TH, TH pSer31 and pSer40 (60 kDa) and β-actin (45 kDa) bands was carried out by densitometry using Alpha Imager software (Alpha Innotech, Madrid, Spain).

7. Measurements of TH activity

Ninety and 120 min after saline or naloxone injection to placebo- or morphine-pelleted animals, rats were killed by decapitation, the brain removed and the hypothalamic PVN was dissected according to the method described above. TH catalyzes the hydroxylation of tyrosine to generate L-DOPA and water using tetrahydropterine (BH₄) as a cofactor. TH activity is measured by quantifying tritiated water production from 3,5-[³H]L-tyrosine.

8. Corticosterone and ACTH assays

At the end of the treatment, rats were killed by decapitation. Trunk blood was collected into ice-cooled tubes containing 5% EDTA and then was centrifuged. Plasma was separated, divided into two aliquots and stored at -80 °C until assayed for corticosterone or ACTH. Plasma levels of corticosterone and ACTH were estimated, as sensitive markers of the HPA axis activity, with commercially available kits for rats (¹²⁵I-corticosterone and ¹²⁵I-hACTH radioimmunoassay, MP Biomedicals, Orangeburg, NY, USA).

9. Statistical analysis

Data are presented as mean ± S.E.M. Data were analysed using two or three way analysis of variance (ANOVA). One way ANOVA followed by a *post hoc* Newman–Keul's test was used for comparing the means among groups. Unpaired Student's *t*-test was used when comparisons were restricted to two experimental groups. Differences with a P-value < 0.05 were considered significant.

RESULTS

1. Activation of stress-related hypothalamic neuropeptide gene expression during morphine withdrawal

Morphine withdrawal results in serious affective and somatic symptoms including activation of the HPA axis. To reveal secretory, activational and transcriptional changes in the hypothalamus of morphine-dependent rats during naloxone-precipitated opioid withdrawal, we measured corticosterone secretion, c-Fos induction and hnRNA levels of CRF and AVP in naïve and morphine dependent animals injected with saline or naloxone. Naloxone-precipitated morphine withdrawal resulted in a significant increase in corticosterone secretion and induction of neuronal activation in the hypothalamic PVN 2 h after challenge. Using probes complementary to intronic sequences of genes encoding neuropeptides in parvocellular neurosecretory neurons of the PVN, we found robust increases in CRH and AVP hnRNAs in morphine-dependent rats during naloxone-precipitated withdrawal. Naïve rats and animals that were implanted with morphine pellets for 8 days did not display significant up-regulation of ongoing neuropeptide expression in the parvocellular compartment of the PVN.

The CRF and AVP hnRNAs has been colocalised with c-Fos in neurons in the parvocellular part of the PVN during morphine withdrawal. In addition to hypophyseotropic neurons, naloxone-precipitated withdrawal resulted in a marked activation in autonomic-related projection neurons in PVN and in the magnocellular neurons in the PVN and SON. These activations however were not associated with induction of CRH or AVP hnRNAs.

In conclusion, significant induction of stress-related neuropeptide genes, CRF and AVP was detected in the hypophyseotropic cell population of the

hypothalamic PVN during naloxone-induced morphine withdrawal. We have confirmed widespread neuronal activation throughout the rat brain stem and limbic areas that are in the position to drive HPA axis. However, identification of afferent mediators and molecular mechanisms driving neuropeptide transcription in morphine dependent subjects during opioide withdrawal remains to be elucidated.

2. Regulation of extracellular signal-regulated kinases (ERKs) by naloxone-induced morphine withdrawal in the brain stress system

Our previous studies have shown that morphine withdrawal increases the HPA axis activity, which is dependent on a hyperactivity of noradrenergic pathways (NTS-A₂) innervating the hypothalamic PVN. The ERKs has been implicated in drug addiction, but its role in activation of PVN and NTS during morphine dependence remain poorly understood. We have determined the activation of ERK_{1/2} during morphine dependence and withdrawal as well as its involvement in morphine withdrawal-induced gene expression. We show that naloxone-induced morphine withdrawal activates ERK_{1/2} and increases c-Fos expression in rat PVN and NTS-A₂ neurons.

Activated ERK_{1/2} was co-localized with c-Fos in both nuclei and this response was blocked by SL327, a drug that prevents ERK activation. In the PVN from morphine-withdrawn rats the number of neurons expressing CRF was increased. Immunohistochemical study showed a dramatic increase in c-Fos immunoreactivity within CRF-positive cells.

In summary, these results suggest that activation of ERK_{1/2} might be involved in morphine withdrawal-induced activation of brain areas associated

with the stress system because the effects of morphine withdrawal on c-Fos expression was decreased by blocking the ERK signalling pathway.

3. Regulation of Ser31 and Ser40 TH phosphorylation during morphine withdrawal in the hypothalamic PVN and NTS-A₂ cell group. Role of ERK_{1/2}

Short-term regulation of catecholamine biosynthesis occurs through phosphorylation of TH, which enhances enzymatic activity. In the present study, we have evaluated the possible changes in transcriptional and/or post-transcriptional TH regulation during morphine dependence and withdrawal.

Our results show that, during morphine dependence and withdrawal, there is an increase in total TH protein (phosphorylated and non-phosphorylated) in the NTS, but not in the PVN. The effect of morphine withdrawal on site-specific TH phosphorylation in the PVN and NTS-A₂ was determined by quantitative blot immunolabelling and immunohistochemistry using phosphorylation state-specific antibodies. We show that naloxone-induced morphine withdrawal phosphorylates TH at Ser31 but not at Ser40 in PVN and NTS-A₂, which is associated with both an increase in total TH immunoreactivity in NTS-A₂ and an enhanced TH activity in the PVN. In addition, we demonstrated that TH neurons phosphorylated at Ser31 coexpress c-Fos in NTS-A₂.

We then tested whether pharmacological inhibition of ERKs activation by MEK contributes to morphine withdrawal-induced phosphorylation of TH at Ser31. Currently, the only signalling pathway which is known to phosphorylate TH at Ser31 residue is the ERKs one. Here, we show that the ability of morphine withdrawal to stimulate phosphorylation at this seryl residue is reduced by

SL327, an inhibitor of ERK_{1/2} activation. These results suggest that morphine withdrawal increases NA turnover in the PVN, at least in part, via ERK_{1/2}-dependent phosphorylation of TH at Ser31.

4. Influence of adrenalectomy on TH mRNA expression, phosphorylation and enzymatic activity in the NTS during morphine dependence and withdrawal

This study investigated the potential contribution of elevated GC at the time of morphine withdrawal in TH. Present results show that noradrenergic neurons from NTS-A₂ are stimulated during morphine withdrawal, as indicated by increased TH mRNA expression. Surgical adrenalectomy (ADX/C) that eliminated morphine withdrawal-induced corticosterone secretion attenuated the augmentation of TH gene expression.

Total TH levels were elevated in the NTS-A₂ from sham-operated rats, whereas we did not find any alteration in ADX/C animals. Furthermore, high levels of TH phosphorylated (activated) at Ser31 (but not at Ser40) were found in the A₂ area from sham-morphine withdrawn rats. Consistent with these effects, we observed an increase in the enzymatic activity of TH in the PVN. However, morphine withdrawal did not alter the number of TH-positive neurons phosphorylated at Ser31 in NTS-A₂ and decreased TH activity in the PVN from ADX/C rats.

These results suggest that elevated GC during morphine abstinence may play a permissive role in morphine withdrawal-induced activation of noradrenergic pathway innervating the PVN.

DISCUSSION

1. Activation of stress-related hypothalamic neuropeptide gene expression during morphine withdrawal

Morphine withdrawal results in serious affective and somatic symptoms including activation of the HPA axis. Spontaneous or naloxone-precipitated morphine withdrawal results in activation of the HPA axis as revealed by increased secretion of ACTH and corticosterone [79, 80]. It seems likely that activation of HPA during opiate withdrawal is driven predominantly by the hypothalamus because naloxone injection in morphine dependent rats results in expression of the neuronal activation marker c-Fos in the stress-related neurons of the hypothalamic PVN [74, 75, 156, 157]. The hypothalamic activation is accompanied with significant depletion of hypothalamic neuropeptide stores as revealed by the decrease of CRF immunoreactivity in the parvocellular neurosecretory neurons in the PVN [158].

In addition to CRF, parvocellular neurosecretory neurons are capable to synthesize multiple bioactive peptides with ACTH secretagogue activity. Foremost among these is AVP that promotes CRF action at the corticotrope cells of the anterior pituitary and is involved in mediation of long-lasting changes in sensitivity and responsiveness of HPA axis to subsequent stimuli [59-62]. Although morphine withdrawal in rats has been reported to induce facilitated stress response to restraint on short-term and attenuated stress-induced ACTH levels on long-term [80, 159], the role of AVP in these HPA derangement has not been studied yet.

In situ hybridization histochemistry with intron specific probes is a relatively reliable method for assessment of rapid changes in gene transcription in individual central nervous system neurons as compared and validated with

nuclear run-on assays [160]. These intronic probes hybridize to sequences in the primary transcript (hnRNA) from the gene that allowed detection of rapid changes of CRF [61, 160, 161]. Our results provide evidences that activation of HPA during naloxone-precipitated morphine withdrawal involves transcriptional up-regulation of hypophyseotropic CRF and AVP expression in the hypothalamic PVN.

As it has been previously reported, contradictory data have been appeared concerning the effect of chronic morphine administration on hypothalamic CRF. In contrast to our previous data indicating a decrease in CRF mRNA levels in the PVN during chronic morphine treatment [76], other studies have shown no significant changes in CRF mRNA levels in the PVN [77, 78], while increased CRF mRNA signals were detected by others [79, 80]. During morphine withdrawal a bigger drop in CRF mRNA levels in PVN was reported by our laboratory, whereas others have not found any changes in CRF mRNA content [78].

It seems likely that the mode of morphine withdrawal has also an impact on the hypothalamic CRF expression. Spontaneous withdrawal is less effective in inducing CRF transcription than the naloxone-precipitated morphine withdrawal [77]. Our results, obtained by intron specific probes, support the view that continuous morphine administration does not activate ongoing CRF synthesis in the hypophyseotropic neurons of the PVN; however, stress-related parvocellular CRF expression is dramatically up-regulated in response to naloxone precipitated withdrawal.

Parvocellular neurosecretory neurons in the PVN contain significant hybridizable pool of CRF mRNA under basal conditions. Little is known of the extent to which alterations in secretion, axonal transport, transcription and

post-transcriptional processing events affect CRF mRNA levels in the hypothalamic stress-related neurons. For example, despite the robust activation of ACTH and corticosterone secretion and the increases of relative levels of and the number of cell expressing CRF hnRNA following ether stress, assessments of CRF mRNA revealed no significant elevation over control levels [61, 162]. Similar reasons may account for the inconsistencies found in CRF mRNA levels after naloxone precipitated morphine withdrawal with no change [78] or even decrease [76] reported.

In addition to CRF, parvocellular neurons in the PVN are capable to express AVP, which is generally held as the regulated variable governing HPA output activity in a situation specific manner [60, 163]. In contrast to previous study that indicated no change of AVP mRNA levels over the PVN after naloxone-precipitated morphine withdrawal [76], we report the increase of AVP hnRNA signal in the parvocellular neurosecretory neurons. This supports the usefulness of intron-specific probes in analyzing transcriptional changes of AVP gene especially in the PVN, where substantial amount of AVP mRNA pool in the magnocellular compartment may limit the ability to detect changes in parvocellular AVP expression. Parvocellular AVP expression has been hypothesized to mediate long-term changes in stress responsiveness after acute stressors. For instance, single injection of interleukin-1 or cocaine results in AVP-mediated hyperresponsiveness of HPA axis. Morphine withdrawal also results in changes of responsiveness of the animals to further stressors, and induction of AVP transcription in the stress-related parvocellular neurosecretory cells may be involved in this process.

c-Fos induction in the hypothalamic PVN confirms the acute neuronal activation in response naloxone-precipitated morphine withdrawal in the dorsal aspect of the medial parvocellular subdivision of the nucleus [74]. The

signals that trigger transcriptional and synthetic activities of the PVN neurons during morphine withdrawal may originate from (a) depleted peptide stores, (b) activation of afferent inputs to the neurosecretory neurons, and/or (c) release from tonic inhibition. It has been reported previously that naloxone-precipitated morphine withdrawal results in a dramatic depletion of neuropeptide stores in the median eminence [158], although the exact mechanisms governing secretion-transcription coupling is not fully characterized in these neurosecretory neurons. Increased activity of noradrenergic inputs to the PVN seen after naloxone injection to morphine dependent rats might also be responsible for the transcriptional up-regulation of CRF and AVP genes. Withdrawal-induced activation of noradrenergic afferents to the PVN is well documented [70, 73, 75, 111] and NA infusions to the PVN result in activation of CRF [164] and AVP [165] genes. CRF neurons in the PVN are under tonic inhibition posed by GABA- and opiate inputs. Suspension of this inhibitory influence results in activation of stress-related neuropeptide expression [166, 167]. Opiate withdrawal precipitated by naloxone doses that only induce an aversive state without somatic signs, results in c-Fos mRNA induction in several limbic areas such as the basolateral amygdala (BLA), hippocampus, VTA and extended amygdala [168]. These areas are connected, directly or indirectly, with the hypothalamic stress-related neurons. Therefore, the role of these limbic inputs in activation of neuropeptide expression in the parvocellular PVN can not be ruled out.

There are uncertainties about the molecular mechanism that drive CRF and AVP transcription in the stress-related neurons during naloxone-precipitated morphine withdrawal. We have previously reported that stress-induced up-regulation of CRF and AVP expression in the parvocellular neurosecretory neurons is compatible with phosphorylation of CREB and activation of transcription factors encoded by IEGs, such as members of fos and

jun families, respectively [61, 62]. To support the involvement of AMPc/PKA/CREB transduction pathway in the activation of parvocellular neuropeptide expression it was recently found that specific inhibition of PKA resulted in attenuated c-Fos induction in the PVN during morphine withdrawal [13]. CREB has been implicated as transcriptional regulator of many genes, including CRF, AVP and c-Fos and has been recently proposed as a marker for neuronal plasticity during withdrawal [11, 169]. Time course studies on the expression sequence of neuropeptide and IEGs in combination with the analysis of regulatory regions of neuropeptide genes implicated the transcription factor AP-1 in regulation of AVP genes in the parvocellular neurons [163]. AVP gene contains sequences resembling canonical CRE and AP-1 response elements, both of which might play a role in driving parvocellular AVP transcription in morphine-withdrawn animals.

Analysis of c-Fos immunostained material revealed that neuronal activation in the PVN following morphine withdrawal was not limited to the CRF-secreting parvocellular subdivision. Naloxone-induced c-Fos immunoreactivity was reliably detected in cells of the magnocellular division as well as in the SON. Based on their topography as well as direct co-staining experiments, these were found to correspond to both oxytocinergic and vasopressinergic neurons. Up-regulation of AVP mRNA was revealed in the magnocellular neurons of morphine dependent animals during spontaneous withdrawal [77]. Increased oxytocin release into the hypophyseal portal circulation [170], and increased OT expression [171, 172] in the PVN and SON was detected during naloxone-precipitated morphine withdrawal. In contrast to the situation seen in parvocellular neurons, activation of magnocellular oxytocinergic neurons during morphine withdrawal seems to be independent of catecholaminergic inputs originating in the brainstem [172-174].

In addition, the third major visceromotor cell type in the PVN, the one that give rise to long descending projections to brain stem and spinal cord autonomic centers, displayed c-Fos activation during naloxone precipitated morphine withdrawal [175]. It is not clear at the present stage of the analysis whether this neuronal activation may be directly related to the increased sympathetic activity that has been reported following drug withdrawal. The effect of morphine withdrawal is not limited to the hypophyseotropic CRF system. Extrahypothalamic CRF has been implicated in anxiety and aversion associated with opiate withdrawal. CRF1R antagonists attenuated several behavioural signs of opiate withdrawal [176] as well as footshock stress-induced reinstatement of heroin seeking and morphine-conditioned place preference [130]. CRF plays a role in the elevation of withdrawal-induced noradrenergic transmission [177], while chronic morphine selectively sensitizes LC noradrenergic neurons to CRF [178]. These mechanisms contribute to the facilitated neuroendocrine stress response seen in morphine dependent rats after withdrawal [159].

CRF is also recognized as an anorexic factor and extrahypothalamic CRF released during withdrawal may contribute to the weight loss seen in morphine dependent rats during withdrawal. Elevated levels of CRF mRNA were found in the CeA [179] but not in the BNST in morphine treated rats and naloxone-precipitated withdrawal [79]. However, using intron-specific probes we could not detect transcriptional activation of the CRF gene in extrahypothalamic brain sites in response to chronic morphine treatment or naloxone-precipitated withdrawal.

In conclusion, significant induction of stress-related neuropeptide genes, CRF and AVP was detected in the hypophyseotropic cell population of the hypothalamic PVN during naloxone precipitated morphine withdrawal. We

have confirmed widespread neuronal activation throughout the rat brain following opiate withdrawal including those brain stem and limbic areas that are in the position to drive HPA axis. However, identification of afferent mediators and molecular mechanisms driving neuropeptide transcription in morphine dependent subjects during opioid withdrawal remains to be elucidated.

2. Regulation of extracellular signal-regulated kinases (ERKs) by naloxone-induced morphine withdrawal in the brain stress system

ERKs, one member of the MAPK family, transducers a broad range of extracellular stimuli into diverse intracellular responses, and are involved in various central processes, including drug addiction [16, 17]. In rat brain, chronic morphine treatment has been shown to regulate ERK_{1/2} catalytic activity in a region-specific manner [180]. Numerous investigations have demonstrated that modulation of ERKs pathway in different brain regions is relevant to tolerance, dependence and reward [18, 19] after addictive drugs administration. In our study, we found that naloxone-induced morphine withdrawal increased phosphorylated ERK_{1/2} in rat PVN and NTS, indicating that this treatment stimulated ERKs activity. Moreover, the morphine withdrawal-induced increase in ERKs activity was shown to be attributable to an enhancement in the phosphorylation state of the enzyme, without a change in total ERK immunoreactivity. This suggests that the effects of morphine withdrawal that may be mediated by ERK_{1/2} are likely to be affected through the activation (via phosphorylation) of ERKs.

This study shows that chronic morphine treatment did not induce changes in basal ERKs activity in PVN or NTS. In this context, a recent study

[181] also reported that chronic morphine treatment failed to alter the levels of MEK_{1/2} immunoreactivity in various brain regions, whereas naloxone-induced withdrawal produced a robust stimulation of MEK in the cerebral cortex and corpus striatum, indicating that morphine withdrawal is associated with activation of the ERK pathway. These results contrast with findings observed in several brain regions. For example, chronic morphine treatment in rats was shown to increase ERK activation in the VTA [182], caudate/putamen and LC [183] and decrease the levels of pERK in the NAc [180], spinal cord and also in some other structures of the rat brain. Thus, the ERK pathway appears differentially regulated depending on the brain structure studied, showing therefore the complex morphine actions at the intracellular levels [16].

It has been shown that morphine dependence and withdrawal alters the levels and/or activity of various signalling elements. These chronic adaptive molecular mechanisms involve gene expression and/or some protein kinases, which are relevant for signalling processes involving protein phosphorylation and gene expression [9]. ERK is a family of serine/threonine protein kinases that have been functionally linked to addiction through phosphorylation of transcription factors leading to changes in target gene expression [9]. The single ERK immunostaining experiments revealed that 90 min after naloxone-induced morphine withdrawal pERKs are expressed in the parvocellular division of the PVN, the primary location of CRF neurons, and in the NTS-A₂ catecholaminergic cell group. In support of our previous observations [74], present experiments also show that morphine withdrawal gives rise to an increase in c-Fos expression in the parvocellular division of the PVN as well as in the NTS-A₂. Phosphorylation of ERK is one of the major pathways for induction of c-Fos. In agreement with this, attenuated morphine withdrawal-induced c-Fos expression was found after treatment with the MEK inhibitor SL327 in both the PVN and NTS. It suggests that activation of ERK pathway

may be implicated in morphine withdrawal-induced parvocellular neurons activation in the PVN and catecholaminergic activation in the NTS.

Importantly, present experiments show that most of the c-Fos positive neurons in the parvocellular division of the PVN co-express pERK_{1/2}. The enhanced PVN neuronal activity that we reported here, as illustrated by increased c-Fos expression, was expected to be related to an increased transcription of genes encoding CRF. In agreement, we found a significantly morphine withdrawal-induced increase in CRF positive cells in the PVN. Additionally, most of the c-Fos express into CRF neurons. These results suggest that the PVN ERK activation may contribute to CRF neurons activation via c-Fos expression.

Increases in ERK activation directly translate into downstream phosphorylation of cytosolic effectors that govern specific neuronal function. The morphine withdrawal-induced activation of ERK_{1/2} in c-Fos positive neurons in the NTS is interesting, given the prior evidence that during morphine withdrawal most of TH positive neurons expressed c-Fos in this brain region [73-75]. Moreover, CRF and noradrenergic activity have been shown to be activated during withdrawal from most drug of abuse and it has been hypothesized that the interaction of CRF/NA may be a stress mechanism contributing to the development of addiction [39, 55]. Given that TH is phosphorylated on a specific serine residue (Ser31) by the ERK [151], it is possible that activation of ERK provides a way in which TH is regulated under morphine dependence. Together, all these findings suggest that morphine withdrawal might stimulates the activity of noradrenergic pathways innervating the PVN by means of increased ERK activity, which agree with other finding showing that morphine increases ERK phosphorylation in the

VTA, which, in turn, contributes to drug-induced increases in TH expression [184].

3. Regulation of Ser31 and Ser40 TH phosphorylation during morphine withdrawal in the hypothalamic PVN and NTS-A₂ cell group. Role of ERK_{1/2}

A variety of physiological stressors stimulates catecholamine synthesis through regulatory effects on TH. Short-term regulation of catecholamine biosynthesis occurs through phosphorylation of TH, which enhances enzymatic activity, whereas long-term regulation is achieved through changes in the level of TH protein [151, 185]. TH activity is directly regulated by phosphorylation at Ser31 and Ser40 [149, 151]. Changes in the state of phosphorylation of TH are critically involved in the regulation of catecholamine synthesis. In particular, increases in the phosphorylation of Ser31 and Ser40 accelerate TH activity, thereby stimulating production of neurotransmitter [149].

Previous results from this laboratory have shown that activation of noradrenergic terminals innervating the PVN modulates the HPA axis activity in response to morphine withdrawal. Thus, morphine withdrawal but not chronic morphine treatment increases NA turnover and c-Fos expression in the PVN concomitantly with an increase in corticosterone secretion as well as the activity of NTS TH-positive neurons (as reflected by c-Fos expression; [74])[70, 73]. These effects were inhibited by adrenoceptor antagonists, which indicates that the hyperactivity of the axis during morphine withdrawal is mediated via a stimulatory noradrenergic pathway [111]. Additionally, we reported that morphine withdrawal is associated with an increase in TH enzymatic activity in the PVN, a projection area of noradrenergic neurons arising from NTS-A₂ [75].

However, the identities of the TH Ser residues that are phosphorylated during morphine withdrawal are not well characterized.

In the present study, we have shown that naloxone-induced morphine withdrawal greatly increased the level of TH phosphorylation at Ser31 in rat PVN, concomitantly with enhanced TH activity. We also found that morphine withdrawal increased levels of TH phosphorylated at Ser31 in the NTS. Together, these data suggest that Ser31 phosphorylation of TH may be an important modulator of TH activity during naloxone induced-morphine withdrawal and might be directly involved with regulating NA turnover in morphine-withdrawn rats.

It is well known that phosphorylation of Ser40 results in a considerable increase in TH activity [149]. Association of Ser40 phosphorylation with TH activity and catecholamine synthesis *in vivo* has been shown. Striatal Ser40 phosphorylation was increased concomitantly with enhanced TH activity and DOPA biosynthesis [186]. However, TH activation has been shown to occur in absence of Ser40 phosphorylation [187]. In the present work, similar number TH Ser40-positive cells was seen in the NTS from control and from morphine dependent rats. Additionally, no changes in pSer40 TH levels were found in the PVN from morphine-withdrawn rats. From these results, one is tempted to suggest that Ser40 phosphorylation is unlikely to be of major importance in the activation of TH by morphine withdrawal, although it might play a role in maintaining activity under basal conditions. Present data are in agreement with recent findings suggesting that sustained phosphorylation of TH at Ser40 could be the mechanism for maintenance of catecholamine synthesis in order to replace those released in response to nerve stimulation [188].

In the present study it should be noted that TH protein expression was increased in NTS in morphine dependent rats, suggesting that the effect of morphine is mediated through both the activation (via phosphorylation) of TH and the up-regulation of its expression, which is in agreement with previous results from this laboratory [75]. It is well known that the regulation of TH enzyme through levels and activity represents the central means for controlling the synthesis of catecholamine. There is now evidence that TH protein levels and activity can be regulated by two different categories: short-term regulation of enzyme activity (e.g. enzymatic phosphorylation) and medium- to long-term regulation of gene expression (transcriptional regulation; [149, 185]). One of the most consistent biochemical changes seen in response to chronic morphine exposure is up-regulation of TH [12, 189]. In the LC, chronic morphine administration has been shown to increase levels of TH immunoreactivity, which could be expected to increase the capacity of these neurons to synthesize NA [1]. In addition, it has been proposed that drugs that perturb catecholaminergic function can induce changes in the TH mRNA and protein expression. Thus, morphine and cocaine increases TH immunoreactivity in dopaminergic brain reward regions.

An AP-1 sequence has been identified in the TH gene [190]. Because both cocaine and morphine induced the expression of Fos, it has been hypothesized that this transcription factor augments TH transcription by binding to the AP-1 site [185]. Additionally, it has been proposed that GC represent one of several different classes of hormones that regulate levels of TH mRNA. Thus, TH protein and mRNA were shown to be increased by GC [191, 192]. Moreover, a GC regulatory element (GRE) is postulated to exist in the TH gene [185]. According to the present results showing an increase in ACTH and corticosterone release, previous findings from our laboratory have

demonstrated that morphine withdrawal produces a marked increase in plasma corticosterone levels [70, 158].

Together, all these data might suggest that morphine withdrawal could increase TH immunoreactivity levels in the NTS through c-Fos expression and through the increased corticosterone release, which agree with recent findings from this laboratory showing an increase in TH protein levels in the NTS-A₂ [75]. Similar results have also been shown in the LC and VTA, where chronic morphine upregulates TH immunoreactivity by a transcriptional mechanism [12, 189]. Our results also show increased TH immunoreactivity in the NTS from morphine dependent animals given saline instead naloxone. Since this treatment did induce neither c-Fos expression nor corticosterone release, our findings might suggest that post-transcriptional mechanisms could be responsible for the enhanced TH levels, as has been proposed for other brain areas [189].

As previously mentioned, it is well established that acute activity of TH is regulated by protein phosphorylation. Four serine residues, namely Ser8, 19, 31 and 40, located near N-terminal end of the protein, can be phosphorylated by a number of protein kinases. The only protein kinases reported to phosphorylate TH at Ser31 *in vitro* and *in vivo* were ERK_{1/2} [151]. Phosphorylation of TH at only Ser31 *in situ* increases TH activity and catecholamine synthesis [149]. Given that TH is phosphorylated on a specific Ser residue (Ser31) by the ERKs, and we have shown that during morphine withdrawal there is an increase in ERK_{1/2} activation, it is possible that activation of ERK_{1/2} provides a way in which TH is regulated under morphine dependence.

In the present study, we therefore utilized the MEK inhibitor SL327 to check the involvement of ERK_{1/2} in the TH phosphorylation at Ser31 during morphine withdrawal. We found that treatment with 100 mg/kg (a dose that selectively blocks MEK; [193]) decreased the morphine withdrawal stimulation of Ser31 phosphorylation in the PVN and abolished this stimulation in the NTS. These data suggest that morphine withdrawal induced an activation of ERKs, which results in enhanced Ser31 phosphorylation. Whereas TH pSer31 immunoreactivity returned to basal levels in the NTS, the MEK inhibitor did not reduce TH pSer31 immunoreactivity to baseline in the PVN. ERK activation, and then TH phosphorylation is well documented to involve both a raf-MEK-dependent and a raf-MEK-independent pathways [194, 195]. Thus, phorbol esters, which are activators of PKC, elicit phosphorylation of TH at Ser31, suggesting that ERK can be activated in a PKC-dependent manner [150, 195]. Additionally, it has been shown that, although PKC does not directly phosphorylate Ser31, it does trigger modification of the site by other kinases [185]. Given that Ser31 phosphorylation of TH in the PVN was not totally reversed by the MEK inhibitor, it is tempting to suggest that morphine withdrawal achieves this phosphorylation, at least in part, via a PKC-dependent activation of ERK_{1/2}.

Consistent with previous results [111], present data show that morphine withdrawal produced corticosterone and ACTH hypersecretion. Whereas data presented here clearly indicate that morphine withdrawal increases Ser31 phosphorylation and that this is probably mediated in part by a MEK activation of ERK_{1/2}, MEK activation does not appear to be necessary for the withdrawal-induced increase in the secretor activity of the HPA axis. Thus, the MEK inhibitor SL327 did not block the increase in corticosterone and ACTH release in response to morphine withdrawal, leaving us to conclude that the secretor activity of the HPA axis following morphine withdrawal is most likely because

of other signalling pathways. Previous reports from our laboratory indicate that inhibition of PKC significantly blocked the corticosterone secretion during morphine withdrawal [196]. These findings are consistent with the observation that PKC is up-regulated in the PVN during morphine dependence and may suggest that PKC activity is necessary for the increased HPA axis activity during morphine withdrawal [15].

In conclusion, the present study suggests that morphine withdrawal might stimulate TH activity and accelerate NA turnover in the PVN via a mechanism involving activation of ERKs and phosphorylation of TH at Ser31, which agree with other findings showing that morphine increases ERK phosphorylation in the VTA, which, in turn, contributes to drug-induced increases in TH expression [184]. In addition, morphine withdrawal appears to stimulate the secretor activity of the HPA axis in a MEK-ERK independent manner.

4. Influence of adrenalectomy on TH mRNA expression, phosphorylation and enzymatic activity in the NTS during morphine dependence and withdrawal

The HPA axis is the common pathway activated by addictive drugs and stress. Evidence has demonstrated that the GR is a major substrate for drug abuse [197]. For example, a role for GC has been proposed in drug-seeking behavior [198], but the exact contribution of the HPA axis to stress-driven drug use remains unclear. GC exert their feedback effects not only by inhibiting the secretion of CRF in the PVN, but also by modulating neuronal inputs to the PVN in the central stress pathways [152]. An important target of the GC action is the noradrenergic pathways from the brain stem (NTS-A₂). These pathways are activated by stress [103, 199] and mediate the release of CRF and ACTH

through stimulation of adrenoceptors [200]. Given the prominent role of NTS in morphine withdrawal responsiveness at PVN level, it is important to determine whether the depletion of GC regulates TH function in the NTS-A₂.

In agreement with previous results [201], sham adrenalectomized, morphine-dependent rats gained significantly less weight than placebo-implanted controls that might be due to the reduced food intake observed in these animals. Interestingly, the changes in body weight of our animals with continuous release morphine pellets are similar to that reported after intermittent morphine treatment [159], where the reduced weight gain has been communicated as a result of chronic stress associated with repeated withdrawal. Food intake and body weight gain of adrenalectomized rats was significantly reduced compared to sham operated controls confirming the orexigenic/adipogenic action of GC hormones [202, 203]. Morphine dependence in ADX animals further reduced the weight gain and food intake.

Ongoing drug use in an opiate-addicted individual could be reinforced by withdrawal reactions that occur when drug use is halted abruptly [5, 57]. Increased NA in the brain has long been implicated in opioid dependence [100] and also for the avoidance behaviors after occurrence of withdrawal reactions [204, 205]. In addition, the ventral noradrenergic bundle, which innervates the hypothalamus and extended amygdala, underlie NA ability to impinge upon brain system that control multiple aspects of drug addiction, including sensitization, reward and relapse [97, 205] However, little is known about endogenous factors that regulate noradrenergic neurons function during opioid withdrawal.

Basal TH expression is dependent on a number of transcriptional regulators. The CRE and the AP-1 sites and other within the most proximal

gene promoter participate in basal expression of TH in the brain [206]. Moreover, a GRE sequence is postulated to exist in the TH gene [185]. Additionally, it has been proposed that GC represent one of several different classes of hormones that regulate levels of TH mRNA. Thus, TH protein and mRNA were shown to be increased by GC [191, 192]. Present results show elevated plasma GC level in sham-operated rats after naloxone-induced morphine withdrawal, which parallel with enhanced TH mRNA levels in the NTS-A₂, suggesting that TH expression is controlled by transcriptional regulation. Similar results have also been shown in the LC and VTA, in which chronic morphine up-regulates TH immunoreactivity by a transcriptional mechanism [12, 189]. In addition, our data show that adrenalectomy did not induce significant increases in the in situ expression of TH mRNA. This finding clearly suggests that GC affect the mRNA expression in the noradrenergic A₂ cell group.

Although GRs stimulation is known to increase TH gene transcription, the mechanisms have not been elucidated. Sequence with homology to the canonical GRE has been identified in the TH promoter region of several species [185]. Brainstem NA cell groups express high levels of GRs [120, 207] and it has been shown that GC have a permissive role in noradrenergic neurotransmission [208]. We have recently shown that an intact PVN noradrenergic transmission is critical for morphine withdrawal-induced activation of the HPA axis.

Present results show that ADX/C rats failed to show elevated TH mRNA expression or TH protein levels in the NTS, suggesting that elevated corticosterone levels, because of opioid withdrawal, were necessary for morphine withdrawal-induced increased TH transcription and levels. In accordance with our results, previous findings have shown that suppression of GRs modifies mRNA responses to cocaine [209].

In the present work, we have found that many NA neurons of the A₂ cell group from sham-operated rats were stimulated 2 h after naloxone-induced morphine withdrawal, as revealed by an increase in the levels of TH phosphorylated at Ser31. Concomitantly, there was an enhanced TH activity at the PVN level. The findings that in ADX/C rats the number of neurons phosphorylated at Ser 31 did not change during morphine withdrawal, beside the fact that TH activity was reduced, indicate that GC may stimulate noradrenergic pathways innervating the PVN through an increase in TH phosphorylation at Ser31. We have observed that naloxone-induced morphine withdrawal increases phosphorylated ERK_{1/2} in the rat NTS neurons, indicating that this treatment increased ERK activity. Moreover, treatment with the MEK inhibitor SL327 decrease ERK activation and abolishes the morphine withdrawal stimulation of TH Ser31 phosphorylation and c-Fos expression in the NTS. Recently, it has been shown that ERK are crucial for some molecular actions of GC [210, 211]. Taken together, these data might suggest a role of ERK on TH activation during elevated GC levels

In conclusion, present evidence suggests that TH mRNA expression in the NTS-A₂ area might be regulated by circulating GC during morphine withdrawal. Because of this, there was no change in either TH phosphorylation (activation) in the NTS or TH activity in the PVN in ADX/C rats. This up-regulation of TH expression and catalytic activity in sham-operated rats would be expected to increase the capacity of noradrenergic neurons to synthesize NA, which then could contribute to the dramatic increase in NA turnover in the PVN and to the associated HPA axis activity.

CONCLUSIONS

1. According to previous data, present study shows an activation of the HPA axis during morphine withdrawal. Cocomitantly, it was observed a marked activation of the PVN (as revealed by c-Fos expression) and robust increases in CRF and AVP hnRNAs in the parvocellular part of the PVN. These results indicate that activation of HPA axis during morphine withdrawal involves induction of stress-related neuropeptides genes, CRF and AVP.
2. Present results show that noradrenergic neurons from NTS-A₂ (which innervates the PVN) are stimulated during morphine withdrawal. In addition, widespread neuron activation of limbic areas that are in position to drive HPA axis were also stimulated. These mechanisms would contribute to the facilitated stress reponse seen in morphine-withdrawn rats.
3. Activated ERK_{1/2} were colocalized with c-Fos in the PVN and NTS-A₂. This activation was found in CRF- and TH-positive neurons in the PVN and NTS-A₂, respectively. These responses were blocked by SL327, that prevents the ERK activation. These results suggest that activated ERK_{1/2} might be involved in morphine withdrawal-induced activation of brain areas associated with the stress system.
4. Morphine withdrawal phosphorylates TH at Ser31 but not at Ser40 in the PVN and NTS-A₂, which was associated with both an increase in total TH in NTS-A₂ and enhanced TH enzymatic activity in the PVN. Inhibition of ERK_{1/2} activation reduces phosphorylation of TH at Ser31.

These results suggest that morphine withdrawal increases NA turnover in the PVN via ERK_{1/2}-dependent phosphorylation of TH at Ser31.

5. Increased TH mRNA induction in the NTS-A₂ was found after naloxone-induced morphine withdrawal, suggesting that TH expression is controlled by transcriptional regulation.

6. ADX/C rats failed to show elevated mRNA expression or TH protein levels in the NTS-A₂ from morphine-withdrawn rats. In addition, the finding that in ADX/C rats the number of TH pSer31 positive neurons in the NTS did not change during morphine withdrawal, besides with the fact that TH activity in the PVN was reduced, suggest that GC may have a permissive role in the activation of noradrenergic pathways innervating the PVN.

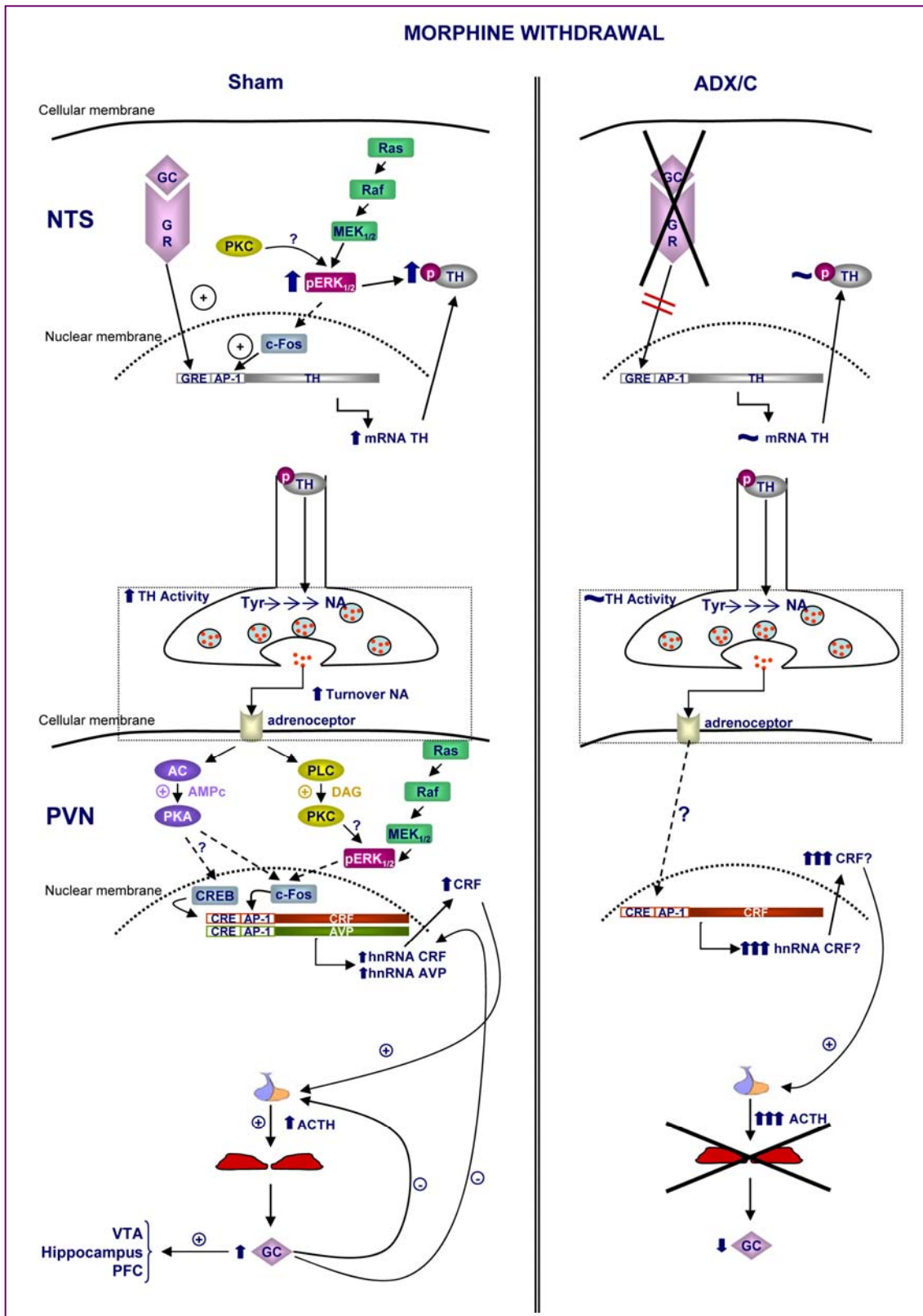


Figure 18. Eschematic representation of changes in the hypothalamic stress system and NTS-A2 during morphine withdrawal.

REFERENCES

1. **Koob GF, Le Moal M** (2005) Plasticity of reward neurocircuitry and the 'dark side' of drug addiction. *Nat Neurosci* 8: 1442-1444
2. **Kalivas PW, O'Brien C** (2008) Drug Addiction as a Pathology of Staged Neuroplasticity. *Neuropsychopharmacology* 33: 166-180
3. **Gill K, Amit Z, Koe BK** (1988) Treatment with sertraline, a new serotonin uptake inhibitor, reduces voluntary ethanol consumption in rats. *Alcohol* 5: 349-354
4. **Cami J, Farre M** (2003) Drug Addiction. *N Engl J Med* 349: 975-986
5. **Koob GF, Le Moal M** (2001) Drug addiction, dysregulation of reward and allostasis. *Neuropsychopharmacology* 24: 97-129
6. **Cleck JN, Blendy JA** (2008) Making a bad thing worse: adverse effects of stress on drug addiction. *J Clin Invest* 118: 454-461
7. **Le Moal M, Koob GF** (2007) Drug addiction: Pathways to the disease and pathophysiological perspectives. *European Neuropsychopharmacology* 17: 377-393
8. **Nestler EJ, Aghajanian GK** (1997) Molecular and cellular basis of addiction. *Science* 278: 58-63
9. **Liu JG, Anand KJ** (2001) Protein kinases modulate the cellular adaptations associated with opioid tolerance and dependence. *Brain Res Brain Res Rev* 38: 1-19
10. **Williams JT, Christie MJ, Manzoni O** (2001) Cellular and synaptic adaptations mediating opioid dependence. *Physiological Rev* 81: 299-343
11. **Nestler EJ** (2004) Molecular mechanisms of drug addiction. *Neuropharmacology* 47: 24-32
12. **Nestler EJ** (1992) Molecular mechanism of drug addiction. *J Neurosci* 12: 2439-2450
13. **Benavides M, Laorden ML, Milanes MV** (2005) Involvement of 3',5'-cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase in regulation of Fos expression and tyrosine hydroxylase levels during morphine withdrawal in the hypothalamic paraventricular nucleus and medulla oblongata catecholaminergic cell groups. *J Neurochem* 92: 246-254
14. **Ventayol P, Busquets X, Garcia-Sevilla JA** (1997) Modulation of immunoreactive protein kinase C-alpha and beta isoforms and G proteins by acute and chronic treatments with morphine and other opiate drugs in rat brain. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 355: 491-500
15. **Benavides M, Laorden ML, Marin MT, Milanes MV** (2005) Role of PKC-alpha, gamma isoforms in regulation of c-Fos and TH expression after naloxone-induced morphine withdrawal in the hypothalamic PVN and medulla oblongata catecholaminergic cell groups. *J Neurochem* 95: 1249-1258
16. **Eitan S, Bryant CD, Saliminejad N, Yang YC, Vojdani E, Keith D, Jr., Polakiewicz R, Evans CJ** (2003) Brain Region-Specific Mechanisms for Acute Morphine-Induced

- Mitogen-Activated Protein Kinase Modulation and Distinct Patterns of Activation during Analgesic Tolerance and Locomotor Sensitization. *J Neurosci* 23: 8360-8369
17. **Mazzucchelli C, Vantaggiato C, Krezel W, Welzl H, Wolfer D, Pagès G, Valverde O** (2002) Knockout of ERK1 MAP Kinase Enhances Synaptic Plasticity in the Striatum and Facilitates Striatal-Mediated Learning and Memory. *Neuron* 34: 807-820
 18. **Cao JL, He JH, Ding HL, Zeng YM** (2005) Activation of the spinal ERK signalling pathways contributes naloxone-precipitated withdrawal in morphine dependents rats. *Pain* 118: 336-349
 19. **Valjent E, Pages C, Herve D, Girault JA, Caboche J** (2004) Addictive and non-addictive drugs induce distinct and specific patterns of ERK activation in mouse brain. *Eur J Neurosci* 19: 1826-1836
 20. **Shaywitz AJ, Greenberg ME** (1999) CREB: A Stimulus-Induced Transcription Factor Activated by A Diverse Array of Extracellular Signals. *Annual Review of Biochemistry* 68: 821-861
 21. **Mayr B, Montminy M** (2001) Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2: 599-609
 22. **Chao J, Nestler EJ** (2004) Molecular Neurobiology of Drug Addiction. *Annual Review of Medicine* 55: 113-132
 23. **Lonze BE, Ginty DD** (2002) Function and Regulation of CREB Family Transcription Factors in the Nervous System. *Neuron* 35: 605-623
 24. **Barrot M, Olivier JDA, Perrotti LI, DiLeone RJ, Berton O, Eisch AJ, Impey S, Storm DR, Neve RL, Yin JC, Zachariou V, Nestler EJ** (2002) CREB activity in the nucleus accumbens shell controls gating of behavioral responses to emotional stimuli. *PNAS* 99: 11435-11440
 25. **Self DW** (1998) Neural substrates of drug craving and relapse in drug addiction. *Annals Med* 30: 379-389
 26. **Carlezon WA, Jr., Thome J, Olson VG, Lane-Ladd SB, Brodtkin ES, Hiroi N, Duman RS, Neve RL, Nestler EJ** (1998) Regulation of Cocaine Reward by CREB. *Science* 282: 2272-2275
 27. **Cole RL, Konradi C, Douglass J, Hyman SE** (1995) Neuronal adaptation to amphetamine and dopamine: Molecular mechanisms of prodynorphin gene regulation in rat striatum. *Neuron* 14: 813-823
 28. **Goodman A** (2008) Neurobiology of addiction. An integrated review. *Biochem Pharmacol* 75: 266-322
 29. **Maldonado R, Blendy JA, Tzavara E, Gass P, Roques BP, Haoune J, Schütz G** (1996) Reduction of morphine abstinence in mice with a mutation in the gene encoding CREB. *Science* 273: 657-659

30. **Mumberg D, Lucibello FC, Schuermann M, Muller R** (1991) Alternative splicing of fosB transcripts results in differentially expressed mRNAs encoding functionally antagonistic proteins. *Genes Dev* 5: 1212-1223
31. **Hope BT, Kelz MB, Duman RS, Nestler EJ** (1994) Chronic electroconvulsive seizure (ECS) treatment results in expression of a long-lasting AP-1 complex in brain with altered composition and characteristics. *J Neurosci* 14: 4318-4328
32. **Chen J, Kelz MB, Hope BT, Nakabeppu Y, Nestler EJ** (1997) Chronic Fos-Related Antigens: Stable Variants of Delta FosB Induced in Brain by Chronic Treatments. *J Neurosci* 17: 4933-4941
33. **Moratalla R, Elibol B, Vallejo M, Graybiel AM** (1996) Network-Level Changes in Expression of Inducible Fos-Jun Proteins in the Striatum during Chronic Cocaine Treatment and Withdrawal. *Neuron* 17: 147-156
34. **Hiroi N, Brown JR, Haile CN, Ye H, Greenberg ME, Nestler EJ** (1997) FosB mutant mice: Loss of chronic cocaine induction of Fos-related proteins and heightened sensitivity to cocaine's psychomotor and rewarding effects. *PNAS* 94: 10397-10402
35. **Hughes P, Dragunow M** (1995) Induction of immediate-early genes and the control of neurotransmitter-regulated gene expression within the nervous system. *Pharmacol Rev* 47: 133-178
36. **Kovács K** (1998) c-Fos as a transcription factor: a stressful (re)view from a functional map. *Neurochem Int* 33: 287-297
37. **Sabban EL, Hiremagalur B, Nankova B, Kvetnanský R** (1995) Molecular biology of stress-elicited induction of catecholamine biosynthetic enzymes. *Ann N Y Acad Sci* 771: 327-338
38. **McClung CA, Nestler EJ** (2008) Neuroplasticity Mediated by Altered Gene Expression. *Neuropsychopharmacology* 33: 3-17
39. **Koob GF, Le Moal M** (2008) Addiction and the brain antireward system. *Ann Rev Physiol* 59: 29-53
40. **Koob GF** (2003) Neuroadaptive mechanisms of addiction: studies on the extended amygdala. *European Neuropsychopharmacology* 13: 442-452
41. **Koob GF** (2006) The neurobiology of addiction: a neuroadaptational view relevant for diagnosis. *Addiction* 101: 23-30
42. **Kreek MJ, Koob GF** (1998) Drug dependence: stress and dysregulation of brain reward pathways. *Drug Alcohol Depend* 51: 23-47
43. **Olive MF, Koenig HN, Nannini MA, Hodge CW** (2002) Elevated extracellular CRF levels in the bed nucleus of the stria terminalis during ethanol withdrawal and reduction by subsequent ethanol intake. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 72: 213-220
44. **Martínez-Piñero MG, Milanés MV, Alcaraz C, Vargas ML** (1994) Catecholaminergic mediation of morphine-induced activation of pituitary-adrenocortical axis in the rat: implication of α - and β -adrenoceptors. *Brain Res* 668: 122-128

45. **Roy A, Pandey SC** (2002) The Decreased Cellular Expression of Neuropeptide Y Protein in Rat Brain Structures During Ethanol Withdrawal After Chronic Ethanol Exposure. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* 26: 796-803
46. **Kalivas PW, Volkow ND** (2005) The Neural Basis of Addiction: A Pathology of Motivation and Choice. *Am J Psychiatry* 162: 1403-1413
47. **Everitt BJ, Cardinal RN, Parkinson JA, Robbins TW** (2003) Appetitive Behavior: Impact of Amygdala-Dependent Mechanisms of Emotional Learning. *Ann NY Acad Sci* 985: 233-250
48. **Melis M, Spiga S, Diana M** (2005) The Dopamine Hypothesis of Drug Addiction: Hypodopaminergic State. In: Ronald JB (ed). *International Review of Neurobiology*. Academic Press, 101-154
49. **Nestler EJ** (2005) Is there a common molecular pathway for addiction? *Nat Neurosci* 8: 1445-1449
50. **Feltenstein MW, See RE** (2008) The neurocircuitry of addiction: an overview. *Br J Pharmacol* 154: 261-274
51. **Heidbreder C** (2005) Novel pharmacotherapeutic targets for the management of drug addiction. *European Journal of Pharmacology* 526: 101-112
52. **Hyman SE, Malenka RC** (2001) Addiction and the brain: The neurobiology of compulsion and its persistence. *Nat Rev Neurosci* 2: 695-703
53. **Kalivas PW** (2005) How do we determine which drug-induced neuroplastic changes are important? *Nat Neurosci* 8: 1440-1441
54. **Volkow ND, Fowler JS, Wang GJ** (2003) Positron emission tomography and single-photon emission computed tomography in substance abuse research. *Seminars in Nuclear Medicine* 33: 114-128
55. **Koob GF** (1999) Stress, corticotropin-releasing factor, and drug addiction. *Ann N Y Acad Sci* 897: 27-45
56. **Koob G, Kreek MJ** (2007) Stress, Dysregulation of Drug Reward Pathways, and the Transition to Drug Dependence. *Am J Psychiatry* 164: 1149-1159
57. **Koob GF, Moal ML** (1997) Drug Abuse: Hedonic Homeostatic Dysregulation. *Science* 278: 52-58
58. **Weiss F, Ciccocioppo R, Parsons LH, Katner S, Liu X, Zorrilla EP, Valdez GR, Ben-Shahar O, Angeletti S, Richter RR** (2001) Compulsive Drug-Seeking Behavior and Relapse: Neuroadaptation, Stress, and Conditioning Factors. *Ann NY Acad Sci* 937: 1-26
59. **Vale W, Vaughan J, Smith M, Yamamoto G, Rivier J, Rivier C** (1983) Effects of synthetic ovine corticotropin-releasing factor, glucocorticoids, catecholamines, neurohypophysial peptides, and other substances on cultured corticotropic cells. *Endocrinology* 113: 1121-1131

60. **Makino S, Smith MA, Gold PW** (1995) Increased expression of corticotropin-releasing hormone and vasopressin messenger ribonucleic acid (mRNA) in the hypothalamic paraventricular nucleus during repeated stress: association with reduction in glucocorticoid receptor mRNA levels. *Endocrinology* 136: 3299-3309
61. **Kovács K, Sawchenko PE** (1996) Sequence of stress-induced alteration in indices of synaptic and transcriptional activation in parvocellular neurosecretory neurons. *J Neurosci* 16: 262-273
62. **Kovács KJ, Földes A, Sawchenko PE** (2000) Glucocorticoid negative feedback selectively targets vasopressin transcription in parvocellular neurosecretory neurons. *J Neurosci* 20: 3843-3852
63. **Swanson LW, Simmons DM** (1989) Differential steroid hormone and neural influences on peptide mRNA levels in CRH cells of the paraventricular nucleus: a hybridization histochemical study in the rat. *J Comp Neurol* 285: 413-435
64. **Elman I, Lukas SE, Karlsgodt KH, Gasic GP, Breiter HC** (2003) Acute cortisol administration triggers craving in individuals with cocaine dependence. *Psychopharmacol Bull* 37: 84-89
65. **Sinha R, Fuse T, Aubin LR, O'Malley SS** (2000) Psychological stress, drug-related cues and cocaine craving. *Psychopharmacology* 152: 140-148
66. **Piazza PV, Le Moal M** (1998) The role of stress in drug self-administration. *Trends in Pharmacological Sciences* 19: 67-74
67. **Saal D, Dong Y, Bonci A, Malenka RC** (2003) Drugs of Abuse and Stress Trigger a Common Synaptic Adaptation in Dopamine Neurons. *Neuron* 37: 577-582
68. **Barrot M, Marinelli M, Abrous DN, Rouge-Pont F, Le Moal M, Piazza PV** (2000) The dopaminergic hyper-responsiveness of the shell of the nucleus accumbens is hormone-dependent. *Eur J Neurosci* 12: 973-979
69. **Marinelli M, Aouizerate B, Barrot M, Le Moal M, Piazza PV** (1998) Dopamine-dependent responses to morphine depend on glucocorticoid receptors. *PNAS* 95: 7742-7747
70. **Fuertes G, Laorden ML, Milanés MV** (2000) Noradrenergic and dopaminergic activity in the hypothalamic paraventricular nucleus after naloxone-induced morphine withdrawal. *Neuroendocrinology* 71: 60-67
71. **Laorden ML, Castells MT, Martínez MD, Martínez PJ, Milanés MV** (2000) Activation of c-fos expression in hypothalamic nuclei by mu- and kappa-receptor agonists. Correlation with catecholaminergic activity in the hypothalamic paraventricular nucleus. *Endocrinology* 141: 1366-1376
72. **Martínez PJ, Laorden ML, Cerezo M, Martínez-Piñero MG, Milanés MV** (2001) Characterization of the signal transduction pathways mediating morphine withdrawal-stimulated c-fos expression in hypothalamic nuclei. *Eur J Pharmacol* 430: 59-68

73. **Laorden ML, Castells MT, Milanés MV** (2002) Effects of morphine and morphine withdrawal on brainstem neurons innervating hypothalamic nuclei that control the pituitary-adrenocortical axis in rats. *Br J Pharmacol* 136: 67-75
74. **Laorden ML, Núñez C, Almela P, Milanés MV** (2002) Morphine withdrawal-induced c-fos expression in the hypothalamic paraventricular nucleus is dependent on the activation of catecholaminergic neurones. *J Neurochem* 83: 132-140
75. **Benavides M, Laorden ML, García-Borrón JC, Milanés MV** (2003) Regulation of tyrosine hydroxylase levels and activity and Fos expression during opioid withdrawal in the hypothalamic PVN and medulla oblongata catecholaminergic cell groups innervating the PVN. *Eur J Neurosci* 17: 103-112
76. **Milanés MV, Laorden ML, Angel E, Tankosic P, Burlet A** (2002) Effect of naloxone-precipitated morphine withdrawal on CRH and vasopressin mRNA expression in the rat hypothalamic paraventricular nucleus. *Neuroscience Letters* 334: 58-62
77. **Lightman SL, Young WS** (1988) Corticotrophin-releasing factor, vasopressin and pro-opiomelanocortin mRNA responses to stress and opiates in the rat. *J Physiol* 403: 511-523
78. **Harbuz M, Russell JA, Sumner BEH, Kawata M, Lightman SL** (1991) Rapid changes in the content of proenkephalin A and corticotrophin releasing hormone mRNAs in the paraventricular nucleus during morphine withdrawal in urethane-anesthetized rats. *Mol Brain Res* 9: 285-291
79. **McNally GP, Akil H** (2002) Role of corticotropin-releasing hormone in the amygdala and bed nucleus of the stria terminalis in the behavioral, pain modulatory, and endocrine consequences of opiate withdrawal. *Neuroscience* 112: 605-617
80. **Houshyar H, Gomez F, Manalo S, Bhargava A, Dallman MF** (2003) Intermittent Morphine Administration Induces Dependence and is a Chronic Stressor in Rats. *Neuropsychopharmacology* 28: 1960-1972
81. **Petrusz P, Merchenthaler I** (1992) The corticotropin-releasing factor system. In: Nemeroff CB (ed). *Neuroendocrinology*. CRC Press, Boca Raton:129-183
82. **Koob GF, Heinrichs SC** (1999) A role for corticotropin releasing factor and urocortin in behavioral responses to stressors. *Brain Res* 848: 141-152
83. **Caine SB, Heinrichs SC, Coffin VL, Koob GF** (1995) Effects of the dopamine D-1 antagonist SCH 23390 microinjected into the accumbens, amygdala or striatum on cocaine self-administration in the rat. *Brain Res* 692: 47-56
84. **Epping-Jordan MP, Markou A, Koob GF** (1998) The dopamine D-1 receptor antagonist SCH 23390 injected into the dorsolateral bed nucleus of the stria terminalis decreased cocaine reinforcement in the rat. *Brain Res* 784: 105-115
85. **Pontieri FE, Tanda G, Chiara GD** (1995) Intravenous Cocaine, Morphine, and Amphetamine Preferentially Increase Extracellular Dopamine in the "Shell" as Compared with the "Core" of the Rat Nucleus Accumbens. *PNAS* 92: 12304-12308
86. **Pontieri FE, Tanda G, Orzi F, Chiara GD** (1996) Effects of nicotine on the nucleus accumbens and similarity to those of addictive drugs. *Nature* 382: 255-257

87. **Funk D, Li Z, Le AD** (2006) Effects of environmental and pharmacological stressors on c-fos and corticotropin-releasing factor mRNA in rat brain: Relationship to the reinstatement of alcohol seeking. *Neuroscience* 138: 235-243
88. **Pich EM, Lorang M, Yeganeh M, Rodriguez de Fonseca F, Raber J, Koob GF, Weiss F** (1995) Increase of extracellular corticotropin-releasing factor-like immunoreactivity levels in the amygdala of awake rats during restraint stress and ethanol withdrawal as measured by microdialysis. *J Neurosci* 15: 5439-5447
89. **Zorrilla EP, Koob GF** (2004) The therapeutic potential of CRF1 antagonists for anxiety. *Expert Opinion on Investigational Drugs* 13: 799-828
90. **Specio S, Wee S, O'Dell LE, Boutrel B, Zorrilla E, Koob G** (2008) CRF1 receptor antagonists attenuate escalated cocaine self-administration in rats. *Psychopharmacology* 196: 473-482
91. **George O, Ghozland S, Azar MR, Cottone P, Zorrilla EP, Parsons LH, O'Dell LE, Richardson HN, Koob GF** (2007) CRF CRF1 system activation mediates withdrawal-induced increases in nicotine self-administration in nicotine-dependent rats. *PNAS* 104: 17198-17203
92. **Palmiter RD, Erickson JC, Hollopeter G, Baraban SC, Schwartz MW** (1998) Life without neuropeptide Y. *Recent Prog Horm Res* 53: 163-199
93. **Heilig M, Koob GF, Ekman R, Britton KT** (1994) Corticotropin-releasing factor and neuropeptide Y: role in emotional integration. *Trends in Neurosci* 17.: 80-85
94. **Auclair A, Blanc G, Glowinski J, Tassin JP** (2004) Role of serotonin_{2A} receptors in the d-amphetamine-induced release of dopamine: comparison with previous data on alpha_{1b}-adrenergic receptors. *Journal of Neurochemistry* 91: 318-326
95. **Grenhoff J, Svensson TH** (1993) Prazosin modulates the firing pattern of dopamine neurons in rat ventral tegmental area. *European Journal of Pharmacology* 233: 79-84
96. **Devoto P, Flore G, Saba P, Fa M, Gessa GL** (2005) Stimulation of the locus coeruleus elicits noradrenaline and dopamine release in the medial prefrontal and parietal cortex. *Journal of Neurochemistry* 92: 368-374
97. **Weinshenker D, Schroeder JP** (2006) There and Back Again: A Tale of Norepinephrine and Drug Addiction. *Neuropsychopharmacology* 32: 1433-1451
98. **Le AD, Harding S, Juzysch W, Funk D, Shaham Y** (2005) Role of alpha-2 adrenoceptors in stress-induced reinstatement of alcohol seeking and alcohol self-administration in rats. *Psychopharmacology* 179: 366-373
99. **Drouin C, Darracq L, Trovero F, Blanc G, Glowinski J, Cotecchia S, Tassin JP** (2002) Alpha 1b-Adrenergic Receptors Control Locomotor and Rewarding Effects of Psychostimulants and Opiates. *J Neurosci* 22: 2873-2884
100. **Maldonado R** (1997) Participation of noradrenergic pathways in the expression of opiate withdrawal: biochemical and pharmacological evidence. *Neurosci Biobehav Rev* 1: 91-104

101. **Fuertes G, Milanés MV, Rodríguez-Gago M, Marín MT, Laorden ML** (2000) Changes in hypothalamic paraventricular nucleus catecholaminergic activity after acute and chronic morphine administration. *Eur J Pharmacol* 388: 49-56
102. **Dunn AJ, Swiergiel AH** (2008) The role of corticotropin-releasing factor and noradrenaline in stress-related responses, and the inter-relationships between the two systems. *European Journal of Pharmacology* 583: 186-193
103. **Pacak K, Palkovits M, Kopin IJGDS** (1995) Stress-induced norepinephrine release in the hypothalamic paraventricular nucleus and pituitary-adrenocortical and sympathoadrenal activity: in vivo microdialysis studies. *Front Neuroendocrinol* 16: 89-150
104. **Quirarte GL, Galvez R, Roozendaal B, McGaugh JL** (1998) Norepinephrine release in the amygdala in response to footshock and opioid peptidergic drugs. *Brain Res* 808: 134-140
105. **Raber J, Koob GF, Bloom FE** (1995) Interleukin-2 (IL-2) induces corticotropin-releasing factor (CRF) release from the amygdala and involves a nitric oxide-mediated signalling; comparison with the hypothalamic response. *J Pharmacol Exp Ther* 272: 815-824
106. **Sawchenko PE, Swanson LW** (1982) The organization of noradrenergic pathways from the brainstem to the paraventricular and supraoptic nuclei in the rat. *Brain Res Rev* 4: 275-325
107. **Cunningham ET, Sawchenko PE** (1988) Anatomical specificity of noradrenergic inputs to the paraventricular and supraoptic nuclei of the rat hypothalamus. *J Comp Neurol* 274: 60-76
108. **Cummings S, Seybold V** (1988) Relationship of alpha-1- and alpha-2-adrenergic binding sites to regions of the paraventricular nucleus of the hypothalamus containing corticotropin-releasing factor and vasopressin neurons. *Neuroendocrinology* 47: 523-532
109. **Daftary SS, Boudaba C, Tasker JG** (2000) Noradrenergic regulation of parvocellular neurons in the rat hypothalamic paraventricular nucleus. *Neuroscience* 96: 743-751
110. **Vargas ML, Martínez-Piñero MG, Milanés MV** (1997) Neurochemical activity of noradrenergic neurons and pituitary-adrenal response after naloxone-induced withdrawal: the role of calcium channels. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 355: 501-506
111. **Laorden ML, Fuertes G, González-Cuello A, Milanés MV** (2000) Changes in catecholaminergic pathways innervating paraventricular nucleus and pituitary-adrenal axis response during morphine dependence: implication of α_1 - and α_2 -adrenoceptors. *J Pharmacol Exp Ther* 293: 578-584
112. **Gray TS, Magnuson DJ** (1987) Neuropeptide neuronal efferents from the bed nucleus of the stria terminalis and central amygdaloid nucleus to the dorsal vagal complex in the rat. *J Comp Neurol* 262: 365-374
113. **Sinha R** (2007) The role of stress in addiction relapse. *Curr Psych Report* 9: 388-395
114. **Perrotti LI, Hadeishi Y, Ulery PG, Barrot M, Monteggia L, Duman RS, Nestler EJ** (2004) Induction of Δ FosB in Reward-Related Brain Structures after Chronic Stress. *J Neurosci* 24: 10594-10602

115. **Bilang-Bleuel A, Rech J, De Carli S, Holsboer F, Reul JMHM** (2002) Forced swimming evokes a biphasic response in CREB phosphorylation in extrahypothalamic limbic and neocortical brain structures in the rat. *Eur J Neurosci* 15: 1048-1060
116. **Ignar DM, Kuhn CM** (1990) Effects of specific Mu and Kappa opiate tolerance and abstinence on hypothalamo-pituitary-adrenal axis secretion in the rat. *J Pharmacol Exp Ther* 255: 1287-1295
117. **Borowsky B, Kuhn CM** (1993) GBR12909 stimulates hypothalamo-pituitary-adrenal activity by inhibition of uptake at hypothalamic dopaminergic neurons. *Brain Res* 613: 251-258
118. **Benwell ME, Balfour DJ** (1979) Effects of nicotine administration and its withdrawal on plasma corticosterone and brain 5-hydroxyindoles. *Psychopharmacology (Berl)* 63: 7-11
119. **Spencer RL, McEwen BS** (1990) Adaptation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis to chronic ethanol stress. *Neuroendocrinology* 52: 481-489
120. **Harfstrand A, Fuxe K, Cintra A, Agnati LF, Zini I, Wikstrom AC, Okret S, Yu ZY, Goldstein M, Steinbusch H, Verhofstad A, Gustafsson JA** (1986) Glucocorticoid Receptor Immunoreactivity in Monoaminergic Neurons of Rat Brain. *PNAS* 83: 9779-9783
121. **Piazza PV, Rougé-Pont F, Deminière JM, Kharoubi M, Le Moal M, Simon H** Dopaminergic activity is reduced in the prefrontal cortex and increased in the nucleus accumbens of rats predisposed to develop amphetamine self-administration. *Brain Res* 567: 169-174
122. **Piazza PV, Maccari S, Deminiere J, Moal ML, Mormede P, Simon H** (1991) Corticosterone Levels Determine Individual Vulnerability to Amphetamine Self-Administration. *PNAS* 88: 2088-2092
123. **Goeders NE** (1997) A neuroendocrine role in cocaine reinforcement. *Psychoneuroendocrinology* 22: 237-259
124. **Piazza PV, Moal ML** (1996) Pathophysiological Basis of Vulnerability to Drug Abuse: Role of an Interaction Between Stress, Glucocorticoids, and Dopaminergic Neurons. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 36: 359-378
125. **Schluger JH, Borg L, Ho A, Kreek MJ** (2001) Altered HPA axis responsivity to metyrapone testing in methadone maintained former heroin addicts with ongoing cocaine addiction. *Neuropsychopharmacology* 24: 568-575
126. **Kreek MJ, Raganath J, Plevy S, Hamer D, Schneider D** (1984) ACTH, cortisol and beta-endorphin response to metyrapone testing during chronic methadone maintenance treatment in humans. *Neuropeptides* 5: 277-278
127. **Sarnyai Z, Bíró E, Gardi J, Vecsernyés M, Julesz J, Telegdy G** (1995) Brain corticotropin-releasing factor mediates 'anxiety-like' behavior induced by cocaine withdrawal in rats. *Brain Res* 675: 89-97

128. **Rassnick S, Heinrichs SC, Britton KT, Koob GF** (1993) Microinjection of a corticotropin-releasing factor antagonist into the central nucleus of the amygdala reverses anxiogenic-like effects of ethanol withdrawal. *Brain Res* 605: 25-32
129. **Skelton KH, Oren D, Gutman DA, Easterling K, Holtzman SG, Nemeroff CB, Owens MJ** (2007) The CRF1 receptor antagonist, R121919, attenuates the severity of precipitated morphine withdrawal. *European Journal of Pharmacology* 571: 17-24
130. **Wang J, Fang Q, Liu Z, Lu L** (2006) Region-specific effects of brain corticotropin-releasing factor receptor type 1 blockade on footshock-stress- or drug-priming-induced reinstatement of morphine conditioned place preference in rats. *Psychopharmacology* 185: 19-28
131. **Gass JT, Olive MF** (2007) Reinstatement of Ethanol-Seeking Behavior Following Intravenous Self-Administration in Wistar Rats. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* 31: 1441-1445
132. **Kreibich AS, Blendy JA** (2004) cAMP Response Element-Binding Protein Is Required for Stress But Not Cocaine-Induced Reinstatement. *J Neurosci* 24: 6686-6692
133. **Zislis G, Desai TV, Prado M, Shah HP, Bruijnzeel AW** (2007) Effects of the CRF receptor antagonist d-Phe CRF(12-41) and the α_2 -adrenergic receptor agonist clonidine on stress-induced reinstatement of nicotine-seeking behavior in rats. *Neuropharmacology* 53: 958-966
134. **Erb S, Salmaso N, Rodaros D, Stewart J** (2001) A role for the CRF-containing pathway from central nucleus of the amygdala to bed nucleus of the stria terminalis in the stress-induced reinstatement of cocaine seeking in rats. A role for the CRF-containing pathway from central nucleus of the amygdala to bed nucleus of the stria terminalis in the stress-induced reinstatement of cocaine seeking in rats. *Psychopharmacology* 158: 360-365
135. **Erb S, Hitchcott PK, Rajabi H, Mueller D, Shaham Y, Stewart J** (2000) Alpha-2 adrenergic receptor agonists block stress-induced reinstatement of cocaine seeking. *Neuropsychopharmacology* 23: 138-150
136. **Lu L, Liu D, Ceng X** (2001) Corticotropin-releasing factor receptor type 1 mediates stress-induced relapse to cocaine-conditioned place preference in rats. *Eur J Pharmacol* 415: 203-208
137. **Shaham Y, Funk D, Erb S, Brown TJ, Walker CD, Stewart J** (1997) Corticotropin-Releasing Factor, But Not Corticosterone, Is Involved in Stress-Induced Relapse to Heroin-Seeking in Rats. *J Neurosci* 17: 2605-2614
138. **Shaham Y, Erb S, Leung S, Buczek Y, Stewart J** (1998) CP-154,526, a selective, non-peptide antagonist of the corticotropin-releasing factor1 receptor attenuates stress-induced relapse to drug seeking in cocaine- and heroin-trained rats. *Psychopharmacology* 137: 184-190
139. **Wang B, Shaham Y, Zitzman D, Azari S, Wise RA, You ZB** (2005) Cocaine Experience Establishes Control of Midbrain Glutamate and Dopamine by Corticotropin-Releasing Factor: A Role in Stress-Induced Relapse to Drug Seeking. *J Neurosci* 25: 5389-5396

140. **Wang JQ, Fibuch EE, Mao L** (2007) Regulation of mitogen-activated protein kinases by glutamate receptors. *J Neurochem* 100: 1-11
141. **Shaham Y, Highfield D, Delfs J, Leung S, Stewart J** (2000) Clonidine blocks stress-induced reinstatement of heroin seeking in rats: an effect independent of locus coeruleus noradrenergic neurons. *Eur J Neurosci* 12: 292-302
142. **Highfield D, Yap J, Grimm JW, Shalev U, Shaham Y** (2001) Repeated lofexidine treatment attenuates stress-induced, but not drug cues-induced reinstatement of a heroin-cocaine mixture (speedball) seeking in rats. *Neuropsychopharmacology* 25: 320-331
143. **Leri F, Flores J, Rodaros D, Stewart J** (2002) Blockade of Stress-Induced But Not Cocaine-Induced Reinstatement by Infusion of Noradrenergic Antagonists into the Bed Nucleus of the Stria Terminalis or the Central Nucleus of the Amygdala. *J Neurosci* 22: 5713-5718
144. **Aston-Jones G, Harris GC** (2004) Brain substrates for increased drug seeking during protracted withdrawal. *Neuropharmacology* 47: 167-179
145. **Nestler EJ** (2001) Molecular basis of long-term plasticity underlying addiction. *Nat Rev Neurosci* 2: 119-128
146. **Di Chiara G, Bassareo V** (2007) Reward system and addiction: what dopamine does and doesn't do. *Current Opinion in Pharmacology* 7: 69-76
147. **Kreek MJ, Nielsen DA, Butelman ER, LaForge KS** (2005) Genetic influences on impulsivity, risk taking, stress responsivity and vulnerability to drug abuse and addiction. *Nat Neurosci* 8: 1450-1457
148. **Sinha R, Garcia M, Paliwal P, Kreek MJ, Rounsaville BJ** (2006) Stress-Induced Cocaine Craving and Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Responses Are Predictive of Cocaine Relapse Outcomes. *Arch Gen Psychiatry* 63: 324-331
149. **Dunkley PR, Bobrovskaya L, Graham ME, von Nagy-Felsobuki EI, Dickson PW** (2004) Tyrosine hydroxylase phosphorylation: regulation and consequences. *J Neurochem* 91: 1025-1043
150. **Bobrovskaya L, Cheah TB, Bunn SJ, Dunkley PR** (1998) Tyrosine hydroxylase in bovine adrenal chromaffin cells: angiotensin-II-stimulated activity and phosphorylation of Ser19, Ser31, and Ser40. *J Neurochem* 70: 2565-2573
151. **Haycock JW** (1993) Multiple signaling pathways in bovine chromaffin cells regulate tyrosine hydroxylase phosphorylation at Ser¹⁹, Ser³¹ and Ser⁴⁰. *Neurochem Res* 18: 15-26
152. **Herman JP, Figueiredo H, Mueller NK, Ulrich-Lai Y, Ostrander MM, Choi DC, Cullinan WE** (2003) Central mechanisms of stress integration: hierarchical circuitry controlling hypothalamo-pituitary-adrenocortical responsiveness. *Front Neuroendocrinol* 24: 151-180
153. **Atkins CM, Selcher JC, Petraitis JJ, Trzaskos JM, Sweatt JD** (1998) The MAPK cascade is required for mammalian associative learning. *Nat Neurosci* 1: 602-609
154. **Paxinos G, Watson C** (1998) The rat brain in stereotaxic coordinates. Academic Press, San Diego, Fourth edn

155. **Palkovits M** (1973) Isolated removal of hypothalamic or other brain nuclei of the rat. *Brain Res* 59: 449-450
156. **Le Guen S, Gestreau C, Besson JM** (2003) Morphine withdrawal precipitated by specific mu, delta or kappa opioid receptor antagonists: a c-Fos protein study in the rat central nervous system. *Eur J Neurosci* 17: 2425-2437
157. **Hamlin AS, Buller KM, Day TA, Osborne PB** (2004) Effect of naloxone-precipitated morphine withdrawal on c-fos expression in rat corticotropin-releasing hormone neurons in the paraventricular hypothalamus and extended amygdala. *Neurosci Lett* 362: 39-43
158. **Milanés MV, Laorden ML, Chapleur-Chateau M, Burlet A** (1998) Alterations in corticotropin-releasing factor and vasopressin content in rat brain during morphine withdrawal. Correlation with hypothalamic noradrenergic activity and pituitary-adrenal response. *J Pharmacol Exp Ther* 285: 700-706
159. **Houshyar H, Manalo S, Dallman MF** (2004) Time-Dependent Alterations in mRNA Expression of Brain Neuropeptides Regulating Energy Balance and Hypothalamo-Pituitary-Adrenal Activity after Withdrawal from Intermittent Morphine Treatment. *J Neurosci* 24: 9414-9424
160. **Herman JP, Schafer MK, Thompson RC, Watson SJ** (1992) Rapid regulation of corticotropin-releasing hormone gene transcription in vivo. *Mol Endocrinol* 6: 1061-1069
161. **Ma XM, Levi A, Lightman SL** (1997) Rapid changes of heteronuclear RNA for arginine vasopressin but not for corticotropin releasing hormone in response to acute corticosterone administration. *J Neuroendocrinol* 9: 723-728
162. **Watts AG** (1991) Ether anesthesia differentially affects the content of prepro-corticotropin-releasing hormone, prepro-neurotensin/neuromedin N and prepro-enkephalin mRNAs in the hypothalamic paraventricular nucleus of the rat. *Brain Res* 544: 353-357
163. **Kovács KJ, Sawchenko PE** (1996) Regulation of stress-induced transcriptional changes in the hypothalamic neurosecretory neurons. *J Mol Neurosci* 7: 125-133
164. **Helmreich DL, Itoi K, Lopez-Figueroa MO, Akil H, Watson SJ** (2001) Norepinephrine-induced CRH and AVP gene transcription within the hypothalamus: differential regulation by corticosterone. *Mol Brain Res* 88: 62-73
165. **Cole RL, Sawchenko PE** (2002) Neurotransmitter Regulation of Cellular Activation and Neuropeptide Gene Expression in the Paraventricular Nucleus of the Hypothalamus. *J Neurosci* 22: 959-969
166. **Borsook D, Falkowski O, Smirnova O** (1998) Proenkephalin Gene Regulation in the Paraventricular Nucleus by GABA: Interactions with Opioid Systems in a Transgenic Model. *J Neurochem* 70: 604-616
167. **Bali B, Kovacs KJ** (2003) GABAergic control of neuropeptide gene expression in parvocellular neurons of the hypothalamic paraventricular nucleus. *Eur J Neurosci* 18: 1518-1526

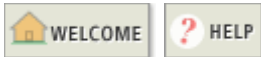
168. **Frenois F, Cador M, Caille S, Stinus L, Le Moine C** (2002) Neural correlates of the motivational and somatic components of naloxone-precipitated morphine withdrawal. *Eur J Neurosci* 16: 1377-1389
169. **Shaw-Lutchman TZ, Barrot M, Wallace T, Gilden L, Zachariou V, Impey S, Duman RS, Storm D, Nestler EJ** (2002) Regional and Cellular Mapping of cAMP Response Element-Mediated Transcription during Naltrexone-Precipitated Morphine Withdrawal. *J Neurosci* 22: 3663-3672
170. **Sheward WJ, Coombes JE, Bicknell RJ, Fink G, Russell A** (1990) Release of oxytocin but not corticotrophin-releasing factor-41 into rat hypophysial portal vessel blood can be made opiate dependent. *J Endocrinol* 124: 141-150
171. **Johnstone LE, Russell JA, Pfaff DW, Douglas AJ, Brooks PJ** (1995) Rapid stimulation of oxytocin gene expression in supraoptic nucleus neurones during morphine withdrawal in rats. *Adv Exp Med Biol* 395: 205-206
172. **Johnstone LE, Brown CH, Meeren HKM, Vuijst CL, Brooks PJ, Leng G, Russell JA** (2000) Local morphine withdrawal increases c-fos gene, Fos protein, and oxytocin gene expression in hypothalamic magnocellular neurosecretory cells. *J Neurosci* 20: 1272-1280
173. **Brown CH, Stern JE, Jackson KLM, Bull PM, Leng G, Russell JA** (2005) Morphine withdrawal increases intrinsic excitability of oxytocin neurons in morphine-dependent rats. *Eur J Neurosci* 21: 501-512
174. **Brown CH, Russell JA** (2004) Cellular Mechanisms Underlying Neuronal Excitability during Morphine Withdrawal in Physical Dependence: Lessons from the Magnocellular Oxytocin System. *Stress* 7: 97-107
175. **Swanson LW, Kuypers HG** (1980) The paraventricular nucleus of the hypothalamus: cytoarchitectonic subdivisions and organization of projections to the pituitary, dorsal vagal complex, and spinal cord as demonstrated by retrograde fluorescence double-labeling methods. *J Comp Neurol* 194: 555-570
176. **Iredale PA, Alvaro JD, Lee Y, Terwilliger R, Chen YL, Duman RS** (2000) Role of Corticotropin-Releasing Factor Receptor-1 in Opiate Withdrawal. *J Neurochem* 74: 199-208
177. **Funada M, Hara C, Wada K** (2001) Involvement of corticotropin-releasing factor receptor subtype 1 in morphine withdrawal regulation of the brain noradrenergic system. *Eur J Pharmacol* 430: 277-281
178. **Xu GP, Van Bockstaele E, Reyes B, Bethea T, Valentino RJ** (2004) Chronic Morphine Sensitizes the Brain Norepinephrine System to Corticotropin-Releasing Factor and Stress. *J Neurosci* 24: 8193-8197
179. **Maj M, Turchan J, Smialowska M, Przewlocka B** (2003) Morphine and cocaine influence on CRF biosynthesis in the rat central nucleus of amygdala. *Neuropeptides* 37: 105-110
180. **Muller DL, Unterwald EM** (2004) In vivo regulation of extracellular signal-regulated protein kinase (ERK) and protein kinase B (Akt) phosphorylation by acute and chronic morphine. *J Pharmacol Exp Ther* 3010: 774-782

181. **Asensio VJ, Miralles A, Garcia-Sevilla JA** (2006) Stimulation of mitogen-activated protein kinase kinases (MEK1/2) by mu-, delta- and kappa-opioid receptor agonists in the rat brain: Regulation by chronic morphine and opioid withdrawal. *European Journal of Pharmacology* 539: 49-56
182. **Lesscher HMB, Burbach JPH, Van Ree JM, Gerrits MAFM, Aantaa R** (2003) ERK1/2 activation in rat ventral tegmental area by the μ -opioid agonist fentanyl: An in vitro study. *Neuroscience* 116: 139-144
183. **Ortiz J, Harris HW, Guitart X, Terwilliger RZ, Haycock JW, Nestler EJ** (1995) Extracellular signal-regulated protein kinases (ERKs) and ERK kinase (MEK) in brain: regional distribution and regulation by chronic morphine. *J Neurosci* 15: 1285-1297
184. **Berhow MT, Hiroi N, Nestler EJ** (1996) Regulation of ERK (Extracellular Signal Regulated Kinase), Part of the Neurotrophin Signal Transduction Cascade, in the Rat Mesolimbic Dopamine System by Chronic Exposure to Morphine or Cocaine. *J Neurosci* 16: 4707-4715
185. **Kumer SC, Vrana KE** (1996) Intricate regulation of tyrosine hydroxylase activity and gene expression. *J Neurochem* 67: 443-462
186. **Salvatore MF, Garcia-Espana A, Goldstein M, Deutch AY, Haycock JW** (2000) Stoichiometry of tyrosine hydroxylase phosphorylation in the nigrostriatal and mesolimbic systems in vivo: Effects of acute haloperidol and related compounds. *J Neurochem* 75: 225-232
187. **Haycock JW, Haycock DA** (1991) Tyrosine hydroxylase in rat brain dopaminergic nerve terminals. Multipl-site phosphorylation in vivo and in synaptosomes. *J Biol Chem* 266: 5650-5657
188. **Bobrovskaya L, Gilligan C, Bolster EK, Flaherty JJ, Dickson PW, Dunkley PR** (2007) Sustained phosphorylation of tyrosine hydroxylase at serine 40: a novel mechanism for maintenance of catecholamine synthesis. *J Neurochem* 100: 479-489
189. **Boundy VA, Gold SJ, Messer CJ, Chen J, Son JH, Joh TH, Nestler EJ** (1998) Regulation of tyrosine hydroxylase promoter activity by chronic morphine in TH9.0-lacZ transgenic mice. *J Neurosci* 18: 9989-9995
190. **Gizang E, Ziff EB** (1994) Fos family members successively occupy the tyrosine hydroxylase gene AP-1 site after nerve growth factor or epidermal growth factor stimulation and can repress transcription. *Mol Endocrinol* 8: 249-262
191. **Stachowiak MK, Rigual RJ, Lee PHK, Viveros OH, Hong JS** (1988) Regulation of tyrosine hydroxylase and phenyl-ethanolamine N-methyltransferase mRNA levels in the sympathoadrenal system by the pituitary-adrenocortical axis. *Mol Brain Res* 3: 275-286
192. **Hagerty T, Fernandez E, Lynch K, Wang SS, Morgan WW, Strong R** (2001) Interaction of a glucocorticoid-responsive element with regulatory sequences in the promoter region of the mouse tyrosine hydroxylase gene. *J Neurochem* 78: 1379-1388

193. **Pozzi L, Häkansson K, Usiello A, Borgkvist A, Lindskog M, Greengard P, Fisone G** (2003) Opposite regulation by typical and atypical anti-psychotics of ERK1/2, CREB and Elk-1 phosphorylation in mouse dorsal striatum. *J Neurochem* 86: 451-459
194. **Haycock JW, Ahn NG, Cobb MH, Krebs EG** (1992) ERK1 and ERK2, two microtubule-associated protein 2 kinases, mediate the phosphorylation of tyrosine hydroxylase at serine-31 *in situ*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 2365-2369
195. **Kyriakis JM, Avruch J** (2001) Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiological Rev* 81: 807-869
196. **Cerezo M, Laorden ML, Milanes MV** (2002) Inhibition of protein kinase C but not protein kinase A attenuates morphine withdrawal excitation of rat hypothalamus-pituitary-adrenal axis. *Eur J Pharmacol* 452: 57-66
197. **Deroche-Gamonet V, Sillaber I, Aouizerate B, Izawa R, Jaber M, Ghozland S, Kellendonk C, Le Moal M, Spanagel R, Schutz G, Tronche F, Piazza PV** (2003) The Glucocorticoid Receptor as a Potential Target to Reduce Cocaine Abuse. *J Neurosci* 23: 4785-4790
198. **Shalev U, Marinelli M, Baumann M, Piazza PV, Shaham Y** (2003) The role of corticosterone in food deprivation-induced reinstatement of cocaine seeking in the rat. *Psychopharmacology* 168: 170-176
199. **Rusnak M, Kvetnansk R, Jelokova J, Palkovits M** (2001) Effect of novel stressors on gene expression of tyrosine hydroxylase and monoamine transporters in brainstem noradrenergic neurons of long-term repeatedly immobilized rats. *Brain Res* 899: 20-35
200. **Plotsky PM** (1987) Facilitation of immunoreactive corticotropin-releasing factor secretion into the hypophysial-portal circulation after activation of catecholaminergic pathways or central norepinephrine injection. *Endocrinology* 121: 924-930
201. **Berhow MT, Russel DS, Terwilliger RZ, Beitner-Johnson D, Self DW, Lindsay RM, Nestler EJ** (1995) Influence of neurotrophic factors on morphine- and cocaine-induced biochemical changes in the mesolimbic dopamine system. *Neuroscience* 68: 969-979
202. **Germano CMR, de Castro M, Rorato R, Laguna MT, Antunes-Rodrigues J, Elias CF, Elias LLK** (2007) Time course effects of adrenalectomy and food intake on cocaine- and amphetamine-regulated transcript expression in the hypothalamus. *Brain Res* 1166: 55-64
203. **Drazen DL, Wortman MD, Schwartz MW, Clegg DJ, van Dijk G, Woods SC, Seeley RJ** (2003) Adrenalectomy Alters the Sensitivity of the Central Nervous System Melanocortin System. *Diabetes* 52: 2928-2934
204. **Aston-Jones G, Delfs JM, Druhan J, Zhu Y** (1999) The bed nucleus of the stria terminalis. A target site for noradrenergic actions in opiate withdrawal. *Ann N Y Acad Sci* 877: 486-498
205. **Delfs JM, Zhu Y, Druhan JP, Aston-Jones G** (2000) Noradrenaline in the ventral forebrain is critical for opiate withdrawal-induced aversion. *Nature* 403: 430-434

-
206. **Wong DL, Tank AW** (2007) Stress-induced catecholaminergic function: Transcriptional and post-transcriptional control. *Stress* 10: 121-130
207. **Fuxe K, Cintra A, Härfstrand A, Agnati LF, Kalia M, Zoli M, Wikström AC, Okret S, Aronsson M, Gustafsson JA** (1987) Central glucocorticoid receptor immunoreactive neurons: new insights into the endocrine regulation of the brain. *Ann N Y Acad Sci* 512: 362-393
208. **Roosendaal B, Okuda S, de Quervain DJF, McGaugh JL** (2006) Glucocorticoids interact with emotion-induced noradrenergic activation in influencing different memory functions. *Neuroscience* 138: 901-910
209. **Izawa R, Jaber M, Deroche-Gamonet V, Sillaber I, Kellendonk C, Le Moal M, Tronche F, Piazza PV** (2006) Gene expression regulation following behavioral sensitization to cocaine in transgenic mice lacking the glucocorticoid receptor in the brain. *Neuroscience* 137: 915-924
210. **Fürst R, Zahler S, Vollmar AM** (2008) Dexamethasone-induced expression of endothelial MKP-1 involves activation of the transcription factors AP-1 and CREB and the generation of ROS. *Endocrinology* Apr 10. [Epub ahead of print]:
211. **Cote-Vélez A, Pérez-Martínez L, Charli JL, Joseph-Bravo P** (2008) The PKC and ERK/MAPK Pathways Regulate Glucocorticoid Action on TRH Transcription. *Neurochemical Research* Apr 22. [Epub ahead of print]:

X. ANEXO



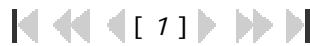
Journal Summary List

[Journal Title Changes](#)

Journals from: search JCR Abbreviated Journal Title for 'J NEUROCHEM'

Sorted by:

Journals 1 - 1 (of 1)

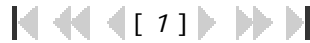


Page 1 of 1

Ranking is based on your journal and sort selections.

Mark	Rank	Abbreviated Journal Title (linked to journal information)	ISSN	JCR Data					
				Total Cites	Impact Factor	5-Year Impact Factor	Immediacy Index	Articles	Cited Half-life
<input type="checkbox"/>	1	J NEUROCHEM	0022-3042	34937	4.451	4.561	0.656	717	7.1

Journals 1 - 1 (of 1)



Page 1 of 1



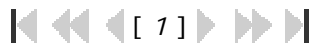
 **Journal Summary List**

[Journal Title Changes](#)

Journals from: search JCR Abbreviated Journal Title for 'N-S ARCH PHARMACOL'


Sorted by: 

Journals 1 - 1 (of 1)

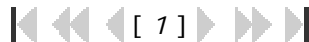


Page 1 of 1

Ranking is based on your journal and sort selections.

Mark	Rank	Abbreviated Journal Title (linked to journal information)	ISSN	JCR Data 					
				Total Cites	Impact Factor	5-Year Impact Factor	Immediacy Index	Articles	Cited Half-life
<input type="checkbox"/>	1	N-S ARCH PHARMACOL	0028-1298	4445	2.161	2.051	0.312	77	9.5

Journals 1 - 1 (of 1)



Page 1 of 1

[Acceptable Use Policy](#)

Copyright © 2010 [Thomson Reuters](#).



THOMSON REUTERS

Published by Thomson Reuters

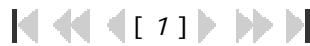


Journal Summary List [Journal Title Changes](#)

Journals from: search Full Journal Title for 'ENDOCRINOLOGY'

Sorted by:

Journals 1 - 1 (of 1)

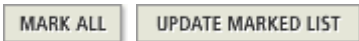


Page 1 of 1

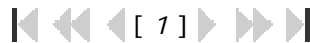


Ranking is based on your journal and sort selections.

Mark	Rank	Abbreviated Journal Title (linked to journal information)	ISSN	JCR Data					
				Total Cites	Impact Factor	5-Year Impact Factor	Immediacy Index	Articles	Cited Half-life
<input type="checkbox"/>	1	ENDOCRINOLOGY	0013-7227	42514	5.045	5.042	1.137	626	8.0



Journals 1 - 1 (of 1)



Page 1 of 1


To whom it may concerns

Hereby, the undersigned K.J. Kovács and A. Földes, co-authors of the paper presented by Cristina Núñez to apply for the defence of her Doctoral Thesis as a synopsis of articles,

STATE

their consent with the presentation of the following article: **Núñez C, Földes A, Laorden ML, Milanés MV, Kovács KJ (2007) Activation of stress-related hypothalamic neuropeptide gene expression during morphine withdrawal, Journal of Neurochemistry 101:1060-71**, and their agreement with no presenting this article as a part of another Doctoral Thesis.

Budapest, 30 January, 2008



Krisztina J. Kovács PhD



Anna Földes

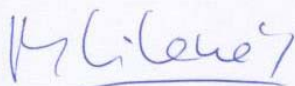
Laboratory of Molecular Neuroendocrinology
Institute of Experimental Medicine,
Budapest, Hungary

Los abajo firmantes, María Victoria Milanés, María Luisa Laorden y María Teresa Castells, coautores de los trabajos presentados por Cristina Núñez Parra para solicitar la defensa de su Tesis Doctoral como compendio de publicaciones

DECLARAN

Su conformidad con la presentación de los siguientes artículos: **1.** Activation of stress-related hypothalamic neuropeptide gene expression during morphine withdrawal (Núñez C, Földes A, Laorden M.L, Milanés MV, Kovács KJ); **2.** Regulation of Ser31 and Ser40 tyrosine hydroxylase phosphorylation during morphine withdrawal in the hypothalamic paraventricular nucleus and nucleus tractus solitarius-A2 cell group. Role of ERK1/2 (Núñez C, Laorden ML, Milanés MV); **3.** Regulation of extracellular signal-regulated kinases (ERKs) by morphine withdrawal on the brain stress system (Núñez C, Castells MT, Laorden ML, Milanés MV), y su compromiso de no presentar estos artículos como parte de otra tesis doctoral.

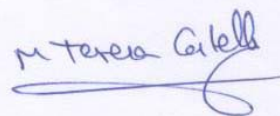
Y para que así conste donde proceda firmamos la presente en Murcia, a 24 de abril de 2008.



MV Milanés



ML Laorden



MT Castells

