

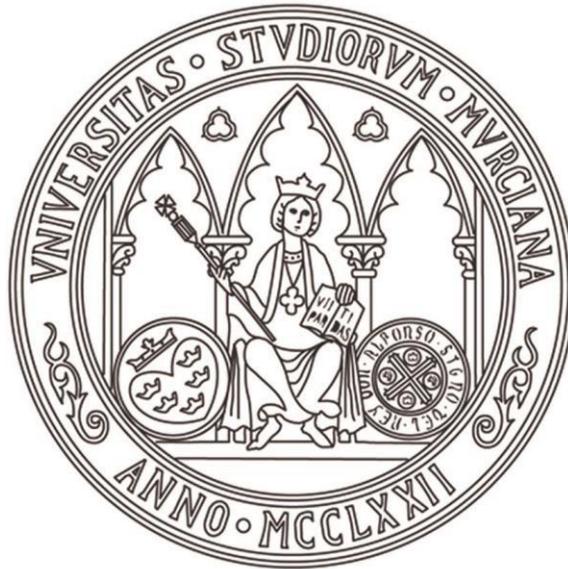


UNIVERSIDAD DE MURCIA
ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO
TESIS DOCTORAL

**PAPEL DEL ESTRÉS DE TIPO FÍSICO EN LA
APARICIÓN DE RECAÍDAS EN LA
DEPENDENCIA DE MORFINA**

D. FRANCISCO JAVIER TERUEL FERNÁNDEZ

2024



UNIVERSIDAD DE MURCIA
ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO
TESIS DOCTORAL

**PAPEL DEL ESTRÉS DE TIPO FÍSICO EN LA
APARICIÓN DE RECAÍDAS EN LA DEPENDENCIA
DE MORFINA**

Autor: D. Francisco Javier Teruel Fernández

Director/es: D. Javier Navarro Zaragoza y Dña. Maria Pilar Almela
Rojo



DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD
DE LA TESIS PRESENTADA PARA OBTENER EL TÍTULO DE DOCTOR

Aprobado por la Comisión General de Doctorado el 19-10-2022

D./Dña. Francisco Javier Teruel Fernández

doctorando del Programa de Doctorado en

INTEGRACIÓN Y MODULACIÓN DE SEÑALES EN BIOMEDICINA

de la Escuela Internacional de Doctorado de la Universidad Murcia, como autor/a de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor y titulada:

PAPEL DEL ESTRÉS DE TIPO FÍSICO EN LA APARICIÓN DE RECAÍDAS EN LA DEPENDENCIA DE MORFINA

y dirigida por,

D./Dña. Javier Navarro Zaragoza

D./Dña. María Pilar Almela Rojo

D./Dña.

DECLARO QUE:

La tesis es una obra original que no infringe los derechos de propiedad intelectual ni los derechos de propiedad industrial u otros, de acuerdo con el ordenamiento jurídico vigente, en particular, la Ley de Propiedad Intelectual (R.D. legislativo 1/1996, de 12 de abril, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Propiedad Intelectual, modificado por la Ley 2/2019, de 1 de marzo, regularizando, aclarando y armonizando las disposiciones legales vigentes sobre la materia), en particular, las disposiciones referidas al derecho de cita, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

Si la tesis hubiera sido autorizada como tesis por compendio de publicaciones o incluyese 1 o 2 publicaciones (como prevé el artículo 29.8 del reglamento), declarar que cuenta con:

- La aceptación por escrito de los coautores de las publicaciones de que el doctorando las presente como parte de la tesis.*
- En su caso, la renuncia por escrito de los coautores no doctores de dichos trabajos a presentarlos como parte de otras tesis doctorales en la Universidad de Murcia o en cualquier otra universidad.*

Del mismo modo, asumo ante la Universidad cualquier responsabilidad que pudiera derivarse de la autoría o falta de originalidad del contenido de la tesis presentada, en caso de plagio, de conformidad con el ordenamiento jurídico vigente.

En Murcia, a 23 de Septiembre de 2024



Fdo.: Francisco Javier Teruel Fernández

Esta DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD debe ser insertada en la primera página de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor.

Información básica sobre protección de sus datos personales aportados	
Responsable:	Universidad de Murcia. Avenida teniente Flomesta, 5. Edificio de la Convalecencia. 30003; Murcia. Delegado de Protección de Datos: dpd@um.es
Legitimación:	La Universidad de Murcia se encuentra legitimada para el tratamiento de sus datos por ser necesario para el cumplimiento de una obligación legal aplicable al responsable del tratamiento. art. 6.1.c) del Reglamento General de Protección de Datos
Finalidad:	Gestionar su declaración de autoría y originalidad
Destinatarios:	No se prevén comunicaciones de datos
Derechos:	Los interesados pueden ejercer sus derechos de acceso, rectificación, cancelación, oposición, limitación del tratamiento, olvido y portabilidad a través del procedimiento establecido a tal efecto en el Registro Electrónico o mediante la presentación de la correspondiente solicitud en las Oficinas de Asistencia en Materia de Registro de la Universidad de Murcia

El presente trabajo ha dado lugar a la siguiente producción científica:

Publicaciones

1. Navarro-Zaragoza J, Martínez-Laorden E, Teruel-Fernández FJ, Gómez-Murcia V, Cánovas A, Milanés M-V, et al. Naloxone-induced conditioned place aversion score and extinction period are higher in C57BL/6J morphine-dependent mice than in Swiss: Role of HPA axis. *Pharmacol Biochem Behav.* 2021;201:173106. DOI: 10.1016/j.pbb.2021.173106
2. Ruiz-Gonzalez M, Cánovas-Cabanes A, Teruel-Fernández FJ, Laorden-Carrasco ML, Nazarro-Zaragoza J, Almela P. Bases neurobiológicas de la adicción a opioides. Lo que debes saber sobre medicamentos y salud. *Editorial Planeta, S.A.*, Pp. 25 - 33. (españa), 2022. ISBN 9788419389770. Bases neurobiológicas de la adicción a opioides.
3. Fernández-López L, Rodríguez S, Cánovas-Cabanes A, Teruel-Fernández FJ, Almela P, Del Rincón JH, Navarro-Zaragoza J, Falcón M. Identification of Benzodiazepine use based on Dried Blood Stains Analysis. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2024 Jun 18;17(6):799. DOI: 10.3390/ph17060799.

Comunicaciones a congresos

1. **Título del trabajo:** Brain stress system and noradrenergic system mediate the mechanisms underlying relapse caused by exposure to Social Defeat in the Nucleus Accumbens in morphine dependent mice
Nombre del congreso: FENS FORUM 2022
Tipo evento: Congreso
Ámbito geográfico: Internacional
Tipo de participación: Participativo - Póster
Ciudad de celebración: Paris, Francia
Fecha de celebración: 12/07/2022
"Alberto Cánovas Cabanes; Francisco Javier Teruel Fernandez; Javier Navarro Zaragoza; Pilar Almela Rojo; María Luisa Laorden Carrasco".
2. **Título del trabajo:** Role of propranolol and CP-154,526 in relapse caused by Tail Pinch associated with morphine. Expression of phosphorylated CREB in dentate gyrus

Nombre del congreso: FENS FORUM 2022

Tipo evento: Congreso

Ámbito geográfico: Internacional

Tipo de participación: Participativo - Póster

Ciudad de celebración: Paris, Francia

Fecha de celebración: 12/07/2022

"María José Madrid García; Ana Fernández Rodríguez; Alberto Cánovas Cabanes; Francisco Javier Teruel Fernández; Sofia García Moreno; Lucía Fernandez López; María Luisa Laorden Carrasco; Javier Navarro Zaragoza; Pilar Almela Rojo".

3. **Título del trabajo:** Effects of CRF1R antagonist in relapse after physical stress

Nombre del congreso: IV Jornadas Científicas del IMIB-Arrixaca

Tipo evento: Jornada

Ámbito geográfico: Nacional

Tipo de participación: Participativo - Póster

Ciudad de celebración: Murcia, España

Fecha de celebración: 11/11/2019

"Alberto Cánovas Cabanes; Francisco Javier Teruel Fernández; Javier Navarro Zaragoza; María Del Pilar Almela Rojo; María Luisa Laorden Carrasco; María Victoria Milanés Maquilón".

4. **Título del trabajo:** Papel del estrés en la recaída asociada a morfina. Estudio de PERK1/2 y PCREB en el núcleo accumbens

Nombre del congreso: IV Jornadas Científicas IMIB-Arrixaca de Murcia

Tipo evento: Jornada

Ámbito geográfico: Nacional

Tipo de participación: Participativo - Póster

Ciudad de celebración: Murcia, España

Fecha de celebración: 11/11/2019

"Francisco Javier Teruel Fernández, Alberto Cánovas Cabanes, María Victoria Milanés Maquilón, María Luisa Laorden Carrasco, M. Pilar Almela Rojo, Javier Navarro Zaragoza".

5. **Título del trabajo:** Role of propranolol in relapse caused by tail pinch stress associated with morphine

Nombre del congreso: III Jornadas Científicas del IMIB-Arrixaca de Murcia

Tipo evento: Jornada

Ámbito geográfico: Nacional

Tipo de participación: Participativo - Póster

Ciudad de celebración: Murcia, España

Fecha de celebración: 19/11/2018

"Alberto Cánovas Cabanes; Francisco Javier Teruel Fernández; Javier Navarro Zaragoza; María Del Pilar Almela Rojo; María Luisa Laorden Carrasco; María Victoria Milanés Maquilón".

6. **Título del trabajo:** Role of CP-154,526 and propranolol in relapse caused by stress associated with morphine. Expression of phosphorylated ERK in dentate gyrus

Nombre del congreso: 1er Congreso Global de Facultades de Farmacia (IPAP)

Tipo evento: Congreso

Ámbito geográfico: Nacional

Tipo de participación: Participativo - Póster

Ciudad de celebración: Salamanca, España

Fecha de celebración: 25/09/2018

"Pilar Martínez Albadalejo, Alberto Cánovas Cabanes, Francisco Javier Teruel Fernández, María Victoria Milanés Maquilón, María Luisa Laorden Carrasco, Javier Navarro Zaragoza; Pilar Almela Rojo".

7. **Título del trabajo:** Strain-dependent changes in the Hypothalamic-Pituitary-Adrenocortical axis after naloxone-induced conditioned place aversion in mice

Nombre del congreso: 1er Congreso Global de Facultades de Farmacia (IPAP)

Tipo evento: Congreso

Ámbito geográfico: Nacional

Tipo de participación: Participativo - Póster

Ciudad de celebración: Salamanca, España

Fecha de celebración: 25/09/2018

"Javier Navarro Zaragoza, Francisco Javier Teruel Fernández, Victoria Gómez Murcia, Alberto Cánovas Cabanes, Elena Martínez Laorden, María Victoria Milanés Maquilón, María Luisa Laorden Carrasco; Pilar Almela Rojo".

8. **Título del trabajo:** Effects of restraint in morphine associated relapse in mice

Nombre del congreso: 10th FENS Forum of Neuroscience

Tipo evento: Congreso

Ámbito geográfico: Internacional

Tipo de participación: Participativo - Póster

Ciudad de celebración: Copenhague, Dinamarca

Fecha de celebración: 02/07/2016

“María Victoria Milanés Maquilón; Javier Navarro Zaragoza; Francisco Javier Teruel Fernández; Bruno Ribeiro Do Couto; María Luisa Laorden Carrasco.”

9. Título del trabajo: Role of stress in morphine associated relapse

Nombre del congreso: 16 National Congress of the Spanish Society of Neuroscience

Tipo evento: Congreso

Ámbito geográfico: Nacional

Tipo de participación: Participativo - Póster

Ciudad de celebración: Granada, España

Fecha de celebración: 23/09/2015

“María Luisa Laorden Carrasco; Francisco Javier Teruel Fernández; Javier Navarro Zaragoza; Bruno Ribero Do Couto; María Victoria Milanés Maquilón.”

10. Título del trabajo: Role of social defeat in morphine associated relapse

Nombre del congreso: 36 Congreso de la Sociedad Española de Farmacología

Tipo evento: Congreso

Ámbito geográfico: Nacional

Tipo de participación: Participativo - Póster

Ciudad de celebración: Valencia, España

Fecha de celebración: 16/09/2015

“María Luisa Laorden Carrasco; Francisco Javier Teruel Fernández; Bruno Ribeiro Do Couto; Javier Navarro Zaragoza; María Victoria Milanés Maquilón.”

Proyectos

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

- Proyecto SAF2013-49076-P, Ministerio de Economía y Competitividad: “Estrés y memoria: implicación en los estados aversivos de la adicción y en las recaídas; mecanismos moleculares”.

- Proyecto SAF2017-85679-R, Ministerio de Industria, Economía y Competitividad: “Receptor dopaminérgico D3: posible diana terapéutica para la prevención de las recaídas en el consumo de opiáceos: mecanismos neurobiológicos”.
- Proyecto 20847/PI/18, Fundación Séneca, Comunidad Autónoma de la Región de Murcia: “Cambios neuroadaptativos durante la dependencia de opiáceos. Diseño de nuevas formulaciones para administración a morfina”.
- Proyecto PID2020-1130817/AEI/10.13039/501100011033, Ministerio de Ciencia e Innovación: Biomateriales en Nanoingeniería: Producción y aplicaciones en terapias anticancerígena, antibacteriana y antiviral (Bionanin).

AGRADECIMIENTOS

Para expresar mi gratitud, debo remontarme necesariamente 32 años atrás, cuando dos personas decidieron asumir la responsabilidad de criar a un tercer hijo. Dos personas que durante toda su vida se han preocupado por inculcarme valores como la humildad, el esfuerzo, la bondad, y, sobre todo, el amor y el cariño. Dos personas que me han servido de ejemplo para dar lo mejor de mí y que me han empujado a cumplir mis sueños y a luchar por ello.

Desde bien pequeño desarrollé un gran rechazo por eso que conocemos como “enfermedades o patologías”, que arruinan y quitan vidas, y, por ende, un interés por la salud y admiración por aquellos que investigaban y desarrollaban nuevos fármacos para luchar contra este enemigo, así como, de los sanitarios que ayudaban a los demás a mejorar su calidad de vida, e incluso, a acabar con sus patologías.

Hecho que, curiosamente, compartía con el Dr. Teruel 1, mi hermano Juande, que sin tener ninguna referencia familiar en el ámbito de la salud, a ambos nos produjo esa atracción. Así, cuando uno de mis referentes decidió comenzar una carrera sanitaria y posterior doctorado, produjo en mí un afianzamiento en mis convicciones, y tanto ánimo como fuerza para continuar ese camino.

Posteriormente, el Dr. Teruel 2, tras estudiar la carrera de derecho, comenzó con el camino de la investigación, por lo que mi deseo de estudiar e investigar siguió creciendo exponencialmente. Si algo caracteriza a este otro referente es la capacidad de esfuerzo y dedicación a lo que se propone.

Una vez tomada la decisión y cursando una carrera en la que existía un equilibrio perfecto entre la atención al paciente y la investigación, apareció una persona que sin saberlo iba a convertirse en el pilar fundamental de mi vida. Una persona que es capaz de todo y que te ayuda a conseguir alcanzar tus sueños. No quiero extenderme en adjetivos porque estos agradecimientos se alargarían en exceso. En este punto, me permito saltarme la cronología y decir que, a día de hoy, sigue siendo ese apoyo que me ayuda a continuar y culminar proyectos como esta investigación de doctorado.

Ya con la carrera casi finalizada, tenía claro en qué departamento debía escoger la realización de mi TFG (trabajo de fin de grado) para proseguir con una posterior tesis doctoral. Y ahí fue cuando decidí consultar a la que considero una de las personas más sabias de nuestro mundo de la investigación farmacológica, la Dra. María Luisa Laorden. Ella supo guiarme y tenía claro quién debía ser mi director de tesis.

Aún recuerdo cuando entré en aquella sala para conocer a quién iba a ser la persona con la que iba a trabajar y aprender durante los siguientes años, y descubrí que

mi director de tesis, además de un profesor, era un amigo, lo que fue otra señal inequívoca de que iba por el camino correcto. El Dr. Navarro-Zaragoza es un ejemplo de trabajo y proactividad.

Lo he vuelto a hacer, he vuelto a saltarme la cronología con mi compañero de clase y de laboratorio, y, sobre todo, amigo. Con Alberto he compartido mucho, pero el laboratorio nos unió más, y, aunque pudo haber momentos de tensión tras muchas horas de trabajo, no puedo olvidar los momentos de compartir conocimientos, trabajar codo con codo y de los buenos ratos y enormes risas.

Durante el transcurso del doctorado, aparece otra persona, que, de forma desinteresada, nos ayudaba, nos apoyaba y pasaba horas y horas a nuestro lado. Como no podía ser de otra forma, la Dra. Almela, que no puede dejar de ser otro de mis referentes en este mundo de la investigación, se convirtió en la Codirectora de esta carrera de fondo.

No puedo, tampoco, olvidarme de todas las personas, amigos y seres queridos que se han preocupado por mí, que me han preguntado, que me han apoyado y que me han dado ánimos. Familia (abuelos, tíos, primos, suegros, cuñadas y cuñado), amigos (otra de esas largas, pero muy específicas listas), compañeros de la Farmacia Comunitaria (amigos de SEFAC, compañeros de la carrera y de la Farmacia), con especial mención a la Dra. Modesta Gil, a la que considero mi “madrina” en este otro ámbito de mi vida.

Una vez expresada mi gratitud, solo me queda desear y esperar que todos estos años en los que he experimentado los duros efectos del eje Tesis-Farmacia-Casa, culminen con la conversión del pequeño de la familia al Dr. Teruel 3.

ABREVIATURAS

AC: Adenilato ciclasa

ACTH: Hormona adrenocorticotropa

ADN: Ácido desoxirribonucleico

AMPc: Adenosín monofosfato-3',5'-cíclico

ARN: Ácido ribonucleico

BLA: Amígdala basolateral

BNST: Núcleo de la estría terminal

CeA: Amígdala central

CPA: Condicionamiento por aversión de plaza

CPF: Corteza prefrontal

CPP: Condicionamiento por preferencia de plaza

CREB: Factor de unión al AMPc

CRF: Factor liberador de corticotropina

CRFR: Receptores de CRF

DA: Dopamina

DG: Giro dentado

DOR: Receptores opioides delta

ERK: Quinasas reguladas por señales extracelulares

GABA: Ácido gamma-aminobutírico

GC: Glucocorticoides

GPCR: Receptores acoplados a proteínas G

GR: Receptor de glucocorticoides

HDAC: Histonas desacetilasas

HHA: Hipotálamo-hipófisis-adrenal

KOR: Receptores opioides kappa

LA: Amígdala lateral

LC: Locus Coeruleus

LH: Hipotálamo lateral

MOR: Receptores opioides mu

MR: Receptor de mineralocorticoides

NA: Noradrenalina

NAc: Núcleo accumbens

NMDA: Receptor N-metil-D-aspartato

NTS: Núcleo del tracto solitario

Nx: Naloxona

PKA: Proteína quinasa A

PKC: Proteína quinasa C

PVN: Núcleo paraventricular

SNC: Sistema nervioso central

TP: Tail pinch o pinzamiento de cola

UCN: Urocortinas

VTA: Área tegmental ventral

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. ANALGÉSICOS OPIOIDES	2
1.2. PREVALENCIA DE CONSUMO DE OPIÁCEOS	5
1.3. NEUROBIOLOGÍA DE LA ADICCIÓN	8
1.3.1. Factores genéticos y adicción	10
1.3.2. Plasticidad neuronal	11
1.3.3. Etapas de la adicción y circuitos implicados	12
1.4. RECEPTORES DE CRF (CRFR)	22
1.5. SISTEMA NORADRENÉRGICO	25
1.6. SISTEMA LÍMBICO	26
1.7. OTROS PÉPTIDOS	28
1.7.1. Dinorfinas	28
1.7.2. Orexinas	28
1.8. FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN RELACIONADOS CON LA ADICCIÓN	28
1.8.1. ERKs	29
1.8.2. CREB	30
1.8.3. BDNF	31
1.9. MODELOS CONDUCTUALES ANIMALES PARA EL ESTUDIO DE LA ADICCIÓN: CPP Y CPA	32
1.10. TRATAMIENTOS ACTUALES PARA LA ADICCIÓN	34
2. OBJETIVOS	38
3. MÉTODOS	41
3.1. FÁRMACOS	42
3.2. ANIMALES	42
3.3. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL	42
3.3.1. Grupos experimentales	42
3.3.2. Fase Conductual	43
3.4. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA Y WESTERN BLOT	47
3.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	50
4. RESULTADOS	51
4.1. PAPEL DEL TP EN LA RECAÍDA ASOCIADA A MORFINA EN RATONES PREVIAMENTE TRATADOS CON CP-154,526 O PROPRANOLOL	52

4.1.1. Aversión condicionada de plaza en ratones dependientes de morfina	52
4.1.2. Extinción de la aversión condicionada de plaza en ratones dependientes de morfina	53
4.1.3. Papel del TP en la recaída asociada a morfina en ratones previamente tratados con CP-154,526 o propranolol	55
4.1.4. Cuantificación de la actividad locomotora de los animales durante la expresión del CPA, extinción y recaída	60
4.2. EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE pERK1/2 Y pCREB EN CeA, NAc, BNST, BLA, PVN, VTA Y DG TRAS LA RECAÍDA INDUCIDA POR TP	64
4.2.1. Expresión de pERK1/2 y pCREB en CeA tras la recaída inducida por TP	64
4.2.2. Expresión de pERK1/2 y pCREB en NAc tras la recaída inducida por TP	66
4.2.3. Expresión de pERK1/2 y pCREB en BNST tras la recaída inducida por TP	68
4.2.4. Expresión de pERK1/2 y pCREB en BLA tras la recaída inducida por TP	70
4.2.5. Expresión de pERK1/2 y pCREB en PVN tras la recaída inducida por TP	72
4.2.6. Expresión de pERK1/2 y pCREB en VTA tras la recaída inducida por TP	74
4.2.7. Expresión de pCREB en DG tras la recaída inducida por TP	77
4.2.8 Resumen de las variaciones de la expresión de pERK1/2 y pCREB en los distintos núcleos	78
5. DISCUSIÓN	79
6. CONCLUSIONES	90
7. BIBLIOGRAFÍA	92

RESUMEN

Introducción

La adicción a la morfina y sus derivados, como la heroína o el fentanilo ha sido, y sigue siendo, uno de los principales problemas en los distintos sistemas sanitarios como el de España o Estados Unidos. Desde hace años, se ha descrito cómo los opiáceos pueden afectar a los distintos sistemas cerebrales como el sistema hipotalámico, extrahipotalámico, mesocorticolímbico o adrenérgico, así como la implicación del estrés en la recaída al síndrome de abstinencia asociado a estos opiáceos.

Objetivos

El objetivo principal de esta tesis doctoral consiste en estudiar la implicación del estrés físico, aplicado mediante la técnica del *pinzamiento de cola*, en la recaída al síndrome de abstinencia asociada a morfina, así como evaluar la implicación de los de los receptores β -adrenérgicos, y de los receptores del factor liberador de corticotropina (CRF1R) en esta recaída por medio de sus antagonistas propranolol y CP-154,526.

Metodología

Para ello, hemos aplicado un condicionamiento por aversión de plaza (CPA) con el fin de inducir un síndrome de abstinencia a morfina, así como, posteriormente, asegurar la extinción de dicho condicionamiento para poder provocar la recaída en el mismo a ratones que previamente hemos categorizado por grupos según la aplicación o no del estímulo estresante (TP o CTP), y según el tratamiento farmacológico administrado (Vehículo, propranolol o CP-154,526).

Por otro lado, hemos medido la fosforilación de las proteínas ERK1/2 y CREB en distintos núcleos cerebrales (CeA, NAc, BNST, BLA, PVN, VTA y DG) de los sistemas objeto de estudio para comprobar cómo varían en función de los tratamientos recibidos.

Resultados

Los resultados obtenidos para la recaída en el síndrome de abstinencia a morfina nos muestran que en el grupo que ha recibido el estímulo físico y que no ha sido administrado con ninguno de los antagonistas se produce esta recaída con respecto a su grupo control, mientras que los animales que han sido estresados y previamente tratados con antagonistas, no la experimentan.

Por otro lado, en el estudio de la fosforilación de proteínas ERK1/2 y CREB medimos el aumento o no de esta fosforilación en los animales que han recibido el estímulo físico y no han recibido el tratamiento antagonista con respecto a los que sí lo

recibieron. En primer lugar, a nivel de CeA observamos un aumento en la fosforilación de las proteínas ERK1/2 y CREB en este grupo. En NAc observamos un aumento en la fosforilación de ERK2, mientras que no se observa este aumento en los niveles de ERK1 y CREB.

En el estudio de BNST observamos un aumento en la expresión de ERK1/2 en todos los grupos y de CREB en los ratones tratados con CP-154,526 y propranolol. No se experimenta este aumento en CREB en los ratones sin tratar con respecto a su control. En cambio, la medición de la fosforilación de ERK1/2 y CREB en BLA nos muestra que no se experimenta aumento en ninguno de los grupos tras la recaída en el síndrome de abstinencia a morfina. En cuanto a PVN y a VTA, experimentan un aumento en la fosforilación de ERK1/2 y CREB en el grupo que recibió el estímulo físico y no fue tratado con respecto a los que recibieron el tratamiento antagonista. Por último, a nivel de DG, observamos un aumento significativo de la fosforilación de CREB.

Conclusiones

Nuestros resultados sugieren que la administración de naloxona a ratones tratados crónicamente con morfina indujo un síndrome de abstinencia con un efecto aversivo. También, llegamos a la conclusión de que la aplicación de un estímulo estresante (pinzamiento de cola) induce la recaída en el comportamiento aversivo en animales dependientes de morfina, que previamente habían extinguido el comportamiento asociado a dependencia, y que la administración de CP-154,526 y propranolol antagonizaron esta recaída.

Por otro lado, observamos que esta recaída produce un aumento en la fosforilación de ERK y CREB en CeA, PVN, VTA y DG, y que tanto CP-154,526 como propranolol son capaces de antagonizarlo. No observamos, sin embargo, estos cambios a nivel de BLA y de NAc.

Por último, de estos resultados se deduce que el CRF1R y el receptor β -adrenérgico forman parte del proceso de aprendizaje asociado a las recaídas en los comportamientos aversivos inducidos por estrés y que CP-154,526 y propranolol podrían ser tratamientos adecuados para la prevención en el consumo de sustancias en sujetos adictos.

ABSTRACT

Introduction

Morphine addiction and its derivatives, such as heroin or fentanyl, have been - and continue to be - a significant issue in diverse healthcare systems, including those in Spain and the United States. For years, it has been reported how opioids can affect different brain systems, such as the hypothalamic, extrahypothalamic, mesocorticolimbic, or the adrenergic system, assessing the role of stress in relapse to withdrawal syndrome associated with these opioids.

Objectives

The primary objective of this doctoral thesis is to investigate the impact of physical stress - as applied through the tail pinch technique - on relapses to withdrawal syndrome associated with morphine. Additionally, it will examine the involvement of β -adrenergic receptors and corticotropin-releasing factor 1 receptors (CRF1R) in this relapse by utilizing their antagonists, propranolol and CP-154,526.

Methodology

To achieve this, we used a conditioned place aversion (CPA) paradigm to induce morphine withdrawal syndrome and subsequently ensured the extinction of this conditioning to produce relapse in mice that we previously categorized into groups based on the application or not of the stress stimulus (TP or CTP), and based on the pharmacological treatment administered (Vehicle, propranolol, or CP-154,526).

Furthermore, we measured the phosphorylation of ERK1/2 and CREB proteins in several brain nuclei (CeA, NAc, BNST, BLA, PVN, VTA, and DG) of the systems under study in order to observe how they changed according to the treatments received.

Results

The results obtained for relapse to morphine withdrawal syndrome show that the group that received the physical stimulus and was not administered an antagonist experienced a relapse, compared to the control group. However, animals that were stressed and previously treated with antagonists did not relapse.

In contrast, in the study of ERK1/2 and CREB protein phosphorylation, we observed an increase in phosphorylation in animals that received the physical stimulus and did not receive an antagonist treatment compared to those that did. At the CeA level, we observed an increase in ERK1/2 and CREB protein phosphorylation in this group. In

the NAc, we noticed a rise in ERK2 phosphorylation, whereas this increase was not observed in ERK1 or CREB levels.

In BNST study, we found an increase in ERK1/2 expression in all groups and a rise in CREB in mice treated with CP-154,526 and propranolol. A similar increase in CREB was not observed in mice without treatment compared to their control. However, the measurement of ERK1/2 and CREB phosphorylation in BLA revealed that no increase occurred in any of the groups following relapse to morphine withdrawal syndrome. Regarding PVN and VTA, there was an increase in ERK1/2 and CREB phosphorylation in the group that received the physical stimulus and was not treated compared to those that received the antagonist treatment. Finally, we have observed a significant increase in CREB phosphorylation at DG level.

Conclusions

Our results suggest that the administration of naloxone to chronically morphine-treated mice induced a withdrawal syndrome with an aversive effect. Additionally, we concluded that the application of a stressful stimulus (tail pinch) induces relapse into aversive behaviour in morphine-dependent animals that had previously extinguished dependence-associated behaviour and that the administration of CP-154,526 and propranolol antagonized this relapse.

Furthermore, we observed that this relapse led to an increase in ERK and CREB phosphorylation in CeA, PVN, VTA, and DG and that both CP-154,526 and propranolol were able to antagonize this effect. However, we did not observe these changes at BLA and NAc levels.

Ultimately, these findings suggest that CRF1R and the β -adrenergic receptors are part of the learning process associated with stress-induced relapse into aversive behaviours and that CP-154,526 and propranolol may be suitable treatments for the prevention of substance use in individuals who are addicted.

1. INTRODUCCIÓN



En los últimos años se ha sugerido una relación muy importante entre la exposición a situaciones de estrés y el desarrollo de adicción a sustancias de abuso, existiendo conexiones entre distintos sistemas neuronales y con la participación de varios neurotransmisores. Por ejemplo, hay distintas rutas y vías de señalización intracelular que participan en la regulación del sistema cerebral del estrés, estando conectadas con receptores opioides, y pudiendo ser activadas o antagonizadas por sustancias de esta naturaleza, que actuarían como ligandos. Concretamente, el enfoque de este estudio ha sido comprobar si la exposición a estímulos físicos estresantes para el individuo puede influir en el comportamiento y en el desarrollo de adicción a drogas, así como también la búsqueda de dianas farmacológicas que pudieran contrarrestar estos efectos.

1.1. ANALGÉSICOS OPIOIDES

El término opioide se suele utilizar para englobar todas las drogas derivadas o similares al opio, aunque lo más correcto es usarlo en referencia a los alcaloides de la adormidera, que es la planta de la que se extrae, y sus derivados. Podemos clasificar los fármacos o drogas opioides en tres categorías: alcaloides presentes en el opio (p.ej., morfina o codeína); semi sintéticos (p.ej., heroína u oxicodona); y sintéticos, que tienen una estructura química que no proviene de los alcaloides del opio (p.ej., fentanilo y metadona).

También se utiliza este término para referirse a las sustancias endógenas y exógenas con afinidad por estos receptores, como las endorfinas, las encefalinas o las dinorfinas.

Los medicamentos opioides actúan deprimiendo la actividad del sistema nervioso central (SNC), reducen el dolor e inducen el sueño, entre otros efectos. Los efectos secundarios de estos pueden incluir sedación excesiva, náuseas y estreñimiento. Aunque estos fármacos disponen de un largo historial de uso para el tratamiento del dolor, situándose como los analgésicos más potentes y eficaces disponibles, presentan el problema de que su uso a largo plazo puede provocar dependencia y causar la muerte por sobredosis, especialmente cuando no se utilizan según las pautas de prescripción. El valor del uso de opioides para el tratamiento del dolor agudo clasificado como moderado a severo, y del dolor relacionado con el cáncer es indiscutible. Sin embargo, cada vez se prescriben más opioides para el dolor crónico no oncológico (DCNO), y para el dolor ambulatorio clasificado como

leve a moderado, a pesar de que los datos sobre su eficacia para esta indicación no lo aconsejan (Shipton y cols., 2018).

Los receptores opioides son receptores de membrana acoplados a proteína G (GPCR) y se clasifican de la siguiente manera: los receptores mu (MOR), delta (DOR) y kappa (KOR), siendo el MOR el principal responsable de las propiedades analgésicas y eufóricas de los opioides (Kieffer y cols., 1994; Matthes y cols., 1996; Rogers, 2020).

Los MOR son activados por sus ligandos, produciéndose una fosforilación de este receptor que actúa sobre proteínas intracelulares y que da lugar a la intrusión de los receptores dentro del citoplasma celular. Algunos de estos receptores pueden volver a la membrana para ser de nuevo activados, e incluso pueden mantenerse en el interior o generar tolerancia (Von Zastrow y cols., 2003; Charbogne y cols., 2014; Roman-Vendrell y Yudowski, 2015). Los ligandos endógenos principales de este tipo de receptores son las endorfinas, y el agonista exógeno principal es la morfina. Este tipo de receptores son los que poseen mayor capacidad de generar dependencia, de ahí que la morfina sea una sustancia tan adictiva (Álvarez y Farré, 2005).

Los MOR pueden tener también un efecto inhibitorio que, como consecuencia del bloqueo de la excitabilidad de las neuronas, da lugar a una disminución de la sensibilidad al dolor, aumento del estreñimiento, depresión respiratoria o dependencia física (Roman-Vendrell y Yudowski, 2015). Además, los MOR tienen relación con la aparición de estímulos de recompensa (Moles y cols., 2004), lo que ha sido demostrado previamente mediante estudios farmacológicos intracraneales (Le Merrer y cols., 2009).

En relación con el estrés, la activación de los MOR juega un papel fundamental en su control, puesto que es capaz de inhibir la liberación de noradrenalina (NA) en el Locus Coeruleus (LC), disminuyendo la aparición de estrés asociada a la corticotropina. Además, los MOR también están relacionados con cambios en el centro de recompensa en el área tegmental ventral (VTA), puesto que la activación de estos receptores provoca la disminución del ácido gamma-aminobutírico (GABA) y la consecuente activación de dopamina (DA), responsable de los efectos gratificantes de los opiáceos y del resto de sustancias de abuso (Charbogne y cols., 2012; Toubia y Khalife, 2019; Volkow y cols., 2019; Dhaliwal y Gupta, 2023).

Los KOR tienen un proceso de activación similar a los MOR, que consiste en su fosforilación, lo que provoca una posterior inhibición neuronal (Roman-Vendrell y Yudowski, 2015), que afecta al aparato digestivo, a la diuresis renal, y al sistema endocrino. Los KOR pueden ser activados por distintas vías de señalización intracelular como consecuencia del estrés, pudiendo contribuir a la aparición de estados depresivos (Al-Hasani y cols., 2013a; Zhang y cols., 2023a). Por ello, estos receptores se consideran una pieza clave para los nuevos tratamientos antidepresivos y ansiolíticos (Walsh y cols., 2001; Knoll y Carlezon, 2010). En este sentido, se ha observado que, administrando antagonistas de KOR de manera previa a la instauración del estrés, se pueden eliminar las consecuencias conductuales negativas que va a generar éste (McLaughlin y cols., 2006; Redila y Chavkin, 2008; Land y cols., 2008; Sperling y cols., 2010; Jackson y cols., 2013). Además, estudios previos han demostrado una interacción entre los sistemas noradrenérgicos y los KOR (Al-Hasani y cols., 2013b).

Por último, los DOR también se activan mediante fosforilación y esta activación está relacionada con la aparición de emociones como la ansiedad y con la pérdida de sensaciones nociceptivas como la sensación de frío o calor. Por ejemplo, las metencefalinas y leuencefalinas son péptidos opioides que reducen la ansiedad mediante activación de los DOR (Nieto y cols., 2005). Se ha postulado que los agonistas selectivos de DOR provocan una disminución en los comportamientos ansiosos y modulan las distintas respuestas frente a estímulos estresantes (Nieto y cols., 2005; Saitoh y cols., 2005; Perrine y cols., 2006; Perrine y cols., 2008; Nunes y cols., 2010). Además, se ha observado que la infusión directa del agonista selectivo de DOR en la amígdala reduce los comportamientos similares a la ansiedad, tanto basales como inducidos por el estrés (Nunes y cols., 2010). Por el contrario, la delección del gen para el DOR (Filliol y cols., 2000) o la administración de antagonistas selectivos de DOR (Saitoh y cols., 2005; Perrine y cols., 2006) aumenta las respuestas similares a la ansiedad, lo que sugiere la implicación de este receptor en la aparición de la sintomatología relacionada con la ansiedad y el estrés.

Por tanto, la unión de los opioides a sus receptores puede producir un estado de euforia y terminar provocando una adicción. Además, el uso de opioides sintéticos, como el fentanilo, que tiene mayor efecto que los opioides puros, puede generar con mayor facilidad dependencia física y sobredosis, como se está viendo en Estados Unidos en los últimos años. Este consumo no se produce simplemente de forma recreativa, puesto que

también se ha experimentado un aumento del consumo de este tipo de opioides bajo prescripción médica (Hu y cols., 2017; Peck y cols., 2019).

Para situarnos mejor en el contexto de la dependencia de opioides en un país desarrollado como es Estados Unidos, se pueden diferenciar cuatro olas de consumo masivo de opiáceos en la historia moderna de este país. La primera gran crisis de consumo de estas sustancias data de 1910, cuando se empezó a prescribir la heroína como fármaco para el tratamiento de la tos, aunque hasta 1914 no requería receta médica. La diferencia de precio con respecto a la cocaína hizo que esta sustancia se usara con fines criminales en términos de adicción hasta 1924, cuando terminó siendo prohibida por el Estado. A partir de 1986, se produce un aumento en el consumo de morfina como tratamiento del dolor crónico mediante prescripción médica, aunque ese no fue el problema, ya que el verdadero aumento del consumo de estas sustancias se produjo de manera ilegal. En 1995 se produce la aprobación por la FDA de Oxycotyn® de Purdue Pharma, lo que generó una sobreprescripción de este medicamento para el tratamiento del dolor, y dio lugar a una nueva ola de adicción a opiáceos (Regueras y López-Guzmán, 2021). Actualmente, debido al aumento en la prescripción de opiáceos para el dolor y el consumo de fentanilo, que se puede conseguir de forma ilegal y a bajo precio, se está experimentando una nueva ola en el consumo de opiáceos (CDC, 2023).

1.2. PREVALENCIA DE CONSUMO DE OPIÁCEOS

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), la adicción a sustancias de abuso o drogas es un estado de salud que representa una afección tanto física como psicoemocional que induce una dependencia o necesidad hacia una sustancia, actividad o relación específica. Se caracteriza por la presencia de diversos signos y síntomas, involucrando factores biológicos, genéticos, psicológicos y sociales (WHO, 1994).

La dependencia de sustancias de abuso es una de las principales preocupaciones en la sociedad desarrollada, puesto que supone un gran problema y un importante gasto para la salud pública. En ocasiones, el consumo de estas sustancias comienza en edades tempranas, perpetuándose con el paso de los años, y aun siendo conscientes estas personas de los perjuicios que acarrearán, siguen consumiéndolas con fines ociosos, en muchos casos para evitar las consecuencias negativas que sufren cuando se cesa el consumo.

En los últimos años se ha experimentado un aumento del consumo de heroína en el mundo occidental, lo que representa un severo problema debido a las consecuencias

negativas para la salud y al aumento de conductas delictivas (Upp y Waljee, 2020). Por ejemplo, el uso inadecuado de opiáceos se ha convertido en el segundo mayor problema en consumo de sustancias de abuso que se contabiliza en Estados Unidos, donde provoca cerca de 15.000 muertes al año por sobredosis. Se ha sugerido que los adultos jóvenes (entre 18 y 25 años) tienen un mayor riesgo de caer en este consumo (7.6%) y de desarrollar adicción, en comparación con los adolescentes de 12 a 17 años (4.8%), o adultos de 26 a 34 (6.0%) (Hu y cols., 2017; Peck y cols., 2019).

Según el último Informe Europeo sobre Drogas 2021 elaborado por el Observatorio Europeo de las Drogas y las Toxicomanías (EMCDDA, 2021), el consumo de opiáceos en España se ha mantenido estable en los últimos años. En 2019, se estimaba que alrededor de 49.000 personas consumieron opioides (incluyendo heroína y otros opioides como el fentanilo) al menos una vez en el último año, lo que representa una tasa de prevalencia del 0,1% de la población adulta española.

Según el Informe 2021 de alcohol, tabaco y drogas ilegales en España, realizado por el Observatorio Español de las Drogas y las Adicciones (OEDA), el 15.2% de la población española de entre 15 y 64 años afirmó haber consumido analgésicos opioides en algún momento, ya sea con receta médica o sin ella. Los resultados mostraron que el consumo de estas sustancias es más común entre las mujeres que entre los hombres, y que su prevalencia aumenta en ambos sexos a medida que aumenta la edad. Además, se observó un aumento en la prevalencia de consumo tanto en hombres como en mujeres en los últimos años (OEDA, 2021).

Otro hecho que genera un mayor número de personas con dependencia a estas sustancias es el tratamiento farmacológico con fármacos opiáceos. En los últimos años, el consumo de fármacos opiáceos en España ha pasado de 7.25 dosis diarias por 1.000 habitantes y día (DHD) en el año 2008 a 13.31 DHD en el año 2015, lo que supone un incremento del 83.59% (AEMPS, 2017). La prevalencia de uso de estos medicamentos según el boletín INFAC (del Centro Vasco de Información del Medicamento) era de más del 1% de la población en el año 2014. El cuestionario EDADES de 2022 del Plan Nacional sobre Drogas recoge encuestas dirigidas al consumo específico de analgésicos opioides debido al aumento crítico experimentado, como se ha comentado anteriormente, registrando que un 15.8% de la población española (entre 16 y 64 años) ha consumido algún analgésico opioide alguna vez en su vida, y un 6.8% en el último año (Tabla 1),

siendo el tramadol (46.0%) y la codeína (59.9%) los más consumidos, seguidos de fentanilo (14.0%) y morfina (6.9%) (Tabla 2).

	2018			2020			2022		
	Total	Hombre	Mujer	Total	Hombre	Mujer	Total	Hombre	Mujer
Alguna vez en la vida	14,5	13,1	16,0	15,2	14,1	16,2	15,8	14,7	16,9
Últimos 12 meses	6,7	5,9	7,4	7,1	6,2	8,1	6,8	5,8	7,9
Últimos 30 días	2,9	2,3	3,4	3,6	3,0	4,3	4,0	3,1	4,8

Tabla 1. Comparativa del consumo de opiáceos en la población entre 15-64 años, entre 2018 y 2022. Modificado de Encuesta sobre alcohol y otras drogas en España (EDADES) (OEDA, 2023).

	2018			2020			2022		
	T	H	M	T	H	M	T	H	M
Tramadol	35,5	34,8	36,2	50,0	47,3	52,3	46,0	46,5	45,6
Codeína	69,2	69,9	68,7	54,6	54,4	54,9	59,9	58,8	60,9
Morfina	14,7	15,2	14,3	13,9	16,0	11,9	6,9	7,5	6,4
Fentanilo	1,9	2,5	1,4	3,6	4,4	2,9	14,0	14,7	13,4
Otros*	6,1	6,2	6,1	14,2	14,9	13,6	14,4	17,0	12,2

Tabla 2. Consumo de tramadol, codeína, morfina y fentanilo en la población de 15-64 años según sexo (%). Modificado de encuesta sobre alcohol y otras drogas en España (EDADES) (OEDA, 2023).

El consumo de sustancias de abuso en 2022 en España está encabezado por las bebidas alcohólicas (76.4%), seguido del consumo de tabaco (39.0%). Entre las drogas ilegales, el cannabis es la más consumida (10.6%) mientras que la exposición a opioides sin receta médica (0.6%) representa una pequeña parte, aunque el aumento del consumo de analgésicos opioides (6.8%) y de otras sustancias, como la cocaína (2,4%), supone un riesgo para la salud pública (Tabla 3).

	1995	1997	1999	2001	2003	2005	2007	2009	2011	2013	2015	2018	2020	2022
Tabaco	-	46,8	44,7	46,0	47,8	42,4	41,7	42,8	40,2	40,7	40,2	40,9	39,4	39,0
Alcohol	68,5	78,5	75,2	78,1	76,6	76,7	72,9	78,7	76,6	78,3	77,6	75,2	77,2	76,4
Hipnosedantes con o sin receta	-	-	-	-	-	5,1	8,6	7,1	11,4	12,2	12,0	11,1	12,0	13,1
Hipnosedantes sin receta	12,3	2,3	2,3	2,8	3,1	1,2	1,3	1,9	1,2	1,2	2,3	1,3	1,3	1,3
Opioides con o sin receta	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6,7	7,1	6,8
Opioides sin receta	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,6	0,6
Cannabis	7,5	7,7	7,0	9,2	11,3	11,2	10,1	10,6	9,6	9,2	9,5	11,0	10,5	10,6
Éxtasis	1,3	0,9	0,8	1,8	1,4	1,2	1,1	0,8	0,7	0,7	0,6	0,6	0,9	0,8
Alucinógenos	0,8	0,9	0,6	0,7	0,6	0,7	0,6	0,5	0,4	0,3	0,6	0,4	0,6	0,6
Anfetaminas	1,0	0,9	0,7	1,1	0,8	1,0	0,9	0,6	0,6	0,6	0,5	0,5	0,7	0,6
Cocaína polvo y/o base	-	-	-	-	-	-	3,1	2,7	2,3	2,2	2,0	2,2	2,5	2,4
Cocaína en polvo	1,8	1,6	1,6	2,5	2,7	3,0	3,0	2,6	2,2	2,1	1,9	2,0	2,5	2,3
Cocaína base	0,1	0,1	0,2	0,1	0,1	0,2	0,5	0,1	0,2	0,1	0,2	0,3	0,2	0,2

Tabla 3. Consumo de sustancias de abuso en la población entre 15-65 años (%). España 2022. Modificado de encuesta sobre alcohol y otras drogas en España (EDADES) (OEDA, 2023).

1.3. NEUROBIOLOGÍA DE LA ADICCIÓN

La adicción a drogas es una patología y, como tal, aparece definida y clasificada en el Manual Diagnóstico y Estadístico de los Trastornos Mentales (DSM-V). Se considera que un individuo se encuentra en un estado de dependencia cuando se recogen 3 o más de los hechos especificados en la Tabla 4 durante más de 12 meses.

A.1.	Consumo frecuente de cantidades superiores o durante más tiempo del previsto.
A.2.	Deseo persistente de abandonar o controlar el consumo, o fracaso en los esfuerzos por lograrlo.
A.3.	Mucho tiempo invertido en actividades relacionadas con el consumo (conseguir drogas, consumirlas o recuperarse de sus efectos).
A.4.	<i>Craving</i> o poderoso deseo o necesidad de consumir.
A.5.	Incumplimiento de los deberes fundamentales en el trabajo, la escuela o el hogar debido al consumo reiterado.
A.6.	Consumo continuado a pesar de sus consecuencias negativas sociales o interpersonales.
A.7.	Abandono o reducción importante de actividades sociales, profesionales o de ocio.
A.8.	Consumo recurrente en situaciones que conllevan riesgo físico.
A.9.	Consumo mantenido a pesar de saber que se sufren problemas físicos o psicológicos relacionado con el consumo.
A.10.	Tolerancia.
A.11.	Abstinencia.

Tabla 4. Criterios diagnósticos del trastorno por consumo de sustancias.

Anteriormente, se ha definido la adicción a sustancias de abuso como el estado en el cual una persona siente la necesidad de seguir consumiendo, pese a conocer las consecuencias negativas de dicho consumo, perdiendo el interés por todo aquello que no sea seguir consumiendo y el control en el consumo de la sustancia. Además, es común la aparición de recaídas, incluso mucho tiempo después de haber consumido por última vez (Sordo y cols., 2017). Sin embargo, existen otras características importantes en esta patología, como algunas de las reflejadas en el DSM-V, por ejemplo, la tolerancia. Este término se corresponde con la necesidad de aumentar la dosis o el número de veces que

se consume la sustancia para conseguir el efecto deseado, debido a que el consumo prolongado en el tiempo disminuye el efecto. Esto contribuye a que una persona no se dé cuenta de que es adicto, ya que este aumento en el consumo es paulatino. La tolerancia que tiene lugar con el consumo repetido también lleva a que los adictos, para aumentar la sensación placentera causada por la droga, cambien la vía de administración habitual a otras vías en la que el efecto sea más rápido, como la nasal o intravenosa (Colvin y cols., 2019).

La abstinencia es el estado aversivo negativo que se produce tras el cese del consumo, caracterizado por depresión, disforia, estrés e insomnio, que lleva al sujeto a perpetuar el consumo para eliminar o aliviar estos síntomas. Se considera que la abstinencia es un reforzador negativo del estado adictivo, puesto que la sintomatología negativa que produce el cese en el consumo lleva a seguir consumiendo (Nguyen y cols., 2021).

La búsqueda compulsiva y el consumo repetido de sustancias de abuso da lugar en muchos casos a no poder atender las responsabilidades y obligaciones en los distintos ámbitos de la vida, junto al peligro inminente que conlleva el propio consumo. En muchas ocasiones los individuos que consumen se ven envueltos en problemas de tipo legal y siguen consumiendo, a pesar de que le causan problemas con su entorno social y familiar (ASAM, 2010; Uhl y cols., 2019).

Además, como se ha comentado, incluso años después de haber cesado el consumo, las recaídas son frecuentes cuando los adictos encuentran estímulos asociados al primer contacto con la droga (De Wit, 1996; O'Brien, 1997; De Vries y Shippenberg, 2002), provocando en el sujeto un deseo incontrolable de volver a consumir denominado *craving*. Estas alteraciones de comportamiento se han relacionado con plasticidad neuronal y alteraciones de regiones cerebrales que median los procesos de recompensa y estrés (Nestler, 2013).

Es difícil cuantificar el *craving* en animales de laboratorio, pero sí es posible determinar la aparición de recaídas en el consumo mediante algunos protocolos experimentales, por ejemplo, mediante modelos de experimentación conductuales desarrollados para animales dependientes y no dependientes, como pueden ser aquellos que desarrollan preferencia o aversión de lugar, o los modelos de auto-administración (Carrol y Comer, 1996). Si tras la extinción de un determinado comportamiento éste

aparece nuevamente, puede considerarse que esta recuperación de la respuesta aprendida se asemeja a la reinducción del *craving* y, por tanto, a la recaída en la búsqueda y en el consumo de la droga (Ribeiro Do Couto, 2006).

1.3.1. Factores genéticos y adicción

La vulnerabilidad para el desarrollo de adicción a sustancias de abuso está relacionada con varios factores, entre ellos, la predisposición genética (Ibañez-Cuadrado, 2008), aunque también hay que tener en cuenta el contexto social y psicológico del individuo en el momento del consumo (Goldman y cols., 2005; Kendler y cols., 2007; Volkow y cols., 2008).

La aparición de la epigenética y su desarrollo ha permitido seguir conociendo los mecanismos implicados en la dependencia de sustancias de abuso. La epigenética comprende las modificaciones celulares que se producen sin cambios en el ácido desoxirribonucleico (ADN) por la modificación de genes. Estas alteraciones se producen sobre las histonas, generando los cambios en la estructura de la cromatina y de la secuencia de ADN (Robison y Nestler, 2011).

Las histonas son proteínas de bajo peso molecular que envuelven el ADN, dando forma a los cromosomas, y su metilación regula la transcripción de ciertos genes. Estas proteínas también se pueden activar por la acetilación o fosforilación (Gingeras, 2007). Por ejemplo, se ha observado una acetilación de la histona H4 tras una exposición repetida a cocaína (Goldberg y cols., 2007; González y cols., 2020). Del mismo modo, otros autores han observado que la administración de inhibidores de histonas desacetilasas (HDAC) en el núcleo accumbens (NAc) influye en los procesos de comportamiento asociado al consumo de opiáceos (Kumar y cols., 2005; Renthall y cols., 2007; McQuown y Wood, 2011). Además, hay ciertos núcleos cerebrales como NAc o el núcleo estriado dorsal en los que, tras el consumo de cocaína, se han producido metilaciones de ADN que han derivado en un aumento en la expresión de ciertos genes que están relacionados con los procesos de adicción (Cassel y cols., 2006; Host y cols., 2011).

Estudios previos de nuestro grupo de investigación y otros demuestran que la adicción a sustancias de abuso puede afectar a la expresión de genes (Nurr1, Pitx3, proBDNF o Ago2), provocando así cambios irreversibles (Gracia-Rubio y cols., 2016; Montagud-Romero y cols., 2017).

Estudios recientes, también han demostrado que el consumo de opioides produce modificaciones en la expresión de genes como el gen de respuesta de crecimiento temprano 1 (EGR-1) (Méndez y cols., 2023). Este factor de transcripción ha sido relacionado directamente con la plasticidad neuronal (Knapska y Kacmarek, 2004) y, participa de forma importante en el aprendizaje y la memoria (Sun y cols., 2019).

1.3.2. Plasticidad neuronal

El consumo de sustancias de abuso provoca que el cerebro realice una serie de adaptaciones y compensaciones que forman parte de la regulación u homeostasis cerebral, y que, en este caso, supone una adaptación estructural y funcional de las neuronas, creando nuevas rutas de comunicación entre ellas. Esto es lo que se conoce como plasticidad neuronal (Nestler, 2013).

Esta regulación fisiológica, que dista de ser la homeostasis más frecuente y habitual, da lugar a la aparición de los mecanismos de tolerancia y dependencia (Koob y Le Moal, 1997; Koob y cols., 2004), generando los signos y síntomas derivados del síndrome de abstinencia o la retirada de la sustancia de abuso (Nestler, 2013). Hay distintas vías de señalización intracelular implicadas en la aparición de estos fenómenos. Por ejemplo, el factor de unión al AMPc (CREB) está involucrado en la aparición de plasticidad sináptica a nivel de las neuronas de NAc (Dong y cols., 2006). Además, el consumo crónico de sustancias opiáceas puede aumentar la neuroplasticidad de las neuronas noradrenérgicas del LC (Kogan y cols., 1992; San Juan Sanz, 2019).

Los microARN son secuencias de ARN (Ácido ribonucleico) de pequeño tamaño que regulan la expresión de genes implicados en el proceso de adicción (Kim y Nam, 2006). Cambios en los microARN pueden dar lugar a modificaciones en la plasticidad neuronal, es decir, cronificación de los cambios producidos por la droga.

Existen diversos estudios que demuestran una relación directa entre el consumo crónico de morfina, y otros opiáceos, con la regulación de la plasticidad neuronal en distintos núcleos o regiones del cerebro como el hipocampo (Heidari y cols., 2013; Song y cols., 2019), en el sistema mesocorticolímbico (Goins y Bajic, 2018), en regiones noradrenérgicas (Inoue y cols., 2003), o en la amígdala extendida (Zhang y cols., 2023b), así como, en la corteza prefrontal (CPF) (Shen y cols 2011).

1.3.3. Etapas de la adicción y circuitos implicados

El consumo de sustancias de abuso está asociado a distintos factores o situaciones laborales, económicas o sociales (Nagelhout y cols., 2017). En muchas ocasiones, el consumo comienza siendo puntual, pasando a ser crónico al aumentar la intensidad y frecuencia y al buscar estas personas volver a experimentar la sensación placentera que el consumo les produce, siendo este hecho esencial para el desarrollo de la adicción.

Durante el proceso adictivo el sujeto pierde la voluntad de anular los actos inapropiados (Kalivas y Volkow, 2005), debido principalmente a una desregulación en el sistema de recompensa. Estos actos, que pueden tener connotaciones impulsivas o compulsivas, están precedidos de una sensación de tensión, ansiedad o estrés, que puede estar motivada por estímulos placenteros, como puede ser la exposición a la propia droga (refuerzos positivos), o por la retirada del estímulo (refuerzos negativos), así como la abstinencia a opioides (Koob y Volkow, 2010).

Las propiedades reforzadoras positivas son las que llevan a los sujetos a iniciarse en el ciclo de la adicción a sustancias de abuso, puesto que buscan volver a experimentar las sensaciones placenteras de los primeros consumos. En esta etapa, las personas consumen para experimentar las propiedades positivas de las drogas. Además, las sustancias de abuso son capaces de producir fenómenos de consolidación de la memoria, y se van a realizar asociaciones en el cerebro entre consumo y ambiente, lugares o gente con la que se realice el consumo. Además, se producen diversas adaptaciones celulares y moleculares que estarían detrás del desarrollo de dependencia, y que nos adentrarían en la segunda etapa del ciclo de la adicción, ya que el proceso adictivo se puede dividir en tres fases (Koob y Zorrilla, 2010) (Figura 1):

- 1) Inicio (Fase de consumo agudo/intoxicación): se refiere a mecanismos de recompensa basados en incentivos. El consumo puntual de la droga se produce como una acción impulsiva que ejerce un efecto placentero (refuerzo positivo). Los beneficios de este aprendizaje son considerados como puerta a la cronicidad.
- 2) Mantenimiento (Fase de abstinencia/efecto negativo): el cese del consumo de la sustancia de abuso produce una serie de efectos aversivos tanto psicológicos como fisiológicos que actúan como reforzadores negativos. Para evitar esta sintomatología negativa se perpetúa el consumo. El sujeto ya no consume por los

efectos positivos de la sustancia de abuso, sino para evitar la aparición de los efectos negativos.

- 3) **Recaída (Fase de preocupación/anticipación):** Tras el cese del consumo y debido a una serie de estímulos, situaciones de estrés o recuerdos, se produce la búsqueda compulsiva de la droga o *craving*, llegando el sujeto a cometer actos compulsivos que pueden influir en su día a día. Esta fase tiene lugar, entre otras razones, debido a los procesos de consolidación de la memoria que tienen lugar durante la primera etapa de la adicción.

1.3.3.1. Primera etapa: Consumo agudo/intoxicación

El sistema cerebral que interviene en la primera etapa de la adicción es el sistema dopaminérgico mesocorticolímbico o vías de recompensa (Koob y Le Moal, 1997) (Figura 2), cuya principal conexión nace de VTA, núcleo donde se encuentran la mayor concentración de neuronas de DA, hacia la CPF y NAc, donde tiene lugar la principal liberación del neurotransmisor DA (Robbins y Everitt, 1996; Wise, 1996; Hyman y Malenka, 2001; Di Chiara y Bassareo, 2007; Bittar y Labonté, 2021; McCarthy, 2022). La DA y los péptidos opioides son los principales neurotransmisores del sistema dopaminérgico implicados en esta etapa.

Todas las sustancias de abuso comparten un hecho, y es que son capaces de activar el sistema mesocorticolímbico aumentando la cantidad de DA liberada en NAc, y produciendo así un refuerzo positivo que facilita la instauración de la adicción (Wise, 1996; Robbins y Everitt, 1996; Di Chiara, 1999; Hyman y Malenka, 2001; Di Chiara y Bassareo, 2007; Feltenstein y See, 2008; Navarro-Zaragoza y cols., 2012). Por otro lado, la activación del sistema dopaminérgico produce una inhibición en las neuronas de GABA, dando lugar a un aumento de la cantidad y actividad dopaminérgica en VTA, aumentando así la liberación de DA en NAc (Di Chiara e Imperato, 1986).

En estos primeros pasos en la adicción, NAc y el núcleo pálido ventral tienen mayor peso, y amígdala e hipocampo van aumentando su importancia en los consumos repetidos, ya que están implicados en el aprendizaje del consumo (Volkow y Li, 2005; Scofield y cols., 2016) y permiten establecer relaciones entre consumo y memoria (Di Chiara, 1999).

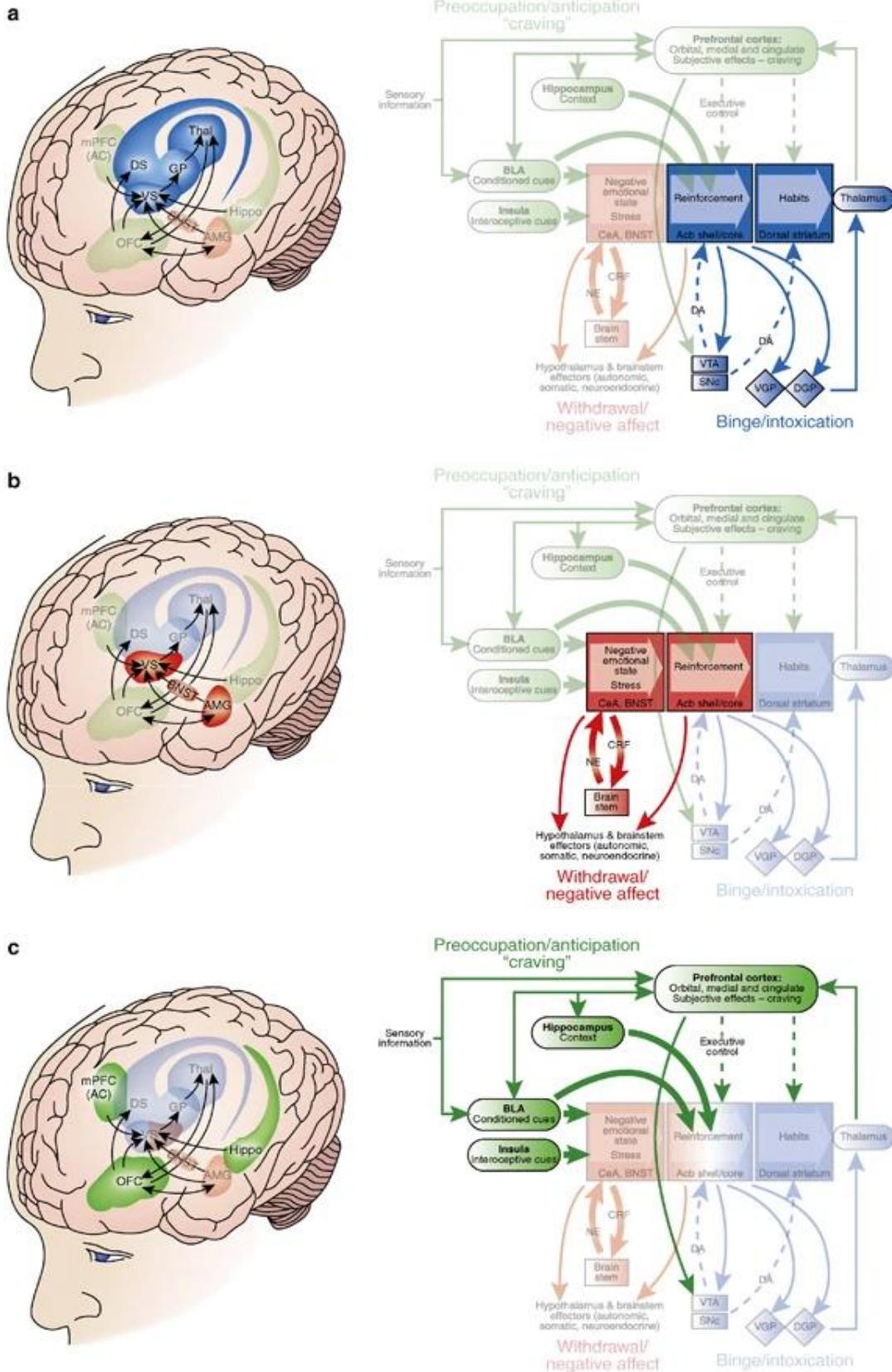


Figura 1. Las tres etapas de la adicción: (a) Consumo agudo / intoxicación. (b) Abstinencia / efecto negativo. (c) Preocupación / anticipación. Flechas verdes / azules, proyecciones glutamatérgicas; flechas naranjas, proyecciones dopaminérgicas; flechas rosadas, proyecciones GABAérgicas; Acb, núcleo accumbens; BLA, amígdala basolateral; VTA, área tegmental ventral; SNc, substantia nigra pars compacta;

VGP, globo pálido ventral; DGP, globo pálido dorsal; BNST, núcleo del lecho de la estría terminal; CeA, núcleo central de la amígdala; NE, noradrenalina; CRF, factor de liberación de corticotropina; PIT, transferencia instrumental pavloviana. Modificada de Koob y Volkow, 2010.

Previamente se han realizado estudios con animales que demuestran un incremento en la actividad del sistema dopaminérgico en el inicio del consumo de opiáceos (Di Chiara e Imperato, 1986; Rougé-Pont y cols., 2002), lo que coincide con el inicio de la primera etapa del proceso adictivo (Nestler y Aghajanian, 1997; Corominas y cols., 2007).

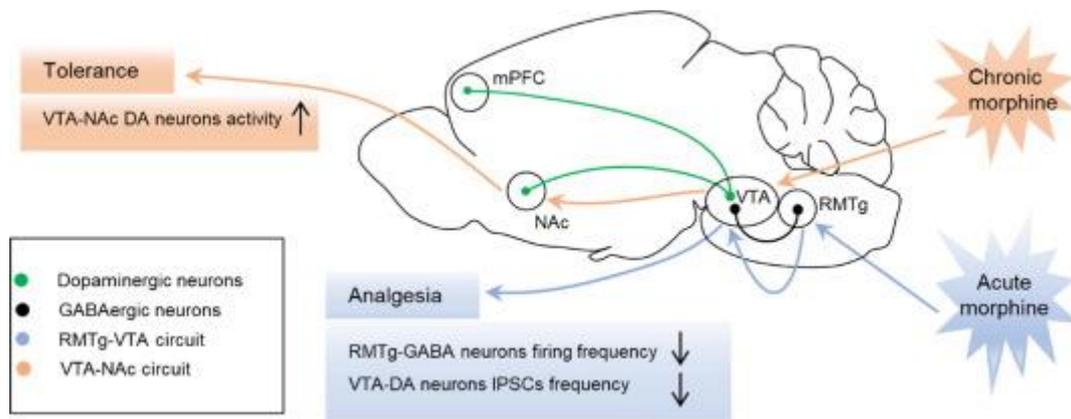


Figura 2. Circuitos neuronales y neurotransmisores implicados en la adicción: El núcleo tegmental rostromedial (RMTg) ejerce un papel crucial al proporcionar la principal entrada inhibitoria al área tegmentaria ventral (VTA). En respuesta a estímulos, VTA procesa principalmente la información mediante proyecciones dopaminérgicas hacia la corteza prefrontal medial (mCPF) y el núcleo accumbens (NAc). Es importante destacar que la mCPF representa la corteza prefrontal medial, mientras que NAc representa el núcleo accumbens. La dopamina (DA) y las corrientes postsinápticas inhibitorias (IPSC) están implicadas en este circuito. Las flechas hacia arriba indican una mayor actividad, mientras que las flechas hacia abajo señalan una frecuencia reducida. Tomada de Wang J y cols., (2023).

El sistema dopaminérgico presenta una serie de receptores para acoplar los distintos tipos de ligandos con los que interactúa, los receptores dopaminérgicos. Los principales receptores de este sistema son (Figura 3): el receptor D1, acoplado a la proteína G_s, que expresa los subtipos D1 y D5; y el receptor D2, acoplado a la proteína G_i o G_o, que expresa los subtipos D2, D3 o D4 (Surmeier y cols., 1996). La DA actúa sobre los receptores D2 desencadenando una inhibición sobre las neuronas de NAc (White y Wang, 1986; Lin y cols., 1996; O'Donnell y Grace, 1996), y se ha demostrado que está directamente relacionado con la vía de señalización de CREB (Wang y cols., 2021). Por lo tanto, los antagonistas del receptor D2 promueven una activación directa de estas neuronas. La estimulación del receptor D1 potencia el impulso glutamatérgico (Cepeda y Kitai, 1998; Chergui y Lacey, 1999; West y Grace, 2002) y, de forma opuesta,

los antagonistas D1 contribuyen en la disminución de la excitabilidad de las células (West y Grace, 2002). Tanto los receptores D1 como D3 se expresan en las zonas dopaminérgicas del sistema mesolímbico (Yan y cols., 2014), por ello, en algunos núcleos con una mayor expresión de uno de los dos tipos generales de receptor, no se genera la respuesta esperada (Sesack y Grace, 2010). Estudios recientes demuestran la implicación del receptor D4 en la adicción a morfina (Bartenev y cols., 2020).

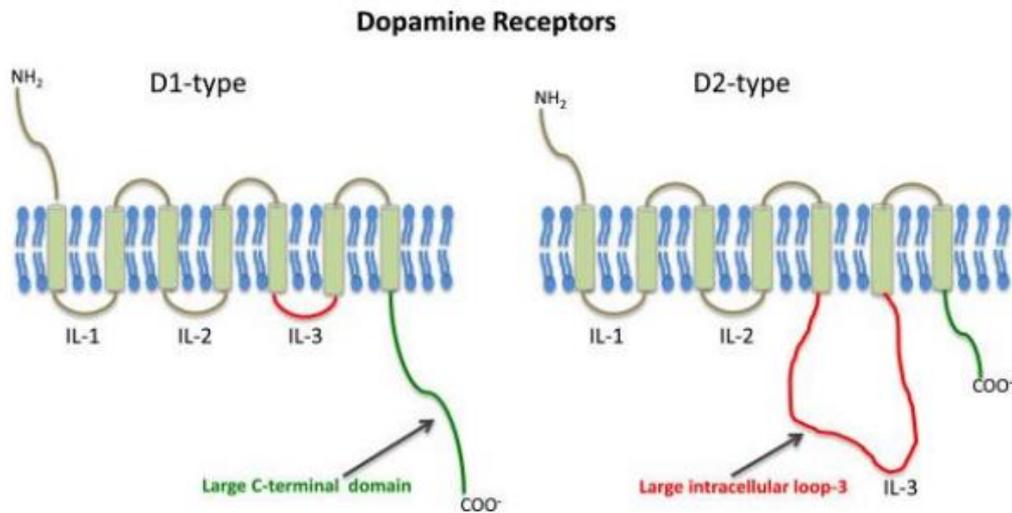


Figura 3. Subfamilias de receptores de dopamina D1 y D2. Tomada de Pandey y cols., 2013.

La DA y sus neuronas presentes en VTA están relacionadas directamente con las conductas de aprendizaje (Horvitz, 2000; Wise, 2004; Fields y cols., 2007; Ikemoto, 2007; Schultz, 2007; Redgrave y cols., 2008) y ocupan más de la mitad de la población de neuronas presentes en VTA (Swanson, 1982; Nair-Roberts y cols., 2008), por lo que tienen muchas dianas y desencadenan diversos procesos importantes en esta etapa (García-Carmona, 2015).

En VTA, la administración de morfina y del resto de opiáceos desencadena un aumento de la liberación de DA en el prosencéfalo, actuando como refuerzo para establecer un estímulo positivo para la búsqueda compulsiva de la droga o la autoadministración (Russo y cols., 2007; Langlois y cols., 2017). Estos opiáceos, también en VTA, pueden producir una inhibición de las neuronas GABA y de las neuronas de DA, provocando efectos estimulantes.

1.3.3.2. Segunda etapa: Cronificación

El estrés es la respuesta natural de los organismos vivos frente a las alteraciones ambientales. La actuación frente a un estímulo estresante y una adecuada cesación de este estrés es muy importante para la supervivencia de un organismo. Pese a que el estrés tiene un rol negativo en la sociedad actual, esto no es real, ya que esta respuesta de estrés permite al individuo entrar en un estado de alerta y adaptarse a determinadas situaciones y hacer frente a las alteraciones, ya sean reales o percibidas (Charmandari y cols., 2005; Oyola y Handa, 2017).

En esta etapa se produce una activación de los núcleos que componen el sistema cerebral del estrés hipotalámico o eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (HHA), así como del sistema del estrés extrahipotalámico, constituido por la amígdala extendida (prosencéfalo, núcleo de la amígdala central (CeA), núcleo de la estría terminal (BNST) y corteza de NAc), y tiene lugar la aparición de los efectos reforzadores negativos mediados por dos neurotransmisores, el factor liberador de Corticotropina (CRF) y la NA. Estos sistemas están interconectados, ya que desde la amígdala extendida se producen aferencias hacia el hipotálamo o el encéfalo.

El estado aversivo negativo conocido como síndrome de abstinencia se caracteriza por una disminución de la actividad dopaminérgica mesocorticolímbica (Koob y Volkow, 2010), junto con una activación del sistema cerebral del estrés. Además, se produce una activación del sistema noradrenérgico y de otras sustancias o mediadores.

En esta etapa del proceso adictivo se produce una falta objetiva de interés frente a estímulos que no estén relacionados con el consumo de la droga, desviando la atención del entorno laboral o familiar, mientras que aumenta el énfasis en todo lo que tenga que ver con la administración de sustancias de abuso (García-Carmona, 2015).

1.3.3.3. Tercera etapa: Recaídas

La recaída es uno de los mayores peligros que tiene la adicción a sustancias de abuso, puesto que incluso años y años después de un último consumo, la vulnerabilidad a la recaída perdura, y se puede volver a experimentar la necesidad de consumir debido a distintas situaciones en las que se encuentran estímulos como la reexposición a la droga (Koob y Volkow, 2010), estímulos ambientales asociados al consumo de drogas (De Wit, 1996; Swendsen y Le Moal, 2011), o situaciones de estrés (Carrol y cols., 1996; Cepeda

y cols., 2012; Enoch, 2012). Concretamente, el estrés es considerado como un factor determinante de las recaídas en sujetos que han abandonado el consumo, así como en el inicio y mantenimiento de la adicción.

En esta etapa intervienen núcleos límbicos y el hipocampo, núcleos cerebrales vinculados con la memoria y la asociación de recuerdos (Ahrens y cols., 2018). La puesta en marcha de los mecanismos correspondientes a esta etapa es ejecutada por la corteza prefrontal, que es la encargada de la toma de decisiones, y que controla el deseo irrefrenable de consumo (*craving*). Por tanto, se ha sugerido que la activación del sistema cerebral del estrés extrahipotalámico, o amígdala extendida, sería uno de los responsables de esta recaída (McFarland y Kalivas, 2001; Ahrens y cols., 2018).

En el proceso de recaída intervienen proyecciones dopaminérgicas desde VTA a la corteza prefrontal, la activación glutamatérgica por la influencia de la CPF sobre NAc, y la proyección del neurotransmisor GABA desde NAc hacia el pálido ventral (Kalivas y O'Brien, 2008).

Por otro lado, las recaídas asociadas a los estímulos estresantes dependen de la hormona CRF, puesto que se relaciona con estados emocionales negativos (Valdez y cols., 2002; Valdez y Koob, 2004), y con NA, oxitocina y vasopresina en la amígdala extendida (Erb y cols., 1998; Shalev y cols., 2002; Shaham y cols., 2003; Zanos y cols., 2014).

1.3.3.3.1. Sistema cerebral del estrés

El sistema cerebral del estrés es un complejo entramado que puede dividirse en dos componentes principales, como se ha comentado anteriormente: el sistema cerebral del estrés hipotalámico, también conocido como eje HHA, y el sistema cerebral del estrés extrahipotalámico.

Ambos sistemas están altamente interconectados, lo que permite una regulación bidireccional y coordinada de las respuestas al estrés. Desde la amígdala extendida, por ejemplo, se originan conexiones aferentes hacia el hipotálamo, facilitando la transmisión de señales de estrés a través de estas vías neurales. A su vez, el sistema hipotalámico, compuesto por el hipotálamo y la hipófisis, también juega un papel crítico en la respuesta al estrés, liberando hormonas reguladoras como el cortisol o la corticotropina, que influyen en diversas funciones corporales y emocionales.

Esta compleja red de circuitos neuronales proporciona la base para la adaptación y el control del estrés en el organismo, pero también puede dar lugar a desequilibrios y trastornos cuando la respuesta al estrés se vuelve crónica o disfuncional.

1.3.3.3.2. Sistema cerebral del estrés hipotalámico

El eje HHA (Figura 4) es un complejo sistema neuroendocrino que se encarga de la respuesta a los estímulos de estrés y está formado por tres estructuras importantes: PVN, en la región anterior y central del hipotálamo, la glándula pituitaria o hipófisis, en su lóbulo frontal o anterior, y la glándula adrenal o suprarrenal. PVN está dividido en dos regiones, la región magnocelular y la parvocelular. En la región parvocelular encontramos las neuronas de CRF, molécula compuesta por 41 aminoácidos, que es mediadora clave de las respuestas ante situaciones de estrés, mientras que en la región magnocelular se produce la síntesis de arginina-vasopresina y oxitocina. La zona medial parvocelular de PVN recoge las entradas neuronales para activar un grupo específico de células que producen y liberan CRF a la eminencia media. El CRF alcanza la glándula pituitaria anterior a través del sistema portal, y así estimula la producción y liberación de la hormona adrenocorticotropa (ACTH) al flujo sanguíneo. La llegada de la ACTH a la corteza adrenal indica el inicio de la síntesis de glucocorticoides (GC) (Rivier y Vale, 1985; Ulrich-Lai y Herman, 2009). Los GC se liberan de forma rápida a las células de la corteza adrenal, principalmente, cortisol en los humanos y corticosterona en roedores. Estos se unen a receptores mineralocorticoides (MR) y a receptores GC (GR) con mayor o menor afinidad para producir una respuesta ante los factores ambientales, ya sean reales o psicológicos (De Kloet, y cols., 2005; Reul y De Kloet, 1985).

Los GC presentan mayor afinidad por los MR cuando se encuentran en baja concentración en los animales. Sin embargo, cuando estas concentraciones son más elevadas, como en situaciones de estrés (Joëls y De Kloet, 1994), se unen preferentemente a GR.

La liberación de corticosterona y ACTH puede inhibir el eje HHA mediante un sistema de retroalimentación negativa, lo que lleva a una regulación autónoma del sistema. Esto son respuestas adaptativas que influyen las futuras respuestas del eje HHA (McEwen y Gianaros, 2010).

Los GR se localizan en las estructuras anatómicas que conforman los circuitos de recompensa. Así, niveles aumentados de GC son capaces de activar estos circuitos, observándose un aumento de DA en VTA durante el estrés crónico (Polter y Kauer, 2014; Holly y cols., 2015).

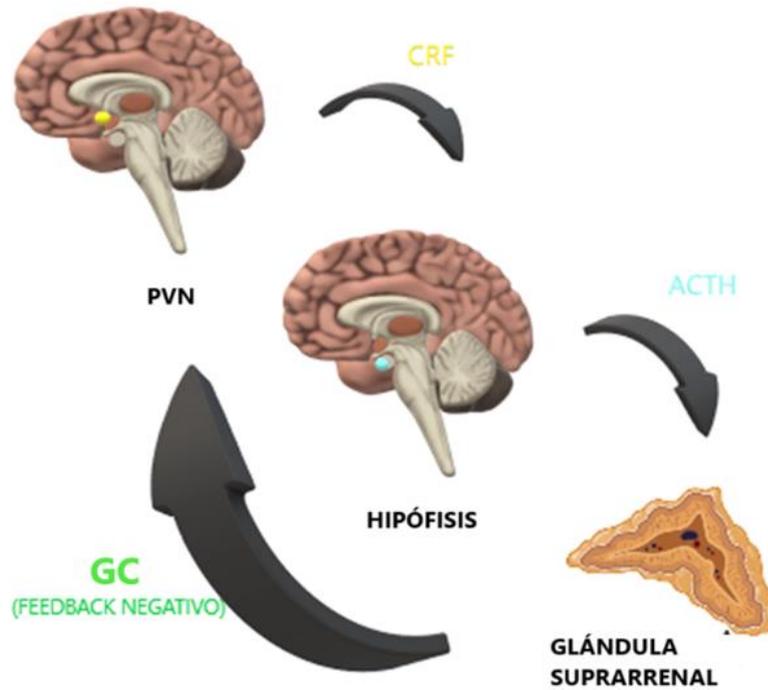


Figura 4. Eje hipotalámico-hipofisario-adrenal (HHA). Se produce factor liberador de corticotropina (CRF) en el núcleo paraventricular (PVN), que al llegar a la hipófisis estimula la formación y liberación de la hormona adrenocorticotropa (ACTH) a sangre, llegando a la glándula suprarrenal y promoviendo la síntesis de glucocorticoides (GC), que promueven un feedback negativo en el proceso.

Resultados previos de nuestro grupo de investigación demuestran que los GC están implicados en la aparición de los síntomas y signos negativos que tienen lugar durante el síndrome de abstinencia a morfina. También han propuesto un papel importante para estos receptores en la regulación de la liberación de los metabolitos de NA a nivel de PVN, o en la expresión de c-Fos en el núcleo del tracto solitario (NTS-A₂) (Laorden y cols., 2002). Finalmente, su activación podría regular distintas vías de señalización intracelular en las que participan factores de transcripción como CREB o las quinasas reguladas por señales extracelulares (ERK) (Navarro-Zaragoza y cols., 2012).

Las neuronas de CRF pueden realizar su función dentro del hipotálamo, regulando las funciones endocrinas, o fuera de este (Zorrilla y cols., 2014). La mayoría de las neuronas de CRF se encuentran en PVN en zonas que poseen vías eferentes para la hipófisis, bulbo raquídeo, hipocampo y sistema nervioso autónomo (De Souza y Grigoriadis, 2000).

Estudios previos de nuestro laboratorio han observado un aumento en la transcripción de CRF en las neuronas de la región parvocelular de PVN, resultando en un aumento de la síntesis de ACTH y de la secreción de corticosterona durante el síndrome de abstinencia a morfina (Navarro-Zaragoza y cols., 2012). Además, el eje HHA envía y recibe proyecciones endocrinas, oxitocina y vasopresina, y no endocrinas, con la médula espinal y algunos núcleos bulbares (Navarro-Zaragoza y cols., 2012).

Por otra parte, fuera del eje HHA el CRF modula el control autónomo, los procesos emocionales y el comportamiento, y la respuesta frente al estrés. Se ha visto que el LC juega un papel muy importante en la regulación del estrés, activando en las neuronas de CRF presentes en la médula espinal (Devlbiss y cols., 2012).

1.3.3.3. Sistema cerebral del estrés extrahipotalámico

Este sistema es también conocido como amígdala extendida y está formado por CeA, BNST y la corteza de NAc (Heimer y Alheid, 1991; Calhoon y Tyke, 2015; Tovote y cols., 2015; Gungor y Pare, 2016; Shackman y Fox, 2016; Ahrens y cols., 2018). La amígdala extendida recibe aferencias de la amígdala basolateral (BLA), del hipocampo, del córtex, de VTA y del hipotálamo lateral (LH); y manda eferencias a la parte medial del pálido ventral y al LH, es decir, información referente a la función motora y emocional (LeDoux, 2000) y a VTA (Neugeburer, 2004)

Existen también proyecciones desde BNST hacia el tronco encefálico, núcleo parabraquial y complejo vagal dorsal. Asimismo, la amígdala también manda eferencias hacia BNST e hipocampo, llegando hasta la corteza de NAc. La amígdala extendida dirige sus eferencias hacia VTA. Por su parte, el giro dentado (DG) recibe aferencias desde la amígdala (Koob y Le Moal, 2001).

Debido a todas estas interconexiones, CeA es capaz de regular el comportamiento y actividad neuroendocrina. Por su parte, se ha postulado que BNST regularía las funciones autónomas y las emociones (Avery y cols., 2015; Gafford y cols., 2015), la

amígdala también regula las emociones. También, se sabe que la amígdala extendida regula el efecto de los reforzadores negativos como dolor (Neugebauer y cols., 2004), ansiedad o depresión, que da lugar el miedo o estrés durante el síndrome de abstinencia a opioides (Koob, 2008a).

El consumo crónico de opioides disminuye la función de los sistemas implicados en los circuitos de recompensa (Koob y Le Moal, 1997; Koob, 2008a), y activa el sistema cerebral del estrés extrahipotalámico y el eje HHA a través de la liberación del CRF como consecuencia de la retirada de la droga durante el síndrome de abstinencia, dando lugar a un aumento de ACTH, corticosterona y CRF a nivel de la amígdala (Koob y Kreek, 2007; Koob, 2008a). Por tanto, los efectos de la abstinencia se asocian a una disminución de la actividad dopaminérgica y a una activación de neurotransmisores relacionados con el estrés y la ansiedad, como el CRF o las dinorfinas.

El CRF tiene la capacidad de activar los sistemas noradrenérgicos y, en reciprocidad, estos sistemas también son capaces de activar la producción de CRF. Las células neuronales encargadas de generar CRF en CeA establecen conexiones con el LC, lo que resulta en un aumento en la activación de las neuronas ubicadas en el LC. Esto conlleva a un incremento en la liberación de NA, la cual a su vez regula la actividad de las neuronas dopaminérgicas en VTA. En paralelo, la liberación de CRF por parte de las neuronas situadas en PVN está sujeta a la regulación ejercida por las neuronas noradrenérgicas presentes en el NTS en su área postrema 2 (NTS-A2). Estas neuronas no solo proyectan hacia PVN, sino que también establecen conexiones con otras regiones cerebrales como CeA, BNST, VTA y la corteza de NAc. Todo esto demuestra que existe una interacción entre los sistemas de CRF y las vías noradrenérgicas (Maj y cols., 2003; Koob y cols, 2008; Kenny, 2011) (Figura 5).

1.4. RECEPTORES DE CRF (CRFR)

Se ha comentado anteriormente que el principal neurotransmisor del sistema cerebral del estrés es el CRF. Existen tres tipos principales de receptores de CRF (CRFR): CRF1R, CRF2R y CRF3R. Los dos primeros han sido descritos en humanos y roedores, entre otros (Liaw y cols., 1997). Los receptores de CRF pertenecen al grupo de GPCR, con un dominio extracelular N-terminal de unión a hormonas (Figura 6). La unión del CRF a estos receptores produce la activación de la vía de la adenilato ciclasa (AC), dando lugar a un aumento de la síntesis de adenosín monofosfato-3',5'-cíclico (AMPC). Por

tanto, la exposición aguda o crónica a sustancias de abuso puede regular las vías de la proteína quinasa A (PKA), proteína quinasa C (PKC) o los canales de Ca^{2+} (Lodge y Grace, 2005), induciéndose la síntesis de diversos factores de transcripción.

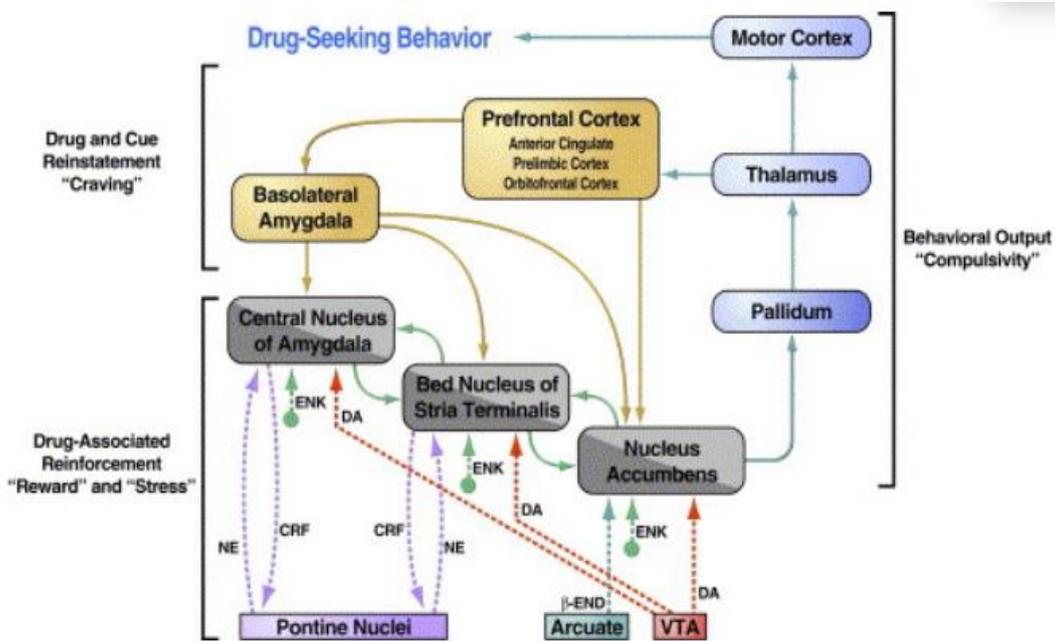


Figura 5. Interacciones entre la amígdala central y otros sistemas. Tomada de Koob y Le Moal, 2005.

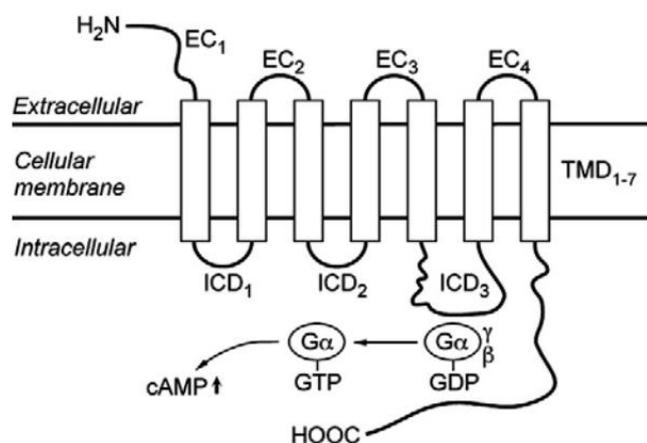


Figura 6. Receptor CRF. El receptor presenta 4 dominios extracelulares (EC1-4), 7 dominios transmembrana (TMD1-7) y 3 dominios intracelulares (ICD1-3). ICD3 interactúa con la proteína G y EC1 presenta la mayor afinidad por ligandos. Tomada de Yang y cols., 2010.

El CRF1R tiene varias isoformas distintas, aunque la única activa es la isoforma α (Pisarchik y Slominski, 2004). También se han descrito otras isoformas alélicas que no tienen tanta relevancia en el proceso adictivo (Perrin y cols., 1993). Este receptor se encuentra en la adenohipófisis, hipocampo, amígdala y bulbo olfatorio (Palchauthuri y cols., 1998; Bale y Vale, 2004). Existe evidencia de que el CRF1R contribuye en la instauración de la dependencia de morfina y en la recaída, a través de diversas acciones. Una de ellas sería, como se ha comentado anteriormente, la especial relación que mantiene con el sistema noradrenérgico, y que se manifiesta en diversos núcleos, por ejemplo, BLA (Valero y cols., 2018). También, a nivel de DG, regula la cascada de síntesis de CREB, que media la neurogénesis en el estrés (Alonso y cols., 2004). Por otra parte, el CRF1R está implicado en el aumento de la liberación de CRF en CeA y BNST durante el proceso de abstinencia a opiáceos (Weiss y Koob, 2001). Además, se ha postulado que los CRF1R regulan la ansiedad o depresión asociadas a estrés (Hummel y cols., 2010; Dedic y cols., 2018), así como, los síntomas cardíacos que generan (Martínez-Laorden y cols., 2014). En este sentido, estudios de nuestro laboratorio han mostrado que los antagonistas CRF1R disminuyen los efectos negativos de la abstinencia a opioides (Navarro-Zaragoza y cols., 2010; García-Carmona, 2015).

El CRF2R tiene también varias subunidades: CRF2R α , CRF2R β y CRF2R γ . En roedores, CRF2R α se encuentra en adenohipófisis, septum lateral, hipotálamo ventromedial y plexo coroideo (Hauger y cols., 2003) y CRF2R β se encuentra en las arteriolas y tejidos periféricos (corazón, pulmones, músculo esquelético, ovarios y testículos) (Hauger y cols., 2003; Lukkes y cols., 2011). En humanos, CRF2R α se encuentra en los tejidos periféricos y válvulas cardíacas, CRF2R β en cerebro y aurículas izquierdas (Perrin y Vale, 1999) y CRF2R γ sólo en hipocampo y amígdala (Kostich y cols., 1998).

Se ha observado que los antagonistas del CRF2R son capaces de inhibir la sintomatología negativa que aparece durante el síndrome de abstinencia a opioides (Papaleo y cols., 2008; Navarro-Zaragoza y cols., 2010; García-Carmona, 2015), así como la recaída a opioides. Igualmente, los ratones *knockout* para CRF2R no presentan disforia durante el síndrome de abstinencia a opioides. (Ingallinesi y cols., 2012).

El ligando principal de los CRFR es el CRF, aunque también son capaces de unirse a ellos las urocortinas (UCN) -1, -2 y -3, que son péptidos similares a CRF que tienen

funciones metabólicas a nivel central y periférico (Li y cols., 2003; Chen y cols., 2004; Kuperman y Chen., 2008), siendo UCN-1 la que está más relacionada con el CRF.

Tanto el CRF como las UCN actúan activando CRF1R y CRF2R, presentando el CRF mayor afinidad que UCN1. Además, UCN1 y UCN2 interactúan con CRF2R con mayor afinidad (Perrin y cols., 1995; Hsu y Hsueh, 2001; Dautzenberg y Hauger, 2002).

No sólo los receptores de CRF estarían implicados en la aparición de efectos aversivos tras el consumo de sustancias de abuso, sino que otros sistemas como el noradrenérgico, las dinorfinas y las orexinas, también jugarían un papel importante.

1.5. SISTEMA NORADRENÉRGICO

El sistema noradrenérgico, como su nombre indica, tiene como neurotransmisor principal la NA, y presenta conexiones desde NTS-A₂ a la amígdala extendida y a PVN. Además, existe una interacción que podría resultar clave en la adicción a sustancias de abuso: existe un bucle de retroalimentación positiva entre las neuronas de CRF y de NA, de tal forma que las neuronas de CRF activarían la liberación de NA y, a su vez, las neuronas noradrenérgicas estimularían la liberación de CRF (Koob y Zorrilla, 2010). Por tanto, su activación es clave para la activación del sistema cerebral del estrés.

Por otra parte, se ha asociado la activación del eje HHA con la activación de las neuronas noradrenérgicas del NTS que, como hemos comentado, inerva PVN (Laorden y cols., 2002). Además, recibe conexiones de las zonas límbicas, BLA, LH e hipocampo (Smith y Vale, 2006; Edwards y Koob 2012).

Es conocido que la NA, junto al CRF, dinorfinas y orexinas, son neurotransmisores claves en los refuerzos negativos asociados a la amígdala extendida (Koob y Le Moal, 2005).

La NA también está asociada con los estímulos sensitivos, de memoria y motores. Las neuronas corticales y talámicas presentan cambios en su actividad debido a los cambios en el estado conductual (Berridge y Waterhouse, 2003). Gran parte de las neuronas noradrenérgicas se encuentran en el tronco del LC. A partir de este núcleo se producen una gran cantidad de inervaciones noradrenérgicas en el prosencéfalo. La única forma de obtención de NA para ciertas zonas claves para los procesos afectivos y cognitivos es mediante las conexiones con el LC. Este sistema es importante para los estados de alerta y vigilia, que están relacionados con la capacidad de un individuo de

detectar, procesar y responder los estímulos recibidos por el medio ambiente (Saladin y cols., 2013).

Los receptores β -adrenérgicos forman parte de la familia de GPCR similares a la rodopsina, y se dividen en tres tipos: β_1 , presente en el tejido cardíaco; β_2 , que se encuentra en las vías respiratorias; y β_3 , localizado en el tejido adiposo (Johnson, 2006; Chan y cols., 2016). Los receptores β_2 -adrenérgicos tienen importantes funciones fisiológicas como relajar el músculo liso de los vasos sanguíneos o bronquial.

Se ha demostrado la implicación del sistema noradrenérgico en la adicción a sustancia de abuso y en los cambios epigenéticos que induce mediante la delección del gen que produce la subunidad $\epsilon 1$ del receptor N-metil-D-aspartato (NMDA) presente en el LC, lo que deriva en una pérdida en la tolerancia y la dependencia de morfina (Inoue y cols., 2003).

Investigaciones previas han propuesto que la administración de antagonistas β -adrenérgicos atenúa los síntomas aversivos derivados del consumo de opiáceos tanto en ratas (Przybylski y cols., 1999) como en humanos (Schwabe y cols., 2012; Soeter y Kindt, 2012). De la misma forma, la administración de propranolol tras la adquisición de un condicionamiento por preferencia de plaza (CPP) por cocaína, hace que revierta esta preferencia (Bernardi y cols., 2006; Jobes y cols., 2015). Estudios previos también demuestran que el propranolol es capaz de disminuir los efectos aversivos asociados al síndrome de abstinencia (Brunet y cols., 2008 y 2011), así como la necesidad de la búsqueda de la droga, menor sensación de síntomas depresivos al consumir o una disminución en la frecuencia cardíaca, mediante el bloqueo de los receptores β -adrenérgicos (Saladin y cols., 2013).

1.6. SISTEMA LÍMBICO

El sistema límbico está compuesto por una serie de zonas corticales y subcorticales del cerebro (Figura 7) que están relacionadas con las emociones y el comportamiento (Mesulam, 2010), así como con la memoria a largo plazo o la memoria segmentada, es decir, la capacidad de separar recuerdos similares (Bekinschtein y cols., 2013), y sus principales estructuras son la amígdala y el hipocampo (Catani y cols., 2013). Se ha observado que el hipocampo presenta conexiones con la parte ventral del

hipotálamo, por lo que existe una innervación directa hacia PVN (Nieuwenhuys y cols., 2013).

DG es la parte del hipocampo donde se produce la generación de nuevas neuronas o neurogénesis, específicamente en su zona subgranular surgen las que están implicadas en los procesos de recompensa y recaída en el consumo de drogas (Amaral y cols., 2007). Estas neuronas son en su mayoría glutamatérgicas y están directamente relacionadas con el sistema de recompensa. Se ha observado que, bajo el paradigma del CPP, algunos opiáceos como la morfina son capaces de inhibir esta neurogénesis (Zhang y cols., 2016). Estudios recientes demuestran que la disminución de la neurogénesis puede favorecer la recaída en el consumo de morfina, por lo que tratamientos que regulen al alza la función de DG podrían evitar estas recaídas (Bulin y cols., 2018).

Se postula que BLA también está relacionada con las conductas de recompensa (Kim y cols., 2017), puesto que presenta eferencias con NAc (Stuber y cols., 2011), pero se ha observado que estas vías pueden presentar ciertas alteraciones tras la aplicación de condicionamiento por aversión de plaza (CPA), produciéndose una pérdida en la plasticidad neuronal. En este aspecto, estudios previos han demostrado que no se encuentran cambios en la plasticidad neuronal a nivel de BLA tras la extinción del síndrome de abstinencia asociado a morfina (Zhu y cols., 2023). Del mismo modo, ciertos estudios demuestran que hay algunas partes de BLA que no participan en la recaída en el síndrome de abstinencia a opioides (Navratilova y cols., 2020).

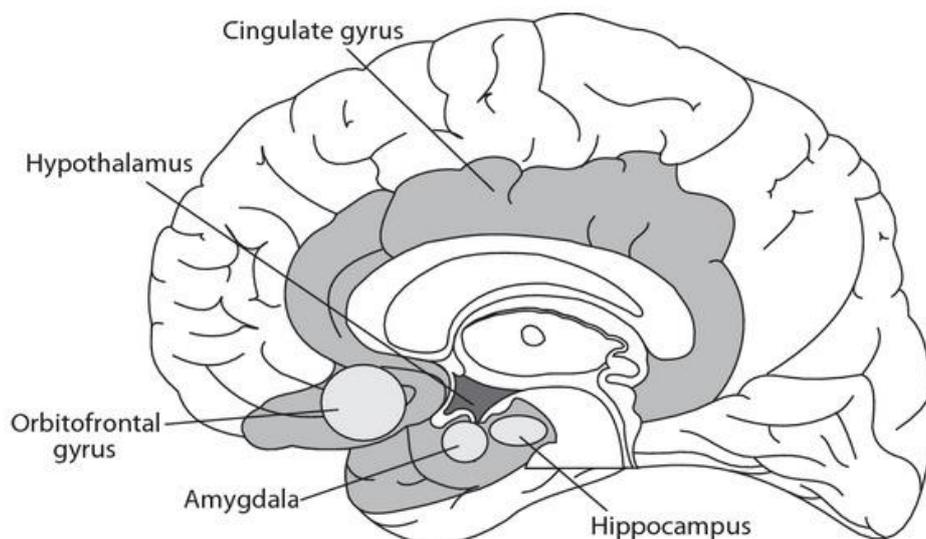


Figura 7: Anatomía del sistema límbico. Tomada de Roxo y cols., 2011.

1.7. OTROS PÉPTIDOS

1.7.1. Dinorfinas

Las dinorfinas son péptidos opioides que están presentes principalmente en NAc, CeA, BNST e hipotálamo. Son ligandos del receptor KOR y tienen un papel importante en el estrés (Walker y cols., 2008).

Se ha sugerido que la activación dopaminérgica produce un aumento de las dinorfinas presentes en DG, que contrarresta el refuerzo positivo dopaminérgico, lo que se traduce en la necesidad de una mayor dosis de la droga para conseguir el mismo efecto (Navarro-Zaragoza y cols., 2012).

Así mismo, estudios previos han observado que niveles elevados de dinorfinas en NAc pueden inhibir la liberación de DA, produciendo una disminución de los efectos reforzadores positivos de las drogas y llevando a un estado CPA (Di Chiara e Imperato, 1986; Walker y cols., 2008; Al-Hasani y cols., 2015).

1.7.2. Orexinas

Las orexinas o hipocretinas son producidas en el LH y participan en las acciones que tienen lugar a nivel de las vías de recompensa. Las orexinas están acopladas a proteínas G, y pueden dar lugar a la activación de neuronas dopaminérgicas en VTA o de CRF a nivel de PVN y de CeA. Además, las orexinas están implicadas en la búsqueda compulsiva de opioides y en la adquisición de CPP (Moorman y Aston-Jones, 2010).

1.8. FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN RELACIONADOS CON LA ADICCIÓN

El consumo repetido de sustancias de abuso puede dar lugar a cambios en la expresión génica mediada por factores de transcripción y a la modificación del funcionamiento de distintas vías de señalización intracelular (Nestler, 2001; Nestler, 2004).

En la actualidad, está bien establecido que las proteínas quinasas pueden regular diferentes procesos celulares mediante la fosforilación de factores de transcripción. Entre los factores de transcripción más importantes relacionados con la adicción se encuentran CREB y Fos.

Por ejemplo, varios estudios realizados tanto a nivel de SNC como de sistema nervioso periférico han comprobado que el tratamiento crónico con opioides produce una activación de la ruta del AMPc/PKA, debida a la mayor presencia de DA libre. La activación de la ruta AMPc/PKA concluye en la expresión de genes como preprodinorfina o c-Fos, el cual promueve la síntesis y liberación de factores de transcripción como CREB.

Es conocido que otras rutas de señalización intracelular como la de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPKs), familia de serina/treonina quinasas que traducen una amplia gama de estímulos extracelulares en diversas respuestas intracelulares, también podrían jugar un papel destacado en los cambios adaptativos asociados a la dependencia de opioides (Nestler, 2004).

1.8.1. ERKs

Las ERKs/MAPKs están implicadas en varios procesos en el SNC, incluyendo la adicción a drogas. Se ha visto que estas proteínas quinasas, que se encuentran en el hipocampo, cuerpo estriado, y cerebelo (Fiore y cols., 1993), participan en el desarrollo del aprendizaje y la memoria a corto y largo plazo (Feld y cols., 2005; Igaz y cols., 2006). Por tanto, la inhibición selectiva de la vía de las ERKs podría evitar la asociación de estímulos físicos con recuerdos, incluyendo los recuerdos aversivos o de miedo (Sun y Nan, 2017), así como el reconocimiento del entorno (Kelly y cols., 2003; Villarreal y Barea-Rodríguez, 2006).

La activación de la vía de las MAPKs tiene lugar como consecuencia de la inducción de una cascada de señalización de quinasas, siendo ERK1 y ERK2, de peso molecular 44 y 42 kDa, respectivamente, las dos isoformas más importantes. Y una vez activadas, se trasladan al núcleo (Chen y cols., 1992), donde fosforilan una serie de factores de transcripción que permiten la expresión génica, como CREB (Bading y cols., 1991) (Figura 8). Por tanto, la activación de MAPK puede estar implicada en la expresión génica. Otra proteína que puede fosforilar a CREB, y que influye en la activación de las ERKs es PKA (Baldassa y cols., 2003).

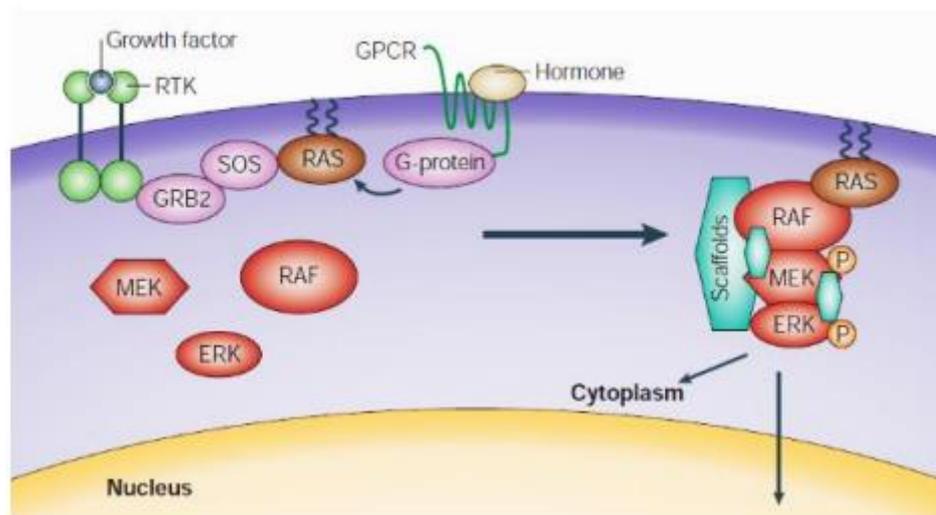


Figura 8. Vía de fosforilación de ERK por la activación de GPCR. Tomada de Wellbrock y cols., 2004.

1.8.2. CREB

CREB es un factor de transcripción de peso molecular 36 kDa y cuyo residuo de serina 133 se dimeriza por la PKA y se une al ADN (Maze y Russo, 2010). Por tanto, es capaz de regular la ruta AMPc/PKA. Los dímeros de CREB son capaces de regular y activar diversos genes y factores de transmisión (Kalivas y O'Brien, 2008).

Se ha demostrado que CREB está relacionado con la adquisición de memoria, puesto que un aumento en la expresión de CREB en la amígdala lateral (LA) enfatiza la memoria relacionada con el miedo (Han y cols., 2007; Zhou y cols., 2009; Rogerson y cols., 2014; Park y cols., 2020). Algunos estudios han demostrado que el aumento de la función de CREB minutos antes del condicionamiento puede reforzar la instauración de la memoria aversiva.

El consumo crónico de opioides aumenta la expresión de CREB a través de la ruta del AMPc/PKA (Nestler, 2001; Benavides y cols., 2005; Kalivas y O'Brien, 2008). CREB podría, a su vez, regular la expresión de otros genes de expresión inmediata como c-Fos. (Pace y cols., 2009)

Las ERKs modifican ciertas quinasas que fosforilan CREB (Sanna y cols., 2002; Lee y Messing, 2008), lo que se demuestra esencial para la recompensa por reforzadores positivos (Choi, 2006), aunque el aumento repetido en la expresión de CREB puede dar

lugar a una tolerancia a los reforzadores. Esto se observa sobre todo en las primeras etapas del síndrome de abstinencia, donde se activa PKA y CREB (Nestler, 2004; Koob y cols., 2009; Martín y cols., 2012).

Además, CREB regula varios procesos relacionados con los síntomas derivados de la adicción y ciertos genes relacionados con esta, como c-Fos, BDNF o CRF (Carlezon y cols., 2005).

1.8.3. BDNF

BDNF es un factor neurotrófico de la familia de las neurotrofinas que se expresa mayoritariamente en la corteza del cerebro y en el hipocampo (Ernfors y cols., 1990; Hofer y cols., 1990; Phillips y cols., 1990). Su receptor principal es el receptor de tirosina quinasa B (TrkB), y la unión a este posibilita la activación de diferentes rutas de señalización como la de ERKs y CREB (Finkbeiner y cols., 1997) (Figura 9). Este factor de transcripción ha sido ampliamente estudiado en los últimos años por su papel en la plasticidad y transmisión sináptica en hipocampo y amígdala (Cowansage y cols., 2010; Bekinschtein y cols., 2013; Andero y cols., 2014; Du y cols., 2023). Así, se ha podido confirmar que las vías de señalización dependientes de BDNF a nivel de amígdala estarían implicadas en la adquisición y consolidación del condicionamiento a memorias aversivas. Por otra parte, BDNF parece ser necesario para la extinción de memorias aversivas en hipocampo y amígdala. Actualmente se ha podido comprobar que la sobreexpresión de BDNF en BLA sería responsable de la extinción de memorias aversivas o de miedo (Karpova y cols., 2014). Se ha demostrado la influencia de BDNF en DG, puesto que su bloqueo mediante antagonistas resulta en una pérdida de la capacidad de establecer la memoria por patrones separados para recuerdos similares (Bekinschtein y cols., 2013).

Además, se ha propuesto que existe una asociación directa entre BDNF y la activación de ERK1/2 y CREB durante los procesos de consolidación de la memoria (Ma y cols., 2023).

También el BDNF juega un papel esencial en la adquisición del CPA (Rodrigues y cols., 2001), así como en la recaída en el síndrome de abstinencia a drogas asociado a estrés social, o *social defeat* (Taylor y cols., 2011). Así, se ha demostrado que BDNF presenta un aumento de su actividad en BLA tras la aplicación del estrés social (Dulka y cols., 2016).

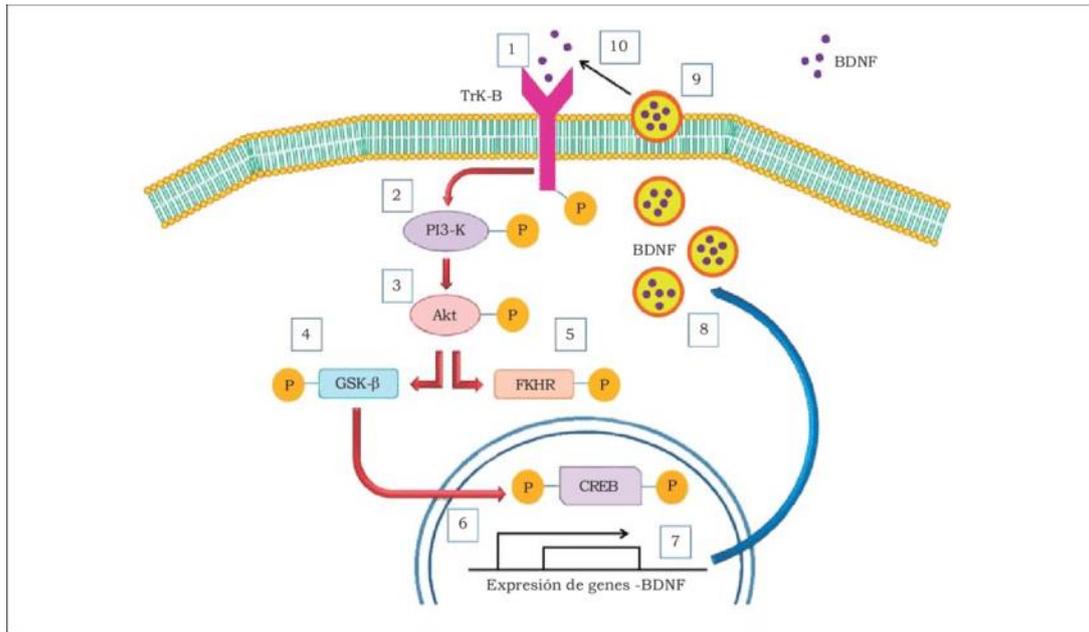


Figura 9. Proceso de señalización del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) en la activación de genes relacionados con la supervivencia celular. Se desarrolla en varias etapas clave: 1. BDNF se une al receptor TrK-B (receptor de tirosina quinasa tipo B), lo que resulta en la fosforilación del receptor. 2. La fosforilación del receptor TrK-B conduce a la activación de la enzima PI3-quinasa (PI3-K). 3. PI3-K fosforila y activa la proteína quinasa B (Akt). 4. Akt fosforilada, a su vez, activa la enzima quinasa 3 de la glicógeno sintasa (GSK-3 β) mediante fosforilación. 5. La activación de Akt también lleva a la fosforilación de FKHR. 6. La activación de GSK3- β resulta en la fosforilación de CREB. 7. CREB fosforilado actúa como un activador de la transcripción génica. 8. Esta cascada de señalización conlleva un aumento en la expresión del BDNF, así como en su transporte. 9. El BDNF empaquetado se libera mediante exocitosis. 10. La liberación de BDNF activa los autorreceptores de TrK-B. Tomada de Zárate y cols., 2014.

1.9. MODELOS CONDUCTUALES ANIMALES PARA EL ESTUDIO DE LA ADICCIÓN: CPP Y CPA

El paradigma del condicionamiento de lugar es un procedimiento para medir la recompensa o rechazo producido por las sustancias de abuso. En este modelo, los animales circulan libremente por dos cámaras conectadas por un pasillo y, según el tiempo que pasan en cada una de ellas durante una etapa que se llama pre-condicionamiento, se elige la cámara en la que va a recibir la droga, siendo esa cámara la misma en todo momento (CPP) (Figura 10). En la otra cámara los ratones reciben una solución salina y serán tomados como controles. Se puede comprobar el refuerzo positivo de las distintas sustancias de abuso por la cantidad de tiempo que el animal permanece en la cámara donde ha recibido la sustancia de abuso, esperando que se le administre

nuevamente, siendo éste directamente proporcional a la intensidad del efecto experimentado.

El método de CPP tiene una variante, que es la generación de CPA en lugar de preferencia. Para ello, una vez que el animal circula libremente y se realiza el pre-condicionamiento, la sustancia de abuso se administraría fuera de las cámaras y, posteriormente, se administraría un antagonista, con el fin de inducir al animal un síndrome de abstinencia en la cámara escogida para ello (Carboni y Vacca, 2003).

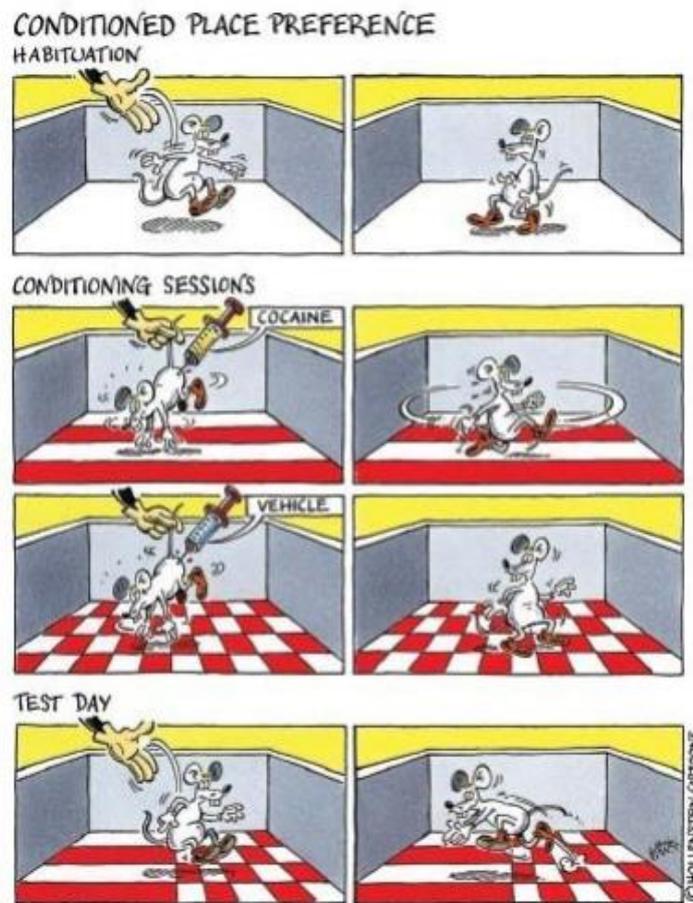


Figura 10. Paradigma del condicionamiento de lugar o plaza. Tomada de Sanchís-Segura y Spanagel, 2006.

El CPA ofrece una medida altamente sensitiva del estado emocional negativo producido por el síndrome de abstinencia a opioides, ya que se va a poder observar, según el tiempo que permanezca el animal en cada cámara, cuánto le afecta esta sintomatología, llegando un momento en el que los efectos negativos se extinguen. La inducción de un estado emocional negativo, como puede ser el producido por el estrés, impulsa la búsqueda y consumo compulsivo de la droga en cuestión (Bardo y cols., 1995). Tanto el

estado de preferencia como de aversión puede permanecer varias semanas o sesiones, hasta que se produzca la extinción de este comportamiento.

El modelo experimental de condicionamiento de lugar es el modelo de elección para medir la recompensa producida por el consumo de sustancias de abuso, así como la capacidad de este de condicionar el comportamiento. Esto es debido a la sencillez y rapidez del proceso y que es económico (Carboni y Vacca, 2003). Además, con el fin de conseguir un ambiente específico en cada cámara, se utilizan estímulos visuales y táctiles como el uso de paredes con dibujos distintos o suelo con diferentes texturas.

1.10. TRATAMIENTOS ACTUALES PARA LA ADICCIÓN

Los tratamientos para la adicción tradicionalmente han ido destinados a reducir la aparición de la sintomatología negativa generada por el síndrome de abstinencia, lo cual no termina de ser eficaz para evitar futuras recaídas. Por tanto, los tratamientos se han ido adaptando para centrarse en los cambios neurológicos a largo plazo, así, como los aspectos derivados del comportamiento para evitar esas recaídas (O'Brien, 2008; Yahyavi-Firouz-Abadi y See, 2009).

Los trastornos derivados de las sustancias de abuso están muy relacionados con la ansiedad, por lo tanto, por regla general, los tratamientos de elección van enfocados a eliminar esa ansiedad, con el fin de evitar recaídas. Las investigaciones actuales giran en torno a los tratamientos que actúan directamente sobre el SNC (Volkow y Skolnick, 2012).

Los fármacos antidepressivos, como los inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina o ISRS (paroxetina o sertralina), están considerados como fármacos de primera línea en el tratamiento de la ansiedad derivada del consumo de sustancias de abuso (Ministerio de Sanidad y Consumo, 2008; Sáiz y cols., 2014). Por otra parte, antiepilépticos como la gabapentina, han demostrado un potente efecto ansiolítico en pacientes cocainómanos durante el síndrome de abstinencia (Prieto y cols., 2001; Sáiz y cols., 2014).

En el caso de los opiáceos, existen innumerables evidencias de que la metadona, la buprenorfina o la naltrexona (NIDA, 2023) son eficaces tanto en la reducción del consumo de opiáceos, como en la reducción de síntomas asociados a la dependencia y conductas agresivas (Rastegar y Fingerhood, 2020). La metadona, agonista puro de los

MOR, ha sido un fármaco de elección para sobrellevar el síndrome de abstinencia desde la década de los 40. El enantiómero S de la metadona es un antagonista selectivo de los receptores NMDA, impidiendo así un incremento en la tolerancia (Nicholls y cols., 2010; Salsitz y Wiegand, 2016). La buprenorfina, agonista parcial de los MOR, aparece en 2002 sola y en combinación con la Naloxona (Nx) (Suboxone[®]), siendo en ambos casos eficaz para el tratamiento de la adicción a opiáceos, aunque la retirada de los fármacos daba lugar a un alto índice de recaída (Fiellin y cols., 2014).

Suboxone[®] es un medicamento utilizado ampliamente en España en la actualidad. Existe información que indica que Suboxone[®] podría tener efectos clínicos comparables a los de la metadona en términos de retención en el tratamiento y reducción del uso de heroína en pacientes adultos con adicción a los opiáceos (NIDA, 2023). Además, parece que este medicamento podría ofrecer una ventaja en términos de costes económicos en comparación con la metadona. Sin embargo, es importante considerar que esta conclusión se basa en una cantidad limitada de evidencia y que se requieren más investigaciones para confirmar y comprender completamente estos efectos y ventajas potenciales (OMS, 2009; Canadian Agency for Drugs and Technologies in Health, 2013). Suboxone[®] posee gran flexibilidad en el tratamiento de personas con adicciones y las dosis de mantenimiento se pueden alcanzar con prontitud. Después de establecer estas dosis de mantenimiento, es posible implementar un programa reducido de dosis diarias, lo que beneficia al paciente. En cualquier momento es posible emprender una reducción gradual de la dosis como parte de un programa de desintoxicación, minimizando así la aparición de síntomas de abstinencia (Chapleo y Crossley, 2003).

Por último, la naltrexona, antagonista de los MOR, fue propuesta para tratamiento vía oral contra la adicción a opiáceos y, pese a tener buenos resultados de tolerancia y efectos adversos, la mala adherencia al tratamiento ha limitado el uso de este medicamento (Nunes y cols., 2015). La alternativa inyectable de la naltrexona ha demostrado ser más eficaz en la adicción a sustancias de abuso (Krupitsky y cols., 2013).

Una de las estrategias actuales contra la adicción a sustancias de abuso son las vacunas dirigidas a opioides o a producir anticuerpos contra las drogas específicas. Una ventaja de estas nuevas terapias con respecto a las tradicionales es que los anticuerpos no interactúan con las proteínas o los receptores neuronales, evitando así efectos adversos indeseados, como el abuso de los agonistas MOR, por ejemplo, metadona o buprenorfina.

Por otro lado, se espera que el efecto de estas vacunas sea prolongado, por lo que se podría mejorar la adherencia (Ohia-Nwoko y cols., 2016; Bremer y Janda, 2017; Banks y cols., 2018). La combinación de estas vacunas con depósitos de naltrexona o buprenorfina parecen ser el futuro de los tratamientos contra los opiáceos (Tabla 5).

Existe evidencia clínica de que los analgésicos no opioides pueden ser una alternativa eficaz para controlar el síndrome de abstinencia asociado a morfina, como la gabapentina (Rudolf y cols., 2018), o la mirtazapina (Pollice y cols., 2008). También se ha demostrado que el uso de estas moléculas, junto con el ácido valproico y la quetiapina, son eficaces en la disminución de la adicción a la morfina (Alegre y Leiva, 2020).

Existe amplia literatura que sustenta un rol importante de los núcleos CeA y BNST, y del sistema noradrenérgico en el mantenimiento de la dependencia de sustancias de abuso, lo que sugiere que el proceso de adicción está asociado a la activación de las vías del estrés y del eje HHA (Koob y cols, 2009).

Drug	Vaccine	Species and sex	Primary endpoint	Main effect
Acquisition of opioid self-administration				
Morphine	Morphine hapten/KLH conjugate	Male Wistar rats	Acquisition of heroin SA (60 µg/kg/infusion), fixed ratio	∅
Heroin	Heroin hapten/KLH conjugate	Male Wistar rats	Acquisition of heroin SA (60 µg/kg/infusion), fixed ratio	↓
Heroin	Morphine hapten/KLH conjugate	Male Holtzman rats	Acquisition of heroin SA (60 µg/kg/infusion), fixed ratio	↑
Oxycodone	Oxycodone hapten/KLH conjugate	Male Holtzman rats	Acquisition of oxycodone SA (60 µg/kg/infusion), fixed ratio	↓
Oxycodone	Oxycodone hapten/TT conjugate	Male Wistar rats	Acquisition of oxycodone SA (60, 150 µg/kg/infusion), fixed ratio	60 µg/kg/infusion: ∅ 150 µg/kg/infusion: ↑
Ongoing opioid self-administration				
Heroin	Morphine-6/hemisuccinyl-bovine serum albumin conjugate	Male rhesus monkey	Ongoing heroin SA (6–100 µg/kg/infusion), fixed ratio	↓
Heroin	Morphine-6/hemisuccinyl-bovine serum albumin conjugate (passive)	Male rhesus monkey	Ongoing heroin SA (12 µg/kg/infusion), fixed ratio	↑
Heroin	Morphine/TT conjugate	Male rats (strain not disclosed)	Ongoing heroin SA (60 µg/kg/infusion), fixed ratio	↓
Heroin	Morphine hapten/KLH conjugate	Male Holtzman rats	Ongoing heroin SA (3–30 µg/kg/infusion), fixed ratio	3, 10 µg/kg/infusion: ↓ 6, 30 µg/kg/infusion: ↑
Heroin	Morphine hapten/KLH conjugate	Male Holtzman rats	Ongoing heroin (0–30 µg/kg/infusion), fixed ratio	Intake (i.e., Q_0): ↓ Rate of intake change (i.e., α): ∅
Heroin	Heroin hapten/KLH conjugate	Male Wistar rats	Ongoing heroin SA (60 µg/kg/infusion), fixed ratio, progressive ratio	↓
Oxycodone	Oxycodone hapten/TT conjugate	Male Wistar rats	Ongoing oxycodone SA (60, 150 µg/kg/infusion), fixed ratio, progressive ratio	∅
Fentanyl	Fentanyl hapten/TT conjugate	Male and female Sprague–Dawley rats	Ongoing fentanyl SA (3.2 µg/kg/infusion, fixed ratio)	↓
Fentanyl	Fentanyl hapten/TT conjugate	Male and female Sprague–Dawley rats	Ongoing fentanyl SA (0, 0.32–100 µg/kg/infusion), concurrent schedule	↓
Reinstatement of opioid self-administration				
Heroin	Heroin hapten/KLH conjugate	Male Wistar rats	Heroin-primed reinstatement (180 µg/kg, intravenous)	↓
Heroin	6-Glutarylmorphine/KLH conjugate	Male Sprague–Dawley rats	Heroin-primed reinstatement (500 µg/kg, subcutaneous)	↓
Heroin	6-Glutarylmorphine/KLH conjugate	Male Sprague–Dawley rats	Heroin-primed reinstatement (500 µg/kg, subcutaneous)	↓
Heroin	Morphine hapten/KLH conjugate	Male Holtzman rats	Heroin-primed reinstatement (600 µg/kg, subcutaneous)	↓

KLH keyhole limpet hemocyanin, TT tetanus toxoid

Tabla 5. Eficacia de las vacunas frente a la adicción a opiáceos en estudio preclínicos. ↓: disminución, ↑: incremento, ∅: sin efecto. Modificada de Townsend y Banks, 2020.

2. OBJETIVOS



La adicción a drogas es un estado de salud que implica una afección tanto física como emocional que induce una dependencia o necesidad por una sustancia, con presencia de signos y síntomas característicos, y que depende de factores biológicos, genéticos, psicológicos y sociales.

Uno de los principales problemas de la adicción es la alta predisposición a las recaídas puesto que años después de la última administración de la sustancia de abuso, la tendencia hacia la recaída permanece, y se puede volver a experimentar un consumo debido a circunstancias en las que el sujeto encuentra estímulos que le llevan a ello, como volver a estar expuesto a la droga (Koob y Volkow, 2010), estímulos ambientales (Swendsen y Le Moal, 2011), o situaciones de estrés (Enoch, 2012). Concretamente, el estrés se considera como uno de los factores más rotundos en las recaídas de sujetos que han cesado el consumo, así como en la iniciación y mantenimiento de la adicción.

El modelo de CPA proporciona una evaluación altamente sensible del estado emocional negativo asociado con el síndrome de abstinencia a opioides. La inducción de un estado emocional negativo, como el generado por el estrés, impulsa la búsqueda y el consumo compulsivo de la droga correspondiente (Bardo, 1995).

Diversos fármacos se han propuesto para el tratamiento de las recaídas. Estos, se han dirigido principalmente a mitigar la sintomatología negativa asociada con el síndrome de abstinencia, aunque esta estrategia no ha demostrado ser completamente efectiva en la prevención de recaídas futuras. Por lo tanto, la evolución de los tratamientos ha llevado a un ajuste hacia la consideración de los cambios neurológicos a largo plazo y los aspectos comportamentales como elementos centrales para evitar la recurrencia, según indican estudios como los de O'Brien (2008) y Yahyavi-Firouz-Abadi y See (2009). En esta tesis doctoral observamos y comparamos la acción del propranolol, fármaco antagonista de los receptores β -adrenérgicos, y el CP-154,526, antagonista selectivo de los CRF1R, que podrían tener un importante papel en estos procesos.

A pesar de la abundancia de estudios sobre la extinción de CPP (Bernardi y cols., 2006, Sanchís-Segura y Spanagel, 2006; Moorman y Aston-Jones, 2014), poco se sabe sobre la extinción de memorias aversivas. La extinción de la aversión requiere un aprendizaje asociativo, consolidación y formación de una nueva memoria. Entre los sustratos neuronales implicados en estos procesos se encuentran las estructuras límbicas como amígdala e hipocampo.

En base a estos antecedentes, el objetivo general de este estudio consiste en valorar las consecuencias de la exposición a un tipo de estrés físico, en este caso, el pinzamiento de cola o *tail pinch* (TP), en la recaída asociada a morfina una vez extinguido el CPA, en ratones de la cepa C57BL/6J.

Los objetivos específicos de este estudio son:

1. Valorar la existencia de aversión de plaza debido al síndrome de abstinencia a morfina inducido por la administración de Nx, así como la posterior extinción en ratones tratados crónicamente con morfina, de manera previa a la exposición a estrés físico (TP).
2. Estudiar el papel del sistema cerebral del estrés, concretamente a nivel del CRF1R, y del sistema noradrenérgico (receptores β) en la recaída inducida por la exposición a TP una vez se ha extinguido la aversión en ratones tratados crónicamente con morfina, mediante la administración de sus antagonistas respectivos CP-154,526 y propranolol.
3. Cuantificar la actividad locomotora de los ratones dependientes de morfina que sufren síndrome de abstinencia a morfina durante la expresión del CPA, la extinción y la recaída tras exposición a TP.
4. Analizar la expresión de p-ERK1/2 y p-CREB en CeA, NAc, BNST, BLA, PVN, VTA, y DG, mediante Western Blot, tras la exposición a TP en ratones, que previamente eran dependientes de morfina, al ser tratados con los antagonistas CP-154,526 y propranolol.

3. MÉTODOS



3.1. FÁRMACOS

En este estudio se utilizaron los siguientes fármacos: hidrocloreuro de morfina (Alcaliber, Madrid, España), Nx (Sigma Chemical Co., St Louis, MO), CP-154,526 (Sigma Chemical Co., St Louis, MO) y propranolol (Sigma Chemical Co., St Louis, MO).

3.2. ANIMALES

Se utilizaron ratones macho de la cepa JAX™: C57BL/6J (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME), con pesos entre 16-22 g al inicio del tratamiento. Los animales se dividieron en cajas de plástico (15 cm de altura; 20 cm por lado), con libre acceso a agua y comida, en una habitación con temperatura ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) y humedad ($50 \pm 10\%$) controladas y un ciclo de luz-oscuridad de 12 h (luces encendidas 20 h 00 min – 08 h 00 min). Allí permanecieron 7 días hasta el comienzo de los experimentos, para así habituarse a la sala de ensayo. Todos los ratones fueron manipulados conforme a lo establecido en la Directiva del Parlamento Europeo y del Consejo de 22 de septiembre de 2010 (2010/63/U.E), relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos. Asimismo, todos los procedimientos realizados en este estudio fueron aprobados por el Comité Ético de Experimentación Animal (CEEA) de la Universidad de Murcia de acuerdo con el Real Decreto 53/2013, por el cual se regula la utilización de animales para experimentación para otros fines científicos y/o docentes, y con la Ley 32/2007, de protección de los animales utilizados para experimentación y para otros fines científicos.

3.3. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

3.3.1. Grupos experimentales

Los ratones ($n = 53$) fueron divididos en seis grupos experimentales. Todos los animales recibieron dosis de morfina y, posteriormente, Nx, Tres grupos experimentales fueron sometidos a estrés mediante el procedimiento de TP, de los cuales uno no recibió tratamiento (vehículo), otro recibió CP-154,526 y el último propranolol. Por otra parte, los otros 3 grupos no fueron sometidos al estímulo estresante y recibieron, al igual que en el caso anterior, vehículo, CP-154,526 o propranolol.

Control	Tail Pinch (TP)
morfina + naloxona + vehículo	morfina + naloxona + vehículo + TP
morfina + naloxona + CP-154,526	morfina + naloxona + CP-154,526 + TP
morfina + naloxona + propranolol	morfina + naloxona+ propranolol + TP

Tabla 6. Grupos experimentales. TP: *Tail pinch*.

3.3.2. Fase Conductual

Para el estudio comportamental, se utilizó un modelo animal denominado CPA, en el que los animales asocian un ambiente específico con los efectos aversivos del síndrome de abstinencia a morfina, inducido mediante la administración de Nx (antagonista opioide) a ratones dependientes de morfina. En este modelo se mide el tiempo que los animales se distribuyen por cada compartimento (Carboni y Vacca, 2003).

La caja de condicionamiento en la que se realiza el test de CPA consiste en dos compartimentos rectangulares policarbonados (longitud, 20 cm; anchura, 18 cm; altura, 25 cm), separados 4 cm uno del otro, ambos accesibles por un área exterior rectangular de cloruro de polivinilo (longitud, 20 cm; anchura, 7 cm; altura, 25 cm). Para diferenciar los tres compartimentos, se utilizan señales visuales y de textura (Figura 11).



Figura 11. Aparato de condicionamiento de plaza utilizado para la realización del CPA.

Los tres compartimentos que constituyen el sistema están conectados a un ordenador con un software específico que mide el tiempo que pasa el animal en cada uno de ellos (CPP Win 2.9 Panlab, Barcelona, España).

El protocolo experimental constó de seis fases (Figura 12): pre-condicionamiento, tratamiento farmacológico, condicionamiento, post-condicionamiento, extinción y recaída.



Figura 12. Fases experimentales asociadas a la fase conductual.

3.3.2.1. Pre-condicionamiento o pre-test (día 0)

Durante esta fase, los animales tuvieron libre acceso a los dos compartimentos de la caja de comportamiento durante 15 minutos, midiéndose el tiempo que pasaron los animales en cada uno de ellos. Se excluyó a aquellos animales que pasaron menos del 25% o más del 75% del tiempo total en alguno de ellos.

3.3.2.2. Tratamiento (días 1-4)

El tratamiento farmacológico consistió en la administración a los ratones de dosis crecientes de morfina durante cuatro días (Figura 13): el primer día se administró 10 mg/kg de morfina cada 12 horas; el segundo día, 30 mg/kg de morfina cada 12 horas; el tercero, 50 mg/kg cada 12 horas y el último día se les administró una dosis de 60 mg/kg de morfina sólo por la mañana. En cada administración de morfina se realizó un pesaje de los animales con el fin de usar la dosis adecuada.

Este patrón de administración de morfina mediante dosis ascendentes se ha usado extensamente para estudiar la tolerancia y dependencia a opioides en nuestro laboratorio (García-Carmona, 2015).

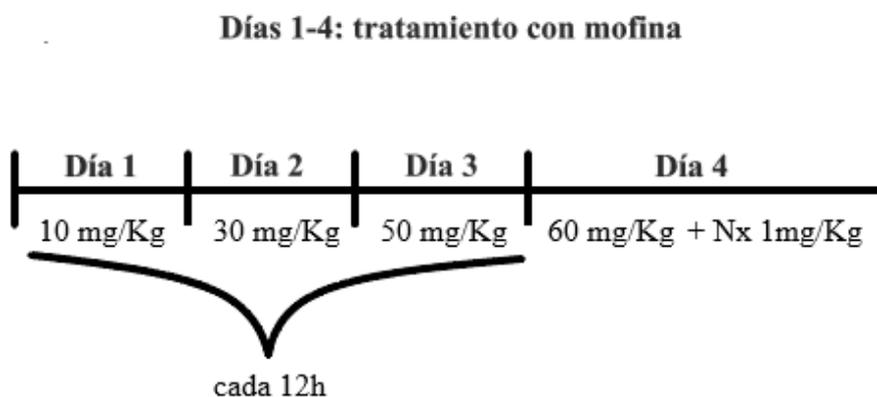


Figura 13. Esquema de la fase de tratamiento.

3.3.2.3. Condicionamiento (día 4)

Una hora después de la última administración de morfina, se les administró a los animales una dosis de 1 mg/kg de Nx con el fin de provocarles un síndrome de abstinencia, e inmediatamente se les introdujo en un compartimento determinado de la caja de comportamiento (asignado en función del tiempo que pasaron en cada uno de ellos durante el pre-test) durante 18 minutos.

Los ratones, al experimentar la retirada de morfina presentaron síntomas característicos de abstinencia, tales como temblores, chasquidos de dientes, temblor, piloerección, cromodíacricorrea, saltos espontáneos y diarrea.

3.3.2.4. Post-condicionamiento (día 5)

Esta fase fue realizada un día después del condicionamiento, de igual forma que en la fase de pre-test (libre acceso a ambos compartimentos durante 15 minutos). Se midió de nuevo el tiempo que pasaron los animales en cada una de las cámaras.

3.3.2.5. Extinción

La fase de post-condicionamiento se repitió cada 48-72 horas durante 5 a 9 sesiones. La extinción se confirmó cuando no se observaron diferencias estadísticamente significativas en el tiempo que pasaba el animal en la cámara donde fue condicionado con nx con respecto al pre-condicionamiento, es decir, que no existía ya aversión.

En este estudio, los animales necesitaron entre 15 y 21 días para conseguir esta extinción, lo que refuerza la teoría de que los mecanismos moleculares implicado en el estrés influyen en la memoria a largo plazo (Yahyavi-Firouz-Abadi y See, 2009).

3.3.2.6. Recaída

A las 24 horas de confirmarse la extinción, se indujo la recaída. Para evaluar el posible papel de los receptores de CRF1 y de los receptores β -adrenérgicos en la recaída asociada a morfina, tras la exposición a un fenómeno físico estresante, los ratones recibieron una inyección i.p. del antagonista selectivo de los receptores de CRF1, CP-154,526 (30 mg/kg), o del antagonista de los receptores β -adrenérgicos, propranolol (10 mg/kg), 30 minutos antes de la inducción del estímulo estresante.

Los animales fueron expuestos a un estímulo estresante de tipo físico denominado TP o pinzamiento de cola, que es la zona de mayor sensibilidad del ratón. Esta prueba antiguamente consistía en un pinzamiento momentáneo (Antelman, 1975), aunque en la actualidad se refiere a un pinzamiento continuo en el tiempo (Marinelli, 2004; Ribeiro Do Couto, 2006). En nuestro caso, utilizamos una pinza común (Figura 15), durante 15 minutos, para provocar un estímulo físico desagradable que induce una situación de estrés. Los ratones del grupo control (Control TP) no fueron sometidos al TP.



Figura 14. Pinza para pinzamiento de cola.

Posteriormente al TP, se mantuvo a los ratones en su caja durante otros 15 minutos. Por último, se les realizó un nuevo test de CPA.

Se realizaron todas las pruebas en una sala distinta a aquella donde se llevó a cabo el condicionamiento. Este protocolo posibilita considerar una plaza no contingente en lugar del sitio previo donde se administraron las inyecciones de condicionamiento.

3.4. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA Y WESTERN BLOT

Los ratones fueron sacrificados mediante dislocación cervical, y se realizó de forma protocolizada la extracción del cerebro, que fue almacenado inmediatamente en un congelador a una temperatura de -80°C .

El cerebro fue cortado en secciones de 500 micras mediante un criostato a -11°C y con un mantenimiento de frío en la muestra de -10°C , aproximadamente, empezando por la realización de cortes de 50 micras hasta alcanzar el área de interés.

Se realizaron micropunches de 1 mm^2 en las secciones cerebrales que contenían los núcleos de interés (Nac, BNST, CeA, PVN, BLA, DG, VTA) (Figura 16). Estos fueron conservados en una solución previamente preparada compuesta por: dodecilsulfato sódico (SDS), tampón fosfato salino (PBS), inhibidores de proteasa e inhibidores de fosfatasa. El SDS actúa desnaturalizando las proteínas al romper los enlaces no covalentes que las mantienen unidas, lo que resulta en la pérdida de su estructura nativa.

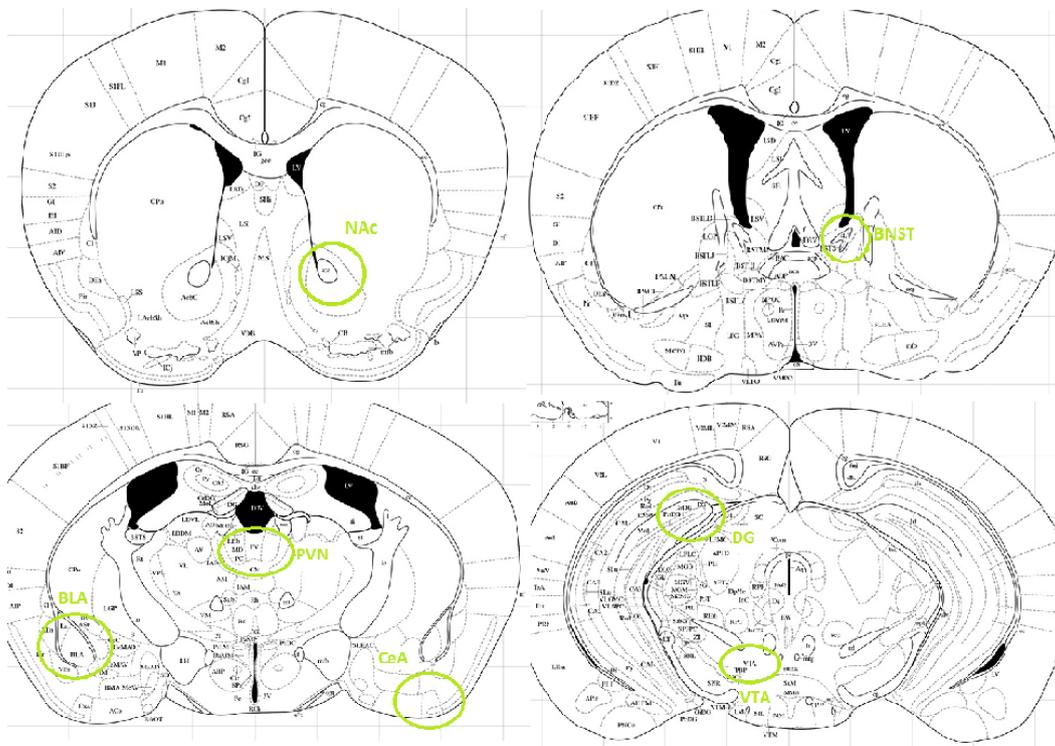


Figura 15. Núcleos cerebrales de estudio. Modificada de Atlas de Paxinos y Watson, 2006.

Las muestras se homogeneizaron en un vórtex durante 1-5 minutos. Seguidamente, fueron sonicadas en un baño de ultrasonidos durante 1 minuto. A continuación, se introdujeron los tubos en una centrifuga Sigma 3K30 durante 10 minutos, a una velocidad de 10.000 revoluciones por minuto, y 4°C. Finalmente, se recogió el sobrenadante y se almacenó a -80°C hasta la posterior determinación de proteínas.

La determinación de la cantidad de proteína total en cada muestra se realizó siguiendo el método del ácido bicinonínico propuesto por Wiechelman y cols. (1988). Para ello, preparamos tubos de ensayo que contenían un volumen de 2102.5 µl: 2 ml de reactivo analítico diluido (RAD), compuesto por ácido bicinonínico, sulfato de cobre y agua miliQ; 100 ml de PBS y 2.5 µl de muestra. Preparamos una recta patrón con cantidades conocidas de albúmina sérica bovina (BSA): 0, 2.5, 5, 7.5, 10, 12.5, 15, 20 y 30 µl.

Los tubos de ensayo se introdujeron en un baño a 37°C durante 30 minutos, y posteriormente se mantuvieron 15 minutos a temperatura ambiente. Una vez transcurrido este tiempo se midió la absorbancia de cada muestra en un espectrofotómetro Spectronic® 20 Genesys™.

Se realizó una electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE). Para ello, en primer lugar, se preparó un gel separador, conteniendo agua miliQ, tampón separador, acrilamida 30%, SDS 10%, persulfato amónico, y TEMED; y un gel concentrador, compuesto por los mismos componentes que el separador, excepto el tampón separador, que fue sustituido por un tampón concentrador, y en el que se cargaron las muestras. Antes de gelificar, introdujimos un peine de plástico para formar las calles en las que se depositarán posteriormente las muestras.

El volumen máximo de muestra que se cargó en cada calle fue de 25 µl. Las muestras diluidas utilizadas en este trabajo tuvieron una concentración de 10 µg por calle. En la última calle se cargó el control de proteínas estándar Invitrogen MagicMark™ XP (Invitrogen, Carlsbad, California, EEUU) con proteínas de pesos moleculares conocidos para tener una referencia a la hora de identificar la proteína problema.

Una vez cargadas todas las muestras en sus respectivas calles, se llevó a cabo la electroforesis a 200 V en tampón de recorrido, durante el tiempo necesario hasta que el frente de proteínas avanzó lo suficiente. Posteriormente, las proteínas fueron transferidas desde el gel de poliacrilamida a una membrana de difluoruro de polivinildieno (PVDF, Bio-Rad Laboratory, Teknovas, Bilbao, España) previamente tratada para hacerla más hidrófila. Para ello, se sumergieron 15 segundos en metanol, 2 minutos en agua milliQ y 15 minutos en tampón de transferencia. Tras ello, se monta la transferencia en el mismo recipiente usado para la electroforesis.

Realizamos la modalidad de transferencia húmeda, para lo que se preparó un montaje en “sándwich” (esponja-filtro-gel-membrana-filtro-esponja) que se sumergió en tampón de transferencia. Posteriormente, se conectó el aparato a 100 V, durante 1 hora, dentro de una cámara frigorífica y manteniendo agitación constante.

Se procedió al bloqueo de la membrana para evitar uniones inespecíficas en la inmunodetección, mediante la incubación durante 1 hora con BSA al 1% en tampón tris buffer salino-Tween 20 (TBS-T). A continuación, se incubaron las membranas con los siguientes anticuerpos específicos: pERK (1:1000, Santa Cruz Biotechnology) y pCREB (1:750, Santa Cruz Biotechnology). Las membranas se dejaron incubando toda la noche a 4°C.

Posteriormente, se hicieron tres lavados de 10 minutos con TBS y, a continuación, las membranas se incubaron con un anticuerpo secundario, marcado con la enzima peroxidasa y contra la especie en la que se ha producido el primario. Se utilizaron los siguientes anticuerpos secundarios: anti-mouse (A11004, Invitrogen) y anti-rabbit (31234, Invitrogen), que se incubaron en el mismo tampón de bloqueo a una dilución de 1:5000 durante 1 hora, con agitación.

Finalmente, se realizaron otros tres lavados de 10 minutos en TBS-T.

La inmunorreactividad se detectó mediante un kit de quimioluminiscencia/quimiofluorescencia (ECL, Amersham Ibérica, Madrid, España) y se visualizó mediante un escáner de imagen Image Quant LAS-500 (GE Healthcare Europe GmbH). A continuación, se midió la intensidad de las bandas con respecto a las muestras control mediante densitometría. Los valores fueron normalizados con respecto al fondo con el programa AlphaImager 2200 (Alpha Innotech).

Por último, se procedió a realizar un stripping o desnudamiento de la membrana en tampón de desnudamiento (glicina 25 nM, SDS 1%, pH2) y a la incubación de la misma con el anticuerpo primario frente a GAPDH (1:5000, Cell Signaling, Leiden, Holanda), que se utilizó como control de carga.

Las proteínas de estudio se identificaron según su peso molecular: pERK1 (44 KDa), pERK2 (42 KDa), pCREB (48 KDa), y GAPDH (37 KDa).

3.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

En cada uno de los grupos experimentales se calculó la media aritmética con su correspondiente error estándar (SEM). Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía seguido de un post-hoc test denominado Newman-Keuls. Para comparar dos grupos experimentales se usó el test de la t de Student no pareada.

También se realizó la medida mediante el análisis ANOVA de dos vías, con el fin de comprobar la influencia que presentan los tratamientos farmacológicos (vehículo, CP-154,526 y propranolol), el estímulo estresante (TP) y la interacción entre ambos sobre la fosforilación de las distintas proteínas de estudio (ERK1/2 y CREB).

Estos datos fueron analizados mediante el programa estadístico GraphPad Prism 9 statistical package (Graph Pad Software Inc., San Diego, California, USA). Consideramos significativas diferencias con un valor de $p < 0.05$.

4. RESULTADOS



4.1. PAPEL DEL TP EN LA RECAÍDA ASOCIADA A MORFINA EN RATONES PREVIAMENTE TRATADOS CON CP-154,526 O PROPRANOLOL

4.1.1. Aversión condicionada de plaza en ratones dependientes de morfina

En primer lugar, estudiamos los efectos aversivos precipitados tras la administración de Nx en ratones dependientes de morfina, mediante el modelo conductual animal de CPA.

Los resultados obtenidos tras el análisis estadístico mediante una ANOVA de una vía seguida de un test post-hoc de Newman-Keuls, mostraron que existen diferencias significativas ($p < 0.01$) entre el tiempo que pasaron los ratones en el compartimento asociado a la Nx durante el pre- y el post-condicionamiento ($F = 22.83$; $p < 0.001$) (Figura 16).

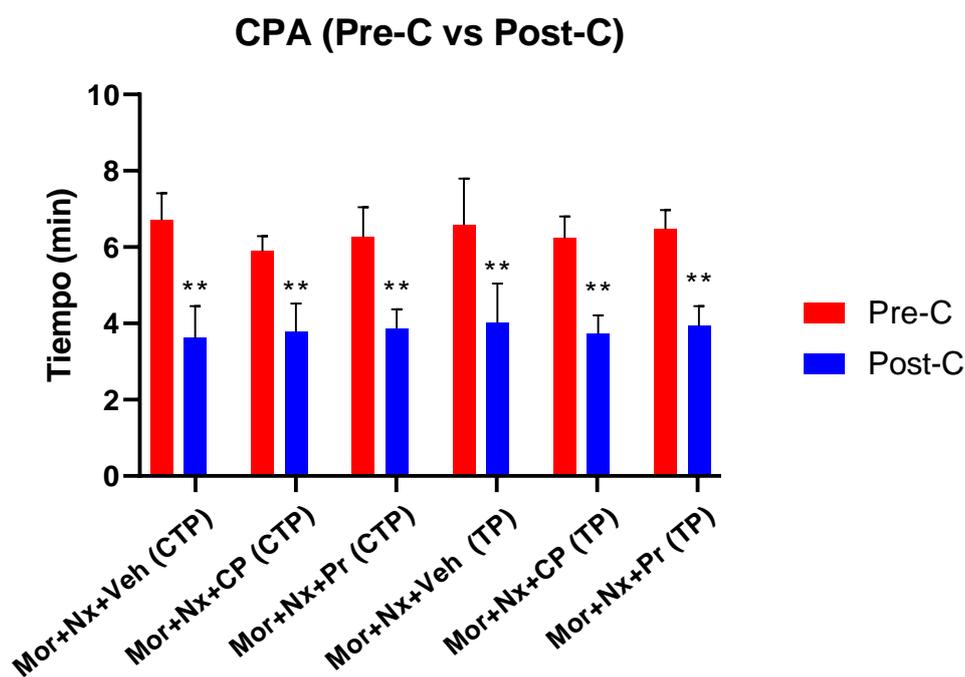


Figura 16. Aversión condicionada de plaza (CPA) en animales tratados con morfina durante las etapas de pre-condicionamiento y post-condicionamiento. Se midió el tiempo que pasó el animal en el compartimento asociado a la naloxona. Los datos se representan como la media \pm SEM. ** $p < 0.01$ vs Pre-C. Pre-C: pre-condicionamiento. Post-C: post-condicionamiento. CTP: control Tail Pinch. TP: Tail Pinch. CP: CP-154,526. Pr: propranolol. Mor: morfina. Nx: naloxona. Veh: vehículo. $n = 8-16$.

4.1.2. Extinción de la aversión condicionada de plaza en ratones dependientes de morfina

Como continuación del objetivo anterior, estudiamos la extinción de los efectos aversivos precipitados por la Nx en ratones tratados crónicamente con morfina.

Los animales tardaron entre 15 y 21 días en experimentar la extinción de la aversión (Figura 17), como se ha comentado previamente en los métodos.

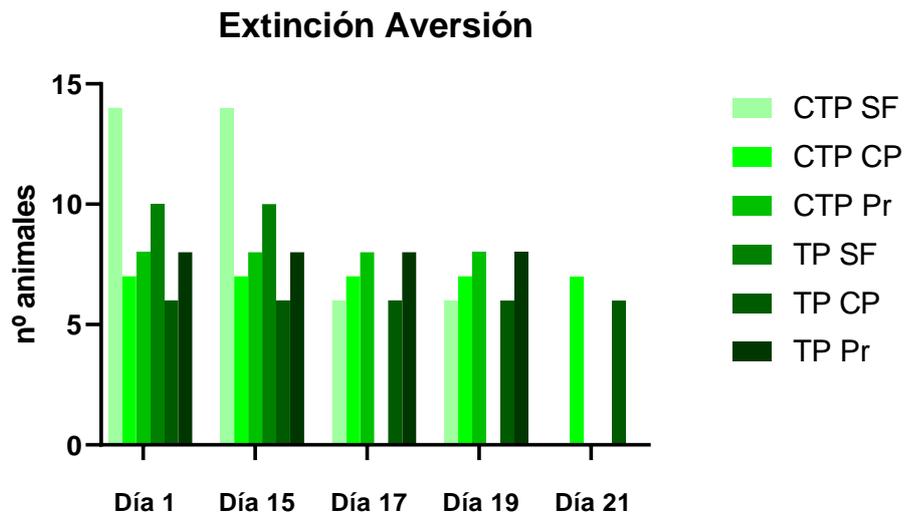


Figura 17. Días transcurridos hasta la extinción del CPA. CTP SF: control sin fármaco. CTP CP: control CP-154,526. CTP Pr: control propranolol. SF: sin fármaco. CP: CP-154,526. Pr: propranolol.

Nuestros resultados muestran que no existen diferencias significativas en el tiempo que pasaron los animales en la cámara donde sufrieron aversión durante la extinción con respecto a los valores previos a la administración de Nx (pre-condicionamiento) ($F=1.099$; $p=0.3735$) (Figura 18).

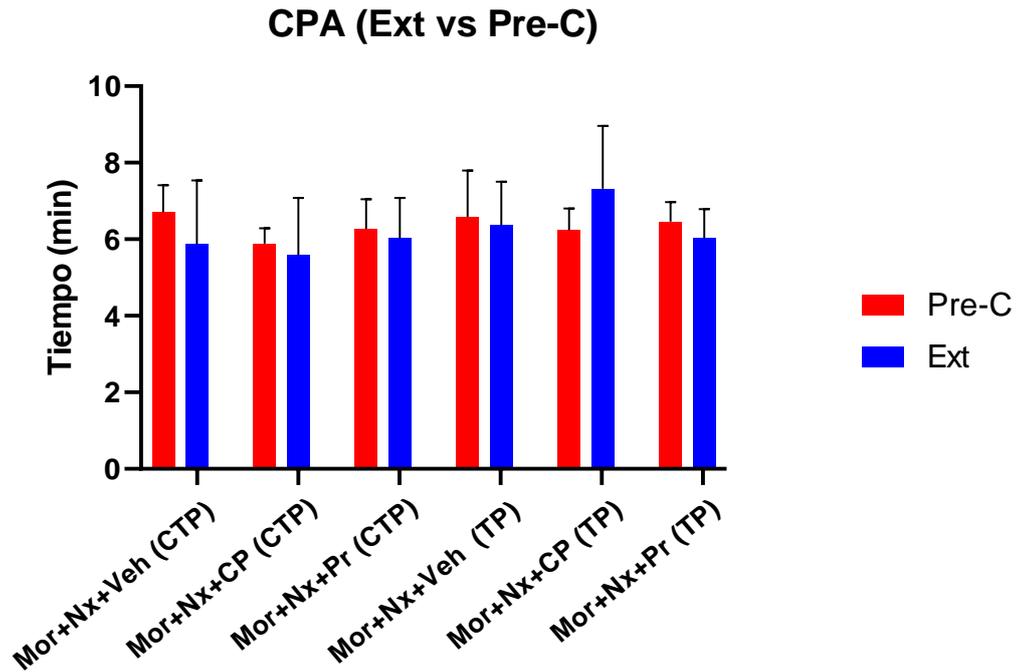


Figura 18. Aversión condicionada de plaza (CPA) en animales tratados con morfina durante las etapas de pre-condicionamiento y extinción. Se midió el tiempo que pasó el animal en el compartimento asociado a la naloxona. Los datos se representan como la media \pm SEM. Pre-C: pre-condicionamiento. Ext: extinción. CTP: control Tail Pinch. TP: Tail Pinch. CP: CP-154,526. Pr: propranolol. Mor: morfina. Nx: naloxona. Veh: vehículo. n=8-16.

Sin embargo, sí se observaron diferencias significativas en el tiempo que pasaron los animales en el compartimento asociado a la Nx durante la extinción, al compararlo con los valores obtenidos durante el post-condicionamiento ($F=9.766$; $p<0.001$) (Figura 19).

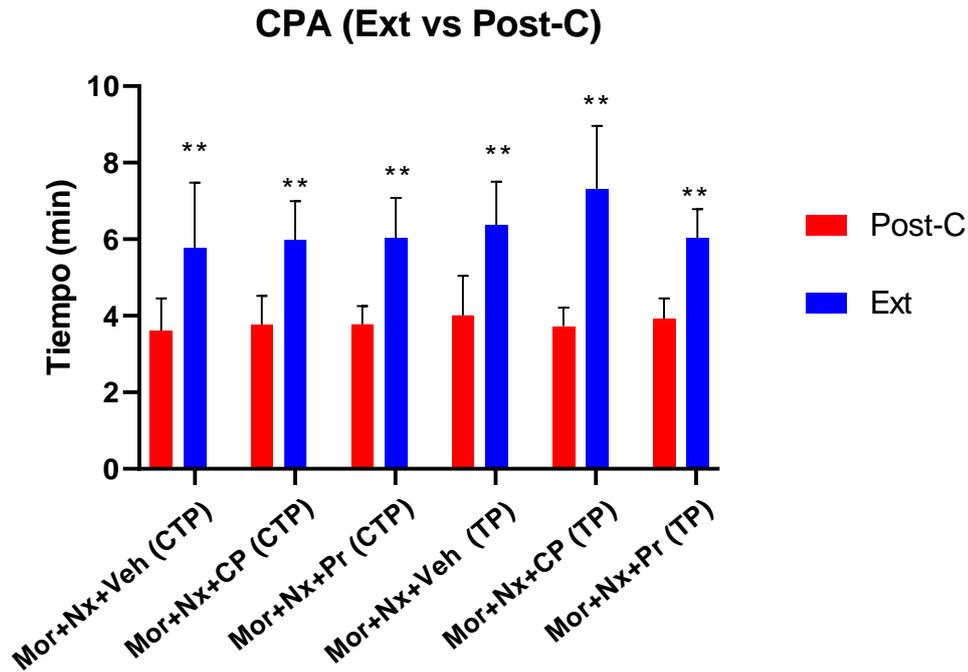


Figura 19. Aversión condicionada de plaza (CPA) en animales tratados con morfina durante las etapas de post-condicionamiento y extinción. Se midió el tiempo que pasó el animal en el compartimento asociado a la naloxona. Los datos se representan como la media \pm SEM. ** $p < 0.01$, vs Post-C. Post-C: post-condicionamiento. Ext: extinción. CTP: control Tail Pinch. TP: Tail Pinch. CP: CP-154,526. Pr: propranolol. Mor: morfina. Nx: naloxona. Veh: vehículo. $n=8-16$.

4.1.3. Papel del TP en la recaída asociada a morfina en ratones previamente tratados con CP-154,526 o propranolol

Nuestros resultados muestran que la inducción de un estímulo estresante, como es TP, provoca la recaída en el comportamiento de los ratones objeto de estudio, medida mediante el test de CPA. Así, se observaron diferencias significativas entre el tiempo que pasó el ratón en el compartimento asociado a la Nx en el grupo Mor+Nx+Veh que experimentó la situación de estrés durante la recaída y en este mismo grupo durante el pre-condicionamiento ($F=5.022$; $p < 0.001$) (figura 20).

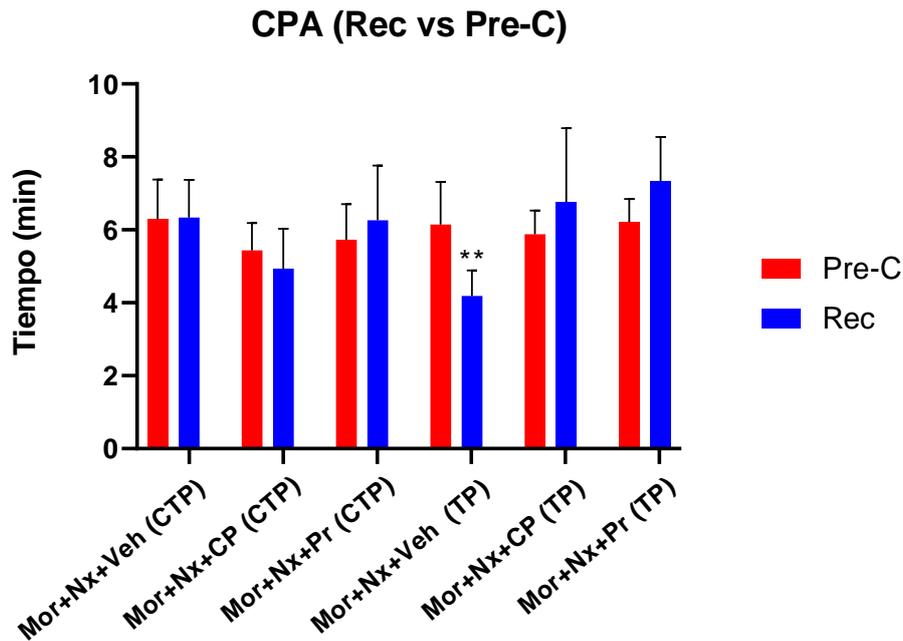


Figura 20. Aversión condicionada de plaza (CPA) en animales tratados con morfina durante las etapas de pre-condicionamiento y recaída. Se midió el tiempo que pasó el animal en el compartimento asociado a la naloxona. Los datos se representan como la media \pm SEM. ** $p < 0.01$ vs Mor+Nx+Veh (TP, Pre-C). Pre-C: pre-condicionamiento. Rec: recaída. CTP: control Tail Pinch. TP: Tail Pinch. CP: CP-154,526. Pr: propranolol. Mor: morfina. Nx: naloxona. Veh: vehículo. $n=8-16$.

A continuación, comparamos el tiempo que pasaron los ratones en la cámara asociada a la Nx después de la aplicación del estímulo físico, con respecto al tiempo que pasaron después de haber experimentado aversión, obteniéndose diferencias estadísticamente significativas entre ambos momentos ($p < 0.01$) en todos los grupos excepto en los animales del grupo Mor+Nx+Veh que experimentaron la situación de estrés (Figura 21).

Por último, comparamos el tiempo que pasaron los ratones en el compartimento asociado a la Nx después de la aplicación del estímulo físico, con respecto al tiempo que pasaron tras la extinción del comportamiento aversivo, obteniéndose diferencias estadísticamente significativas entre ambos momentos ($p < 0.05$) en el grupo Mor+Nx+Veh que experimentó la situación de estrés (Figura 22).

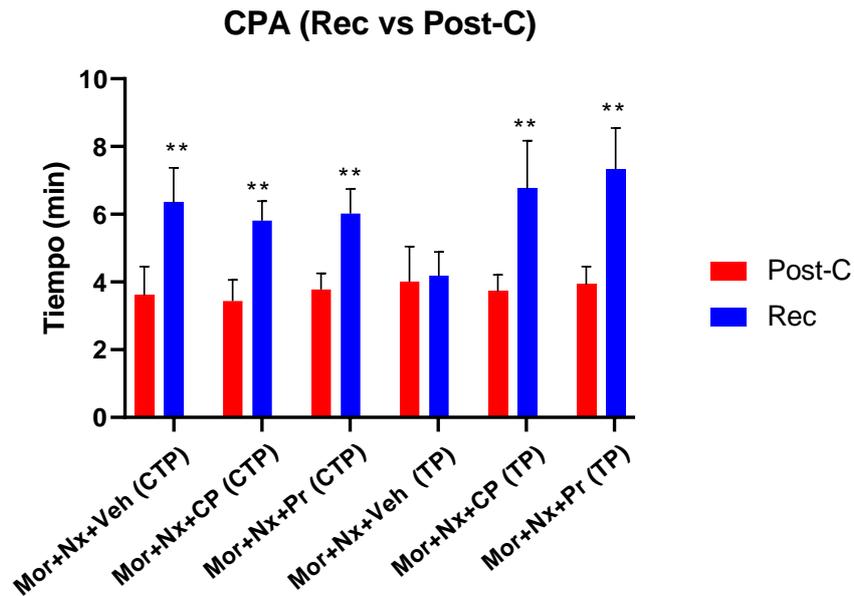


Figura 21. Aversión condicionada de plaza (CPA) en animales tratados con morfina durante las etapas de post-condicionamiento y recaída. Se midió el tiempo que pasó el animal en el compartimento asociado a la naloxona. Los datos se representan como la media \pm SEM. ** $p < 0.01$, vs Post-C. Post-C: post-condicionamiento. Rec: recaída. CTP: control Tail Pinch. TP: Tail Pinch. CP: CP-154,526. Pr: propranolol. Mor: morfina. Nx: naloxona. Veh: vehículo. $n=8-16$.

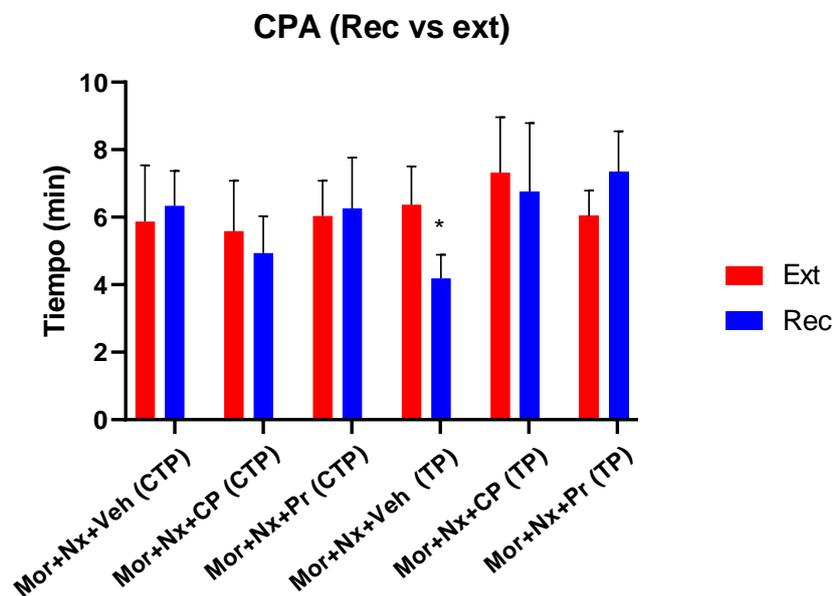


Figura 22. Aversión condicionada de plaza (CPA) en animales tratados con morfina durante las etapas de recaída y extinción. Se midió el tiempo que pasó el animal en el compartimento asociado a la naloxona. Los datos se representan como la media \pm SEM. * $p < 0.05$ vs Mor+Nx+Veh (TP, extinción). Ext: extinción. Rec: recaída. CTP: control Tail Pinch. TP: Tail Pinch. CP: CP-154,526. Pr: propranolol. Mor: morfina. Nx: naloxona. Veh: vehículo. $n=8-16$.

Las figuras 23 y 24 muestran el tiempo que los animales de los diferentes grupos experimentales pasaron en el compartimento asociado a la Nx durante todas las etapas del paradigma de CPA (pre-condicionamiento, post-condicionamiento, extinción y recaída). Para simplificar las mismas, se muestran únicamente las diferencias significativas entre el grupo Mor+Nx+Veh en animales sometidos a TP durante la extinción y tras la recaída. Así, mediante la realización de un análisis estadístico ANOVA de una vía observamos que los ratones que recibieron el estímulo físico y no fueron administrados con ningún fármaco antagonista pasaron un tiempo significativamente inferior ($p < 0.05$) en la cámara durante la recaída. Sin embargo, los animales que fueron administrados con el antagonista selectivo del receptor CRF1, CP-154,526, y los que recibieron el propranolol, no experimentaron diferencias significativas respecto a los animales control que no recibieron ese estímulo estresante de tipo físico.

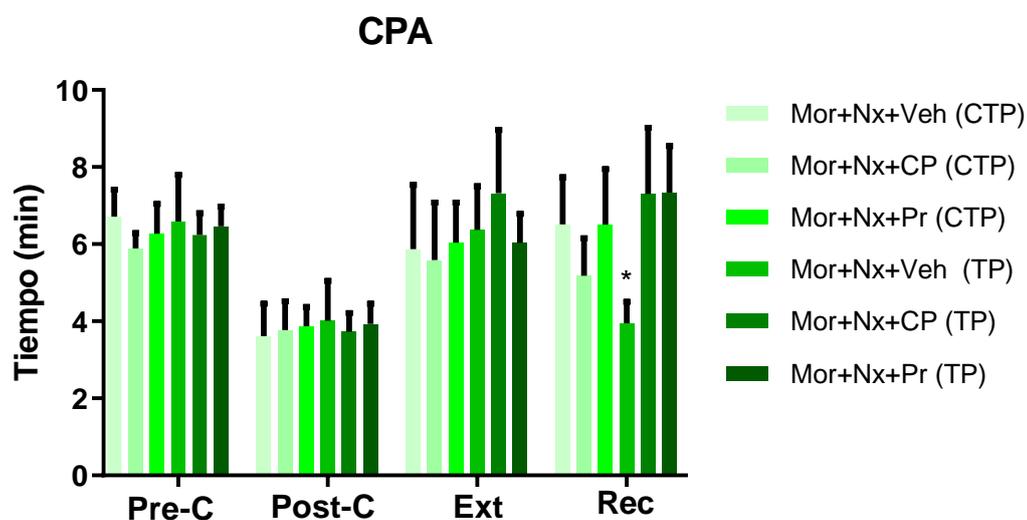


Figura 23. Aversión condicionada de plaza (CPA) en animales tratados con morfina durante las etapas de pre-condicionamiento, post-condicionamiento, extinción y recaída. Se midió el tiempo que pasó el animal en el compartimento asociado a la naloxona. Los datos se representan como la media \pm SEM. * $p < 0.05$ vs Mor+Nx+Veh (TP) durante la extinción. Pre-C: pre-condicionamiento. Post-C: post-condicionamiento. Ext: extinción. Rec: recaída. CTP: control Tail Pinch. TP: Tail Pinch. CP: CP-154,526. Pr: propranolol. Mor: morfina. Nx: naloxona. Veh: vehículo. $n=8-16$.

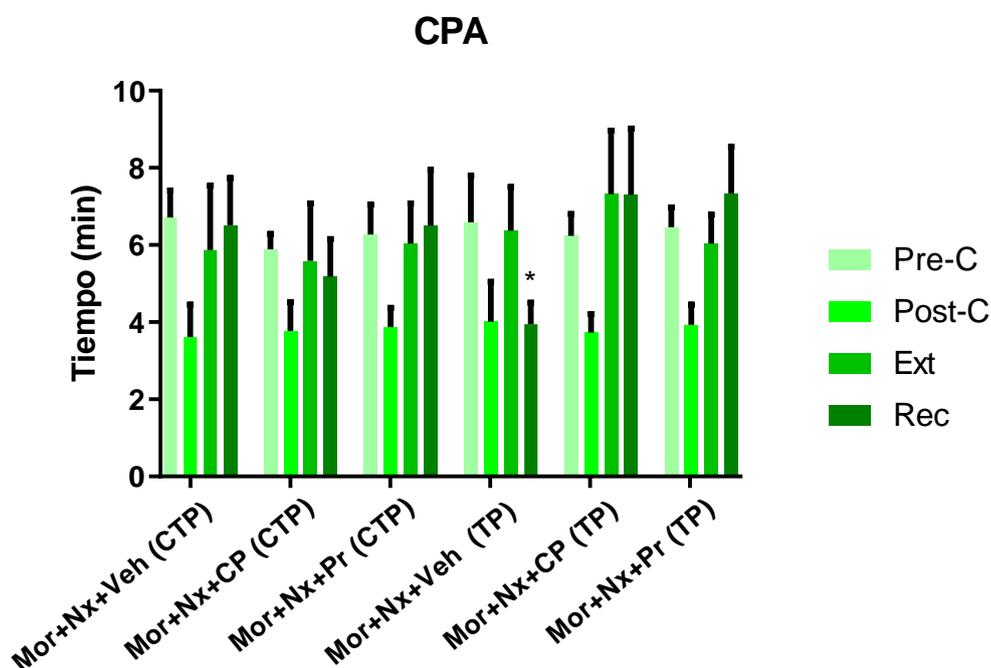


Figura 24. Aversión condicionada de plaza (CPA) en animales tratados con morfina en los diferentes grupos experimentales. Se midió el tiempo que pasó el animal en el compartimento asociado a la naloxona. Los datos se representan como la media \pm SEM. * $p < 0.05$ vs. Mor+Nx+Veh (TP) durante la extinción. Pre-C: pre-condicionamiento; Post-C: post-condicionamiento. Ext: extinción; Rec: recaída. CTP: control Tail Pinch. TP: Tail Pinch. CP-154,526. Pr: propranolol. Mor: morfina. Nx: naloxona. Veh: vehículo. $n=8-16$.

Estos resultados fueron analizados mediante ANOVA de dos vías con la finalidad de conocer la influencia de la exposición a estrés y del tratamiento farmacológico recibido en la aparición de recaída, medida mediante el tiempo que permanecieron en el compartimento en el que recibieron Nx. Nuestros resultados no mostraron influencia del tratamiento farmacológico recibido por los animales [$F(1, 26) = 0,5846$; $p=0,4514$]. En cambio, sí observamos que la exposición a estrés físico produjo una fuerte influencia en los resultados [$F(1, 26) = 17,52$; $p=0,0003$]. Por último, nuestros datos no indican la existencia de interacción entre el tratamiento farmacológico y la exposición al TP en la aparición de recaída al estado aversivo en estos ratones [$F(1, 26) = 0,2084$; $p=0,6519$].

En la figura 25 se muestra cómo la administración de CP-154,526 y propranolol en los animales sometidos a TP aumentó significativamente el tiempo que pasó el animal en el compartimento asociado al estímulo aversivo en el momento de la recaída, comparado con el grupo que sufrió TP, pero no recibió ninguno de estos fármacos ($p > 0.05$ y $p < 0.01$, respectivamente).

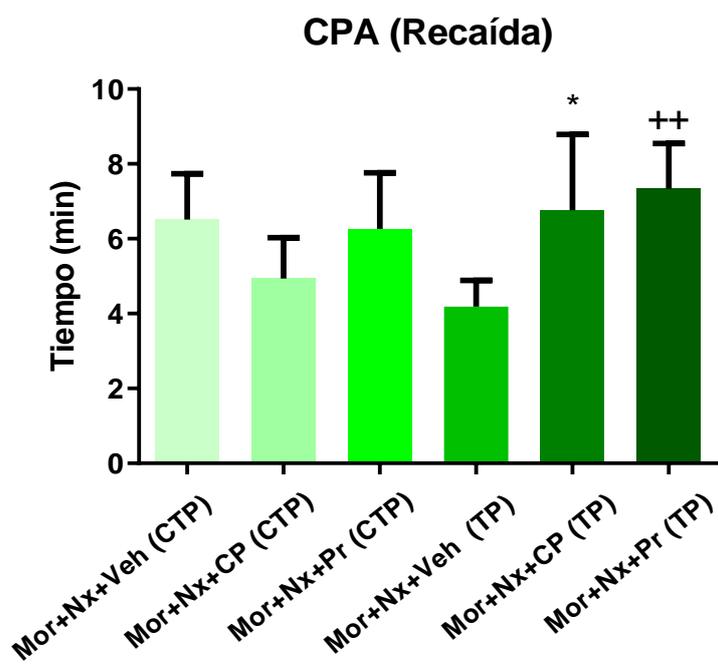


Figura 25. Aversión condicionada de plaza (CPA) en animales tratados con morfina durante la etapa de recaída. Se midió el tiempo que pasó el animal en el compartimento asociado a la naloxona. Los datos se representan como la media \pm SEM. * $p < 0.05$, ++ $p < 0.01$ vs Mor+Nx+Veh (TP). CTP: control Tail Pinch. TP: Tail Pinch. CP: CP-154,526. Pr: propranolol. Mor: morfina. Nx: naloxona. Veh: vehículo. $n = 8-16$.

4.1.4. Cuantificación de la actividad locomotora de los animales durante la expresión del CPA, extinción y recaída

Otro objetivo de este estudio ha sido cuantificar la actividad locomotora de los animales mediante el registro del número de cruces entre compartimentos que realizan estos durante la expresión de CPA y durante su extinción y la recaída posterior inducida por estrés.

4.1.4.1. Número de cruces durante la expresión de CPA

Nuestros resultados no mostraron diferencias estadísticamente significativas en el número de cruces entre compartimentos realizados durante el pre-condicionamiento entre los distintos grupos experimentales (Figura 26). Sin embargo, el análisis ANOVA de una vía seguido del test post hoc de Newman-Keuls mostró que la administración de Nx a animales dependientes de morfina indujo una disminución significativa de los cruces que realizaron los animales de estudio respecto a los observados durante el pre-test ($F=17,11$; $p<0.001$).

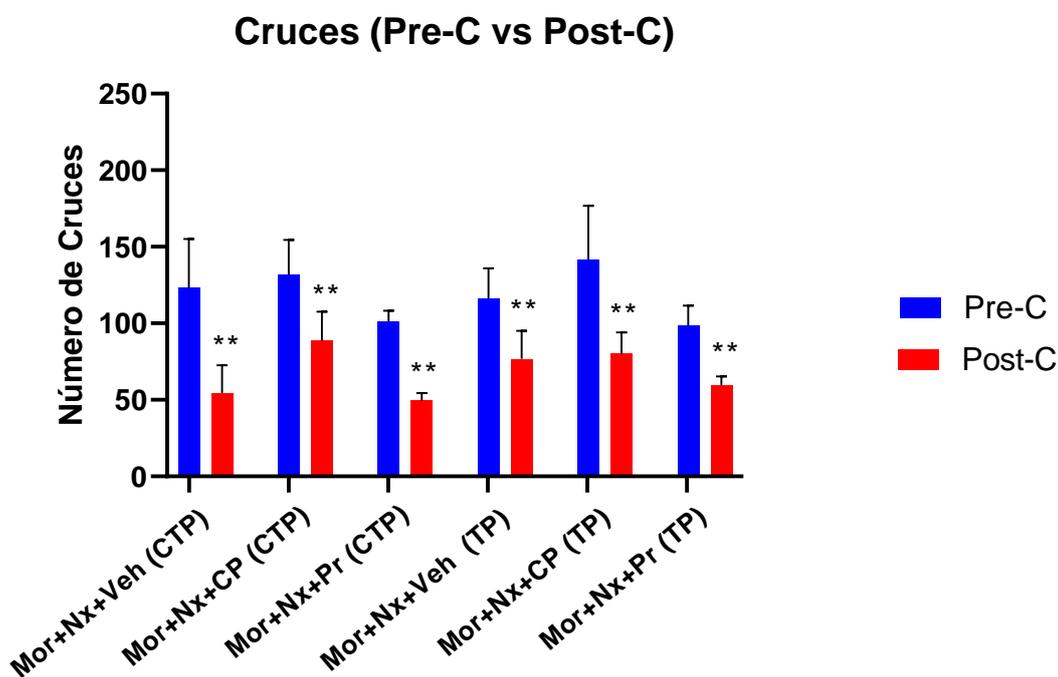


Figura 26. Número de cruces entre los compartimentos de puntos y rayas durante el post-condicionamiento y el pre-condicionamiento. Los datos se representan como la media \pm SEM. ** $p<0.01$ vs Pre-C. Pre-C: pre-condicionamiento. Post-C: Post-condicionamiento CTP: control Tail Pinch. TP: Tail Pinch. CP: CP-154,526. Pr: propranolol. Mor: morfina. Nx: naloxona. Veh: vehículo. $n=8-16$.

4.1.4.2. Número de cruces durante la extinción

Los resultados obtenidos tras analizar mediante ANOVA de una vía los cruces que realizaron los ratones entre compartimentos una vez extinguida la aversión al compartimento en el que habían recibido Nx, respecto al pre-condicionamiento, nos muestran que no existen diferencias significativas ($p>0.05$) en el número de cruces entre los distintos grupos experimentales (Figura 27).

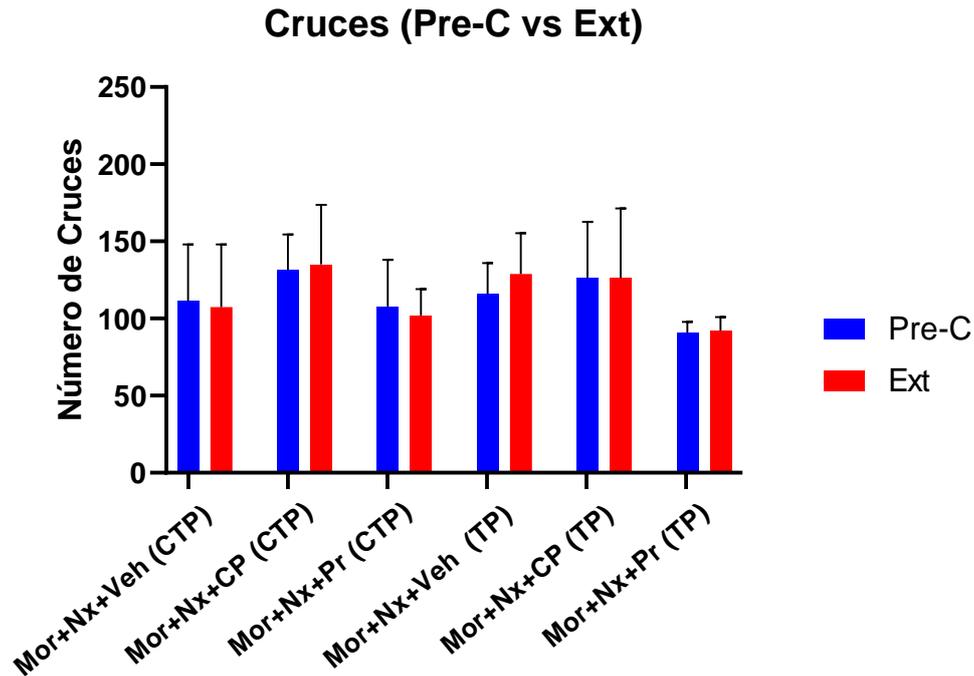


Figura 27. Número de cruces entre los compartimentos de puntos y rayas durante la extinción de la aversión y el pre-condicionamiento. Los datos se representan como la media \pm SEM. Pre-C: pre-condicionamiento; Ext: extinción. CTP: control Tail Pinch. TP: Tail Pinch. CP: CP-154,526. Pr: propranolol. Mor: morfina. Nx: naloxona. Veh: vehículo. n=8-16.

Seguidamente, se comparó también el número de cruces realizado por los ratones una vez se había extinguido la aversión al compartimento asociado a la Nx, respecto al post-condicionamiento. Nuestros resultados muestran que el número de cruces totales fue significativamente mayor durante el periodo de extinción ($p < 0.05$ y $p < 0.001$) en todos los grupos experimentales.

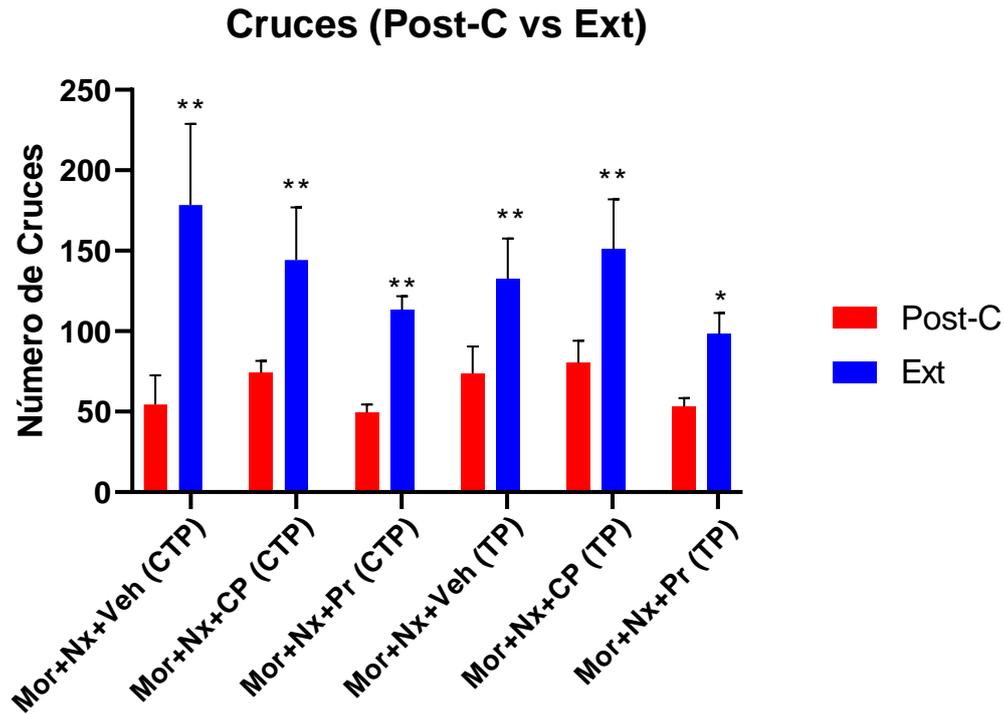


Figura 28. Número de cruces entre los compartimentos de puntos y rayas durante la extinción de la aversión y el post-condicionamiento. Los datos se representan como la media \pm SEM. Post-C: post-condicionamiento. Ext: extinción. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs Post-C. $n = 8-16$.

4.1.4.3. Número de cruces durante la recaída

Finalmente, los datos referentes a los cruces realizados por los animales en el momento de la recaída asociada a morfina respecto a los cruces en el momento de la extinción de la aversión nos muestran que hay una disminución estadísticamente significativa durante la recaída ($p < 0.05$) en el grupo de Mor+Nx+Veh que experimentó la situación estresante durante la extinción, sin diferencias en el resto de grupos experimentales (Figura 29).

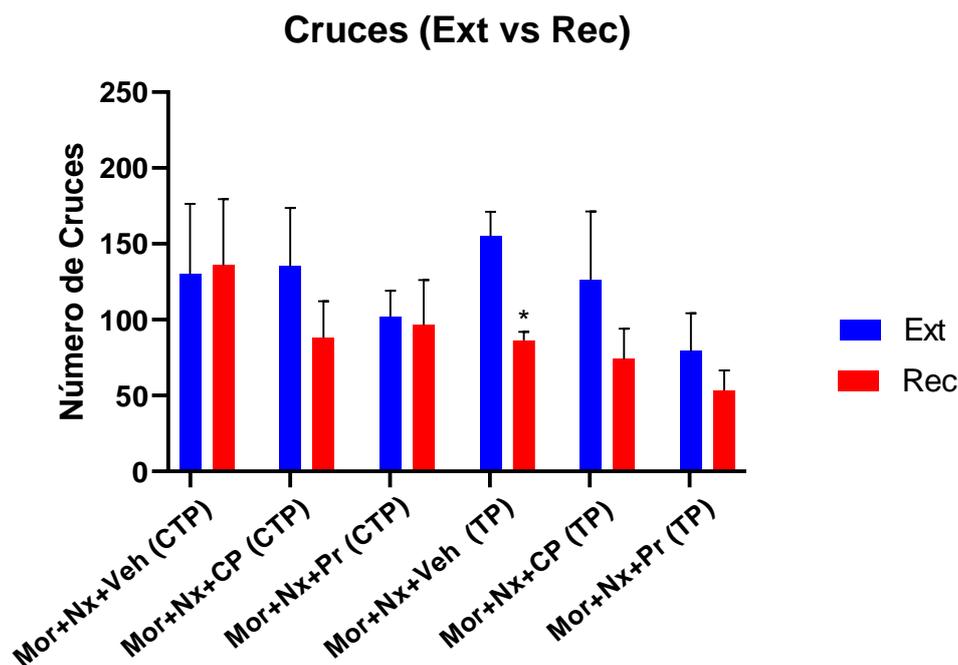


Figura 29. Número de cruces entre los compartimentos de puntos y rayas durante la extinción de la aversión y la recaída. Los datos se representan como la media \pm SEM. * $p < 0.05$ vs extinción. Rec: recaída. Ext: extinción. CTP: control Tail Pinch. TP: Tail Pinch. CP: CP-154,526. Pr: propranolol. Mor: morfina. Nx: naloxona. Veh: vehículo. $n = 8-16$.

4.2. EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE pERK1/2 Y pCREB EN CeA, NAc, BNST, BLA, PVN, VTA Y DG TRAS LA RECAÍDA INDUCIDA POR TP

Ya que es conocido que la adicción, el estrés y la memoria comparten mecanismos de modulación, nuestro siguiente objetivo fue investigar los posibles cambios moleculares que se originan en los sistemas del estrés hipotalámico y extrahipotalámico, y en los sistemas mesocorticolímbico dopaminérgico y límbico durante la recaída inducida por TP. Para ello, utilizamos la técnica del western blot para determinar la expresión de las proteínas pERK1/2 y pCREB a nivel de distintos núcleos cerebrales de los sistemas mencionados.

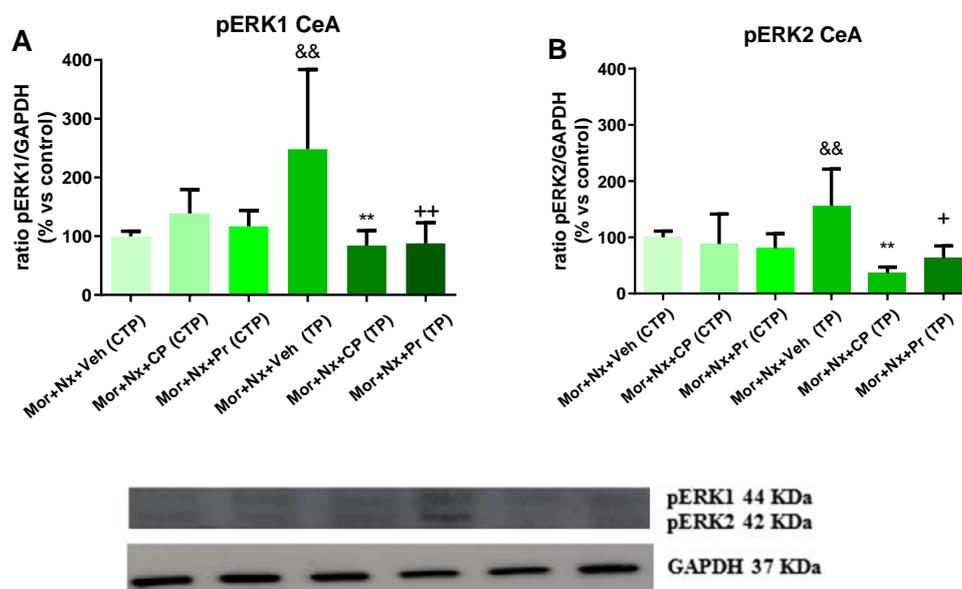
4.2.1. Expresión de pERK1/2 y pCREB en CeA tras la recaída inducida por TP

La ANOVA de doble vía sobre la expresión de pERK1 en CeA mostró influencia del tratamiento farmacológico [$F(2,26) = 3.808$; $p = 0.0355$] pero no del estímulo

estresante [$F(1,26) = 0.8514$; $p=0.3646$], así como una interacción entre el tratamiento farmacológico y el estímulo estresante [$F(2,26) = 3.808$; $p=0.0355$]. Como podemos observar en la figura 30A, nuestros resultados muestran que se produjo un aumento en la fosforilación de ERK1 en los animales a los que se les indujo TP y que no fueron previamente tratados con ningún fármaco, aumento que fue antagonizado por la administración de CP-154,526 y propranolol ($p<0.01$).

Resultados similares se obtuvieron respecto a la fosforilación de ERK2 (Figura 30B). Así, realizando el estudio ANOVA de dos vías observamos un efecto significativo del tratamiento farmacológico [$F(2,23) = 6.858$; $p=0.046$], aunque no así para el estímulo estresante [$F(1,23) = 0.6915$; $p=0.4142$]. Sí que se observa una interacción entre ambos [$F(2,23) = 4.254$; $p=0.0268$]. Mediante el análisis post hoc observamos un aumento en la fosforilación de ERK2 en el grupo Mor+Nx+Veh (TP), que fue antagonizado por CP y propranolol ($p<0.01$ y $p<0.05$, respectivamente).

Con respecto a la fosforilación de CREB en CeA (figura 30C), medida mediante el análisis ANOVA de dos vías, observamos únicamente influencia del tratamiento farmacológico [$F(2,19) = 3.571$; $p=0.0482$], pero no del estímulo estresante [$F(1,19) = 0.7498$; $p=0.3973$], ni interacción estadísticamente significativa entre ambos [$F(2,19) = 3.369$; $p=0.0560$]. Mediante ANOVA de una vía, encontramos un aumento en la expresión de pCREB en el grupo Mor+Nx+Veh (TP), mientras que los grupos de animales que recibieron CP-154,526 y propranolol disminuyeron significativamente ($p<0.05$) este incremento. No observamos diferencias significativas en los grupos control.



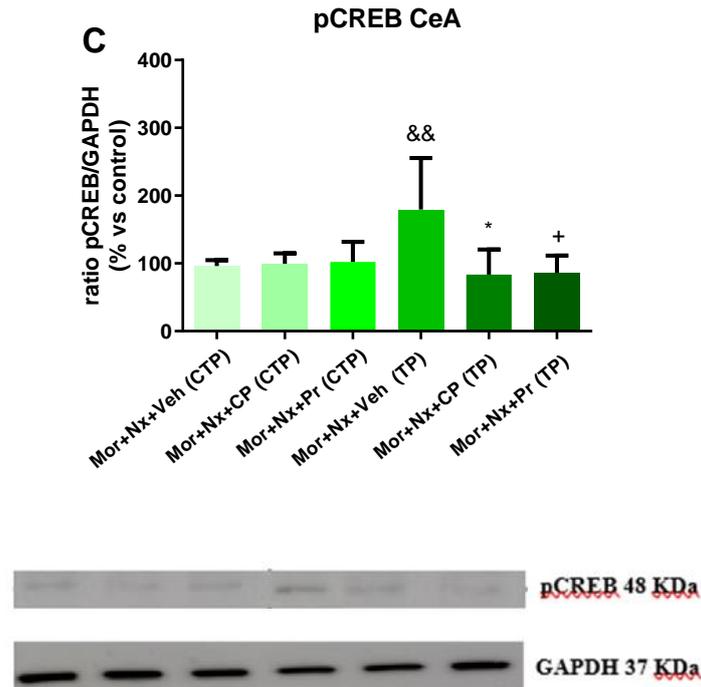


Figura 30. Expresión de pERK1/2 (A y B) y pCREB (C) en amígdala central (CeA) tras la recaída asociada a TP. La inmunorreactividad correspondiente a pERK1/2 y pCREB se expresa como el porcentaje de cambio con respecto al valor control (Mor+Nx+Veh, CTP) definido como el 100% del valor. * $p < 0.05$. + $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. ++ $p < 0.01$ vs Mor+Nx+Veh (TP); && $p < 0.01$ vs Mor+Nx+Veh (CTP). CTP: control Tail Pinch. TP: Tail Pinch. CP: CP-154,526. Pr: propranolol. Mor: morfina. Nx: naloxona. Veh: vehículo. $n = 4-8$.

4.2.2. Expresión de pERK1/2 y pCREB en NAc tras la recaída inducida por TP

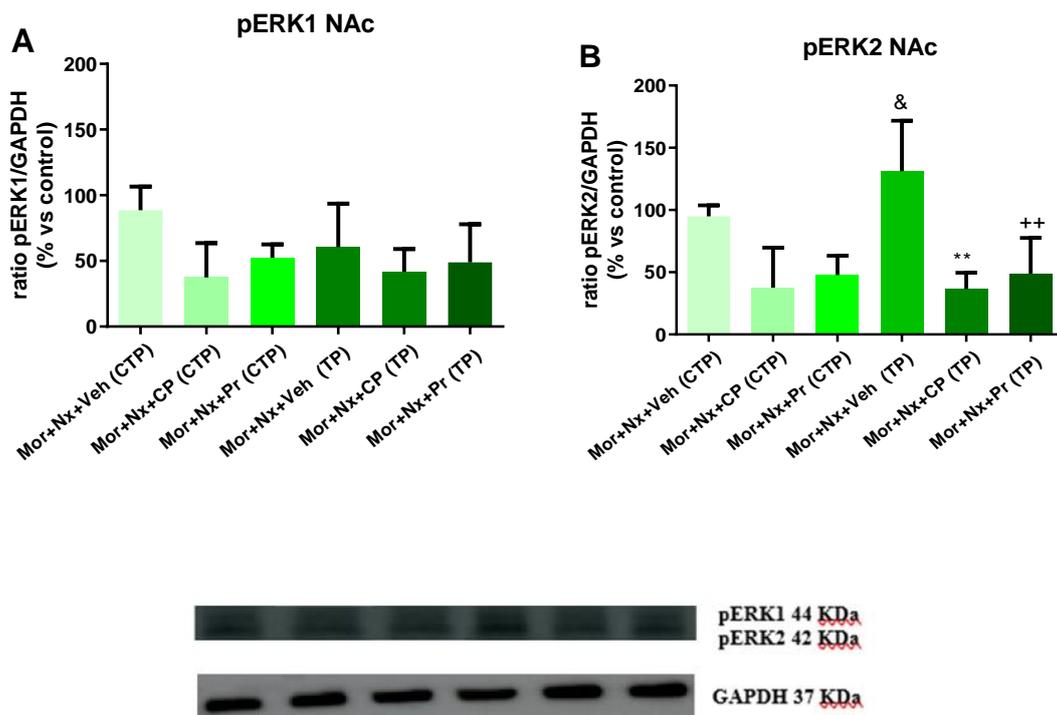
Los datos obtenidos mediante el análisis ANOVA de dos vías nos muestran una influencia del tratamiento farmacológico sobre la fosforilación de ERK1 en NAc [F (2,20) = 4.686; $p = 0.0214$] mientras que no muestra un efecto estadísticamente significativo del estímulo estresante [F (1,20) = 0.9573; $p = 0.3396$], ni en la interacción entre ambos [F (2,20) = 1.010; $p = 0.3821$].

El análisis post hoc indicó que no existen diferencias estadísticamente significativas entre ninguno de los grupos de estudio (figura 31A).

Con respecto a pERK2, el ANOVA de dos vías indicó la influencia del tratamiento farmacológico [F (2,26) = 23.34; $p < 0.0001$], mientras que esta no se encontró para el estímulo físico [F (1,26) = 1.579; $p = 0.2221$], ni se observó la interacción entre ellos [F (2,26) = 0.007339; $p = 0.9927$]. Los resultados obtenidos mediante el análisis ANOVA

seguido del test de Newman-Keuls (Figura 31B) indican que existe un aumento significativo ($p=0.05$) de la fosforilación de ERK2 en los animales que han recibido estímulo físico y vehículo frente a su control, que fue antagonizado en los grupos que fueron administrados con propranolol ($p<0.01$) o CP-154,526 ($p<0.01$). No observamos diferencias de los grupos con sus controles.

El estudio de la influencia del TP y del tratamiento farmacológico en la expresión de pCREB, medido mediante ANOVA de dos vías, nos indica que existe una influencia estadísticamente significativa de la aplicación o no del estímulo estresante [$F(1,19) = 6.491$; $p=0.0197$]. Sin embargo, no encontramos repercusión del tratamiento crónico [$F(2,19) = 1.083$; $p=0.3585$]. Tampoco observamos esta diferencia para la interacción entre ambos [$F(2,19) = 2.625$; $p=0.0985$]. Nuestros resultados para el estudio comparativo entre grupos (Figura 31C), medido mediante ANOVA de una vía, no mostraron diferencias significativas en la expresión de pCREB entre los distintos grupos de estudio.



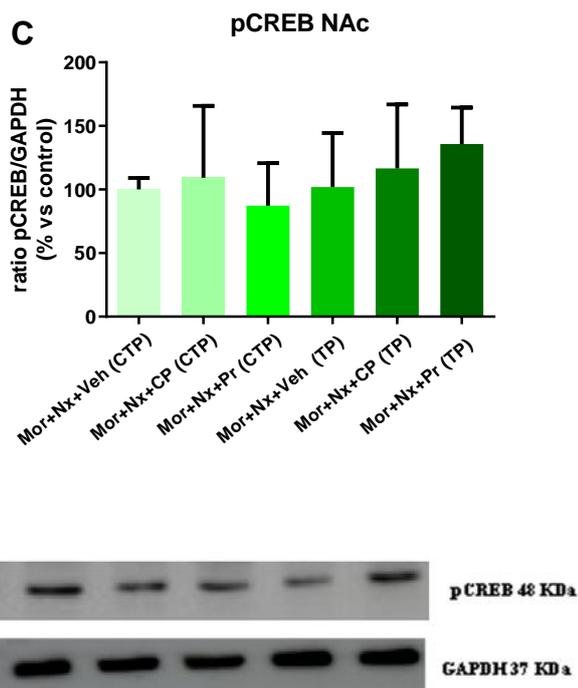


Figura 31. Expresión de pERK1/2 (A y B) y pCREB (C) en núcleo accumbens (NAc) tras la recaída asociada a TP. La inmunoreactividad correspondiente a pERK1/2 y pCREB se expresa como el porcentaje de cambio con respecto al valor control (Mor+Nx+Veh, CTP) definido como el 100% del valor. ** $p < 0.01$, ++ $p < 0.01$ vs Mor+Nx+Veh (TP), & $p < 0.05$ vs Mor+Nx+Veh (CTP). CTP: control Tail Pinch. TP: Tail Pinch. CP: CP-154,526. Pr: propranolol. Mor: morfina. Nx: naloxona. Veh: vehículo. $n = 3-8$.

4.2.3. Expresión de pERK1/2 y pCREB en BNST tras la recaída inducida por TP

Medimos mediante un ANOVA de dos vías la relación existente entre los distintos factores que influyen en la fosforilación de ERK1 en BNST. Observamos que el tratamiento farmacológico con CP-154,526 y propranolol tiene influencia [$F(2,25) = 5.723$; $p = 0.0093$] sobre los resultados. Por otro lado, el estímulo estresante ($F(1,25) = 1.847$; $p = 0.1868$) no muestra una influencia significativa, así como tampoco la interacción entre ambos [$F(2,25) = 2.845$; $p = 0.0779$]. En la figura 32A observamos un aumento de la fosforilación de ERK1 en el grupo Mor+Nx+Veh (TP) respecto al grupo control ($p < 0.01$). Además, el análisis ANOVA de una vía, seguido del test de Newman-Keuls mostró que la administración de propranolol o CP-154,526 induce una disminución significativa en la expresión de esta proteína ($p < 0.01$). No encontramos diferencias significativas en el resto de grupos entre sí.

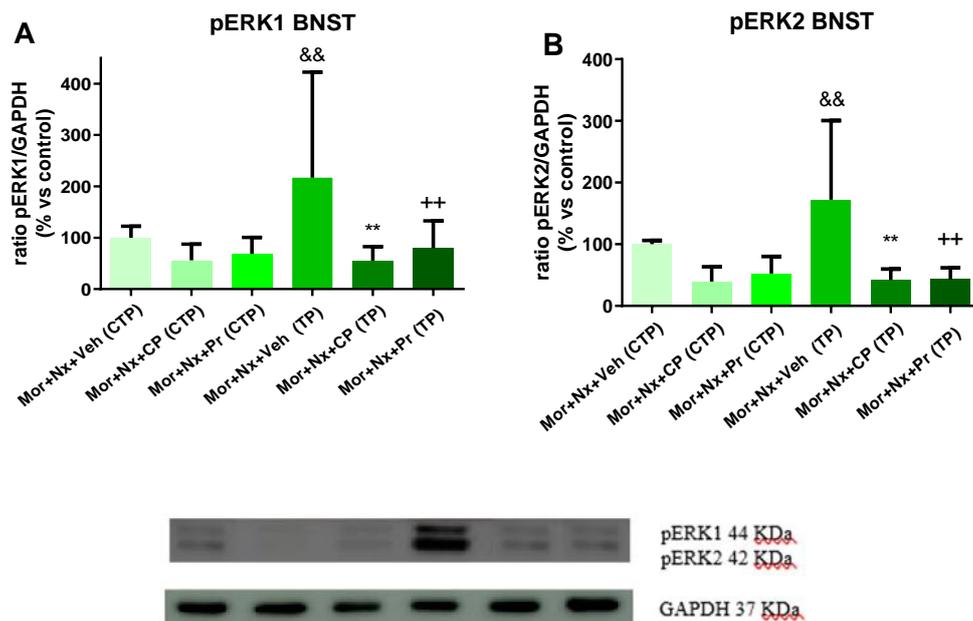
Respecto a la expresión de pERK2 en BNST, el análisis ANOVA de dos vías lanza resultados similares a los de las pERK1, observando la influencia del tratamiento

farmacológico [F (2,27) = 13.45; $p=0.0001$] y no la del estímulo estresante [F (1,27) = 3.732; $p=0.0648$]. La interacción entre ambos sí fue significativa [F (2,27) = 4.002; $p=0.0311$].

Nuestros resultados para la fosforilación de ERK2 en BNST (Figura 32B) muestran que existe un aumento significativo en el grupo que recibió el estímulo estresante y vehículo con respecto a su control ($p<0.01$), al igual que con aquellos que fue antagonizado en los grupos sometidos a TP que fueron inyectados con los antagonistas de CRF1R y del receptor β -adrenérgico ($p<0.01$).

Por su parte, al medir mediante ANOVA de dos vías la influencia de los distintos tratamientos en la fosforilación de CREB en BNST, observamos que los tratamientos farmacológicos presentan una influencia significativa [F (2,18) = 6.838; $p=0.0062$] sobre esta expresión. Por el contrario, el estímulo físico [F (1,18) = 0.03308; $p=0.8577$], es decir, la aplicación o no de TP, y la interacción entre ambos [F (2,18) = 1.014; $p=0.3825$], no presenta una influencia significativa.

Tras la realización del análisis ANOVA de una vía (Figura 32C) para estudiar la expresión de pCREB en BNST, observamos que los animales experimentan un aumento, aunque no significativo, cuando son sometidos al estímulo físico y han sido inyectados con vehículo, con respecto a su control. El propranolol y CP-154,526 bloquearon este aumento ($p<0.05$).



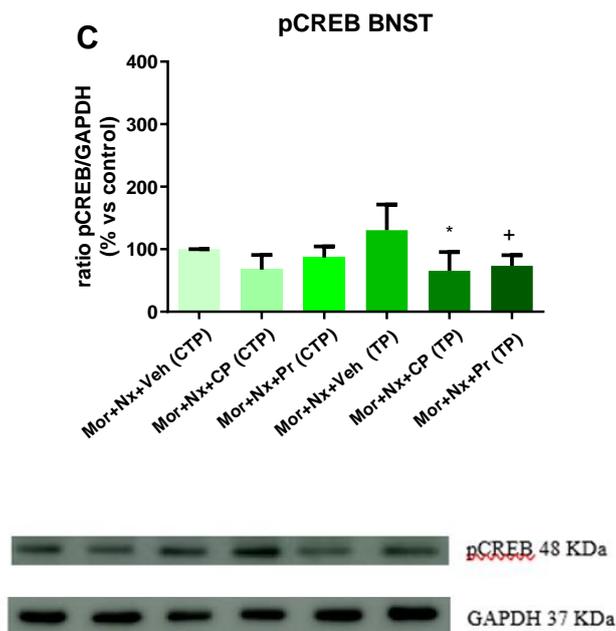


Figura 32. Expresión de pERK1/2 (A y B) y pCREB (C) en núcleo de la estría terminal (BNST) tras la recaída asociada a TP. La inmunoreactividad correspondiente a pERK1/2 y pCREB se expresa como el porcentaje de cambio con respecto al valor control (Mor+Nx+Veh, CTP) definido como el 100% del valor. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, + $p < 0.05$, ++ $p < 0.01$ vs Mor+Nx+Veh (TP). CTP: control Tail Pinch. TP: Tail Pinch. CP: CP-154,526. Pr: propranolol. Mor: morfina. Nx: naloxona. Veh: vehículo. $n = 3-8$.

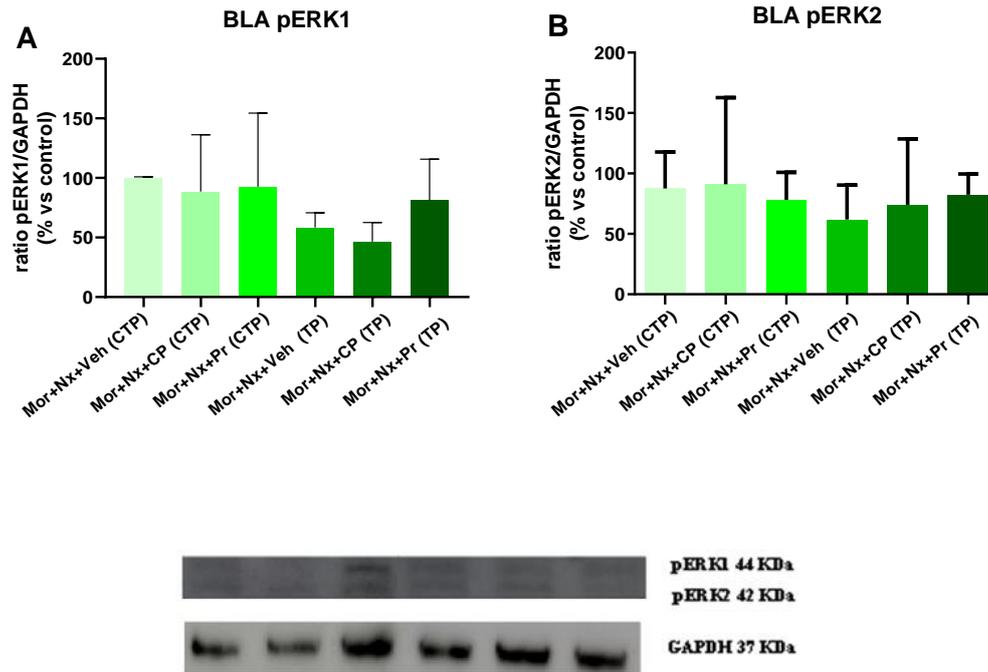
4.2.4. Expresión de pERK1/2 y pCREB en BLA tras la recaída inducida por TP

Los datos obtenidos mediante ANOVA de dos vías para la fosforilación de ERK1 en BLA nos muestran que existe una influencia en la aplicación del estímulo estresante sobre los animales objetos de estudio [$F(1,22) = 5.225$; $p = 0.0323$] mientras que los tratamientos farmacológicos no [$F(2,22) = 0.6699$], así como tampoco la interacción entre ambos [$F(2,22) = 0.5327$; $p = 0.5944$].

Por otro lado, el análisis ANOVA de dos vías para el estudio de la influencia de los tratamientos farmacológicos y el estímulo estresante en la fosforilación de ERK2 en BLA muestran que la administración de los tratamientos farmacológicos sí presentan una influencia significativa [$F(2,22) = 3.931$; $p = 0.0347$]. No ocurre así con la aplicación del estímulo físico [$F(1,22) = 0.5116$; $p = 0.4820$], ni con la interrelación entre ambos [$F(2,22) = 0.8504$; $p = 0.4408$].

Con respecto a la fosforilación de CREB en este núcleo, no encontramos influencia de los tratamientos farmacológicos [F (2,24) = 0.5401; p=0.5896], de TP [F (1,24) = 1.211; p=0.2821] o de la interacción entre ellos [F (2,24) = 3.094; p=0.0637].

Nuestros resultados para la expresión de proteínas pERK1, pERK2 y pCREB en BLA, medida mediante el post-hoc test de Newman-Keuls, nos muestran que no existen diferencias significativas entre los distintos grupos estudiados (Figuras 33A, 33B y 33C).



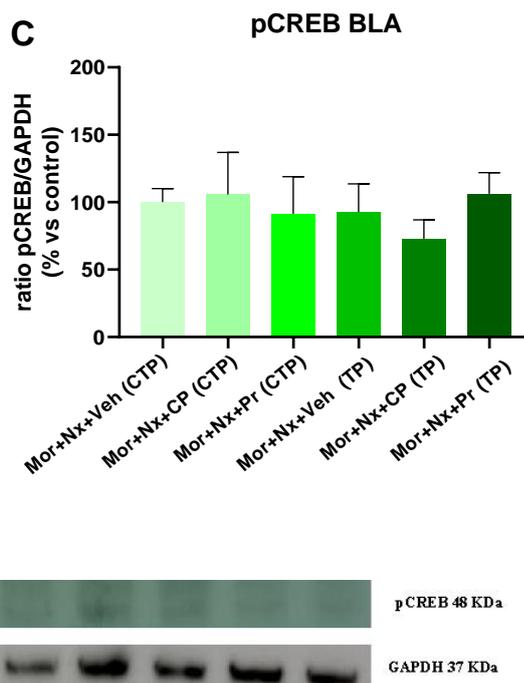


Figura 33. Expresión de pERK1/2 (A y B) y pCREB (C) en amígdala basolateral (BLA) tras la recaída asociada a TP. La inmunorreactividad correspondiente a pERK1/2 y pCREB se expresa como el porcentaje de cambio con respecto al valor control (Mor+Nx+Veh, CTP) definido como el 100% del valor. CTP: control Tail Pinch. TP: Tail Pinch. CP: CP-154,526. Pr: propranolol. Mor: morfina. Nx: naloxona. Veh: vehículo. n=4-8.

4.2.5. Expresión de pERK1/2 y pCREB en PVN tras la recaída inducida por TP

El estudio de la influencia de los tratamientos farmacológicos y la aplicación o no de estímulo estresante sobre la fosforilación de la proteína ERK1 en PVN mostró una influencia significativa de la administración del tratamiento farmacológico, CP-154,526 y propranolol [$F(2,22) = 7.3654$; $p=0.0036$]. Sin embargo, la aplicación del estímulo físico estudiado de forma individual no presenta una influencia significativa [$F(1,22) = 2.999$; $p=0.0973$], pero sí la interacción del estímulo físico y TP [$F(2,22) = 11.83$; $p=0.0003$].

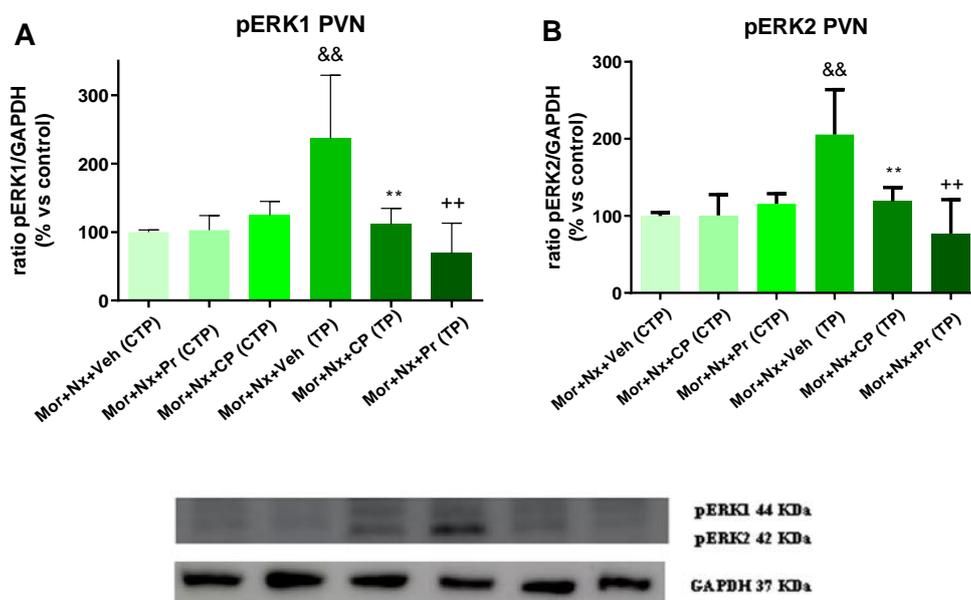
La comparación de los grupos entre sí con el test de Newman-Keuls para la expresión de pERK1 en TP (Figura 34A) mostró un aumento en la expresión de la proteína fosforilada en el grupo que recibió el estímulo físico y que no fue administrado con ningún fármaco con respecto a su control ($p<0.01$). Los grupos sometidos a TP y que fueron tratados con CP o propranolol presentaron una disminución significativa en los niveles de esta proteína al ser comparados con este grupo ($p<0.01$).

El análisis mediante ANOVA de dos vías para la fosforilación de ERK2 en PVN nos muestra que la aplicación de estímulo estresante [$F(1,22) = 4.887$; $p=0.0378$] presenta una influencia significativa sobre esta fosforilación. De igual forma, encontramos una influencia estadísticamente significativa en la aplicación del tratamiento farmacológico [$F(2,22) = 7.596$; $p=0.0031$]. También, la interacción entre ambos factores presenta características influyentes sobre este proceso [$F(2,22) = 11.42$; $p=0.0004$].

Nuestros resultados tras la aplicación del test de Newman-Keuls para la expresión de pERK2 en PVN nos muestran que, al igual que para pERK1, el grupo administrado con vehículo y expuesto a estrés presenta un aumento en la fosforilación de esta proteína con respecto a su grupo control ($p<0.01$). Los grupos que fueron administrados con CP-154,526 y propranolol no presentaron este aumento con respecto a sus controles, pero sí con respecto al grupo Mor+Nx+Veh (TP) ($p<0.01$) (Figura 34B).

Respecto a la fosforilación de CREB en PVN, el ANOVA de dos vías muestra influencia de los tratamientos farmacológicos [$F(2,21) = 11.49$; $p=0.0004$], del estímulo físico [$F(1,21) = 6.158$; $p=0.0216$] y de la interacción entre ellos ($F(2,21) = 7.547$; $p=0.0034$).

Asimismo, observamos un aumento significativo en la fosforilación de CREB en PVN en el grupo de estudio sometido a estrés y que no recibió vehículo ($p<0.01$) frente a su grupo control, aumento que fue antagonizado por CP y propranolol ($p<0.01$) (Figura 34C).



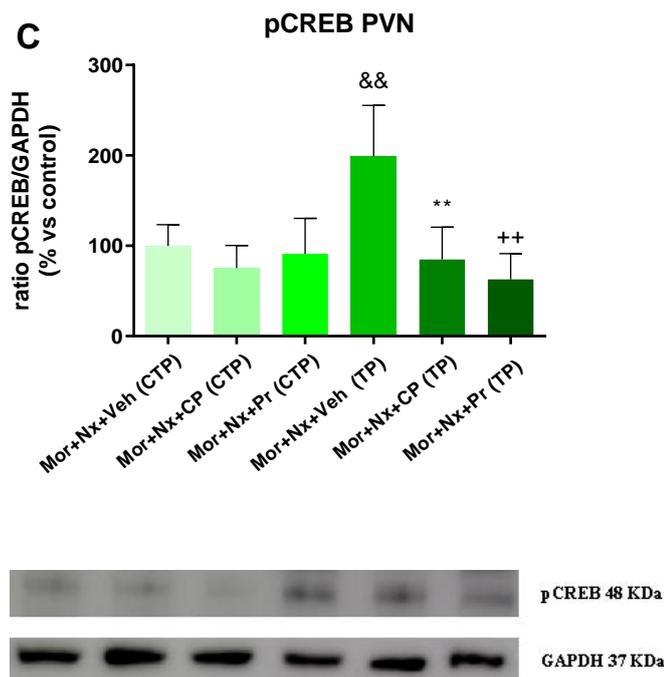


Figura 34. Expresión de pERK1/2 (A y B) y pCREB (C) en núcleo paraventricular (PVN) tras la recaída asociada a TP. La inmunorreactividad correspondiente a pERK1/2 y pCREB se expresa como el porcentaje de cambio con respecto al valor control (Mor+Nx+Veh, CTP) definido como el 100% del valor. ** $p < 0.01$. ++ $p < 0.01$ vs Mor+Nx+Veh (TP); && $p < 0.05$ vs Mor+Nx+Veh (CTP). CTP: control Tail Pinch. TP: Tail Pinch. CP: CP-154,526. Pr: propranolol. Mor: morfina. Nx: naloxona. Veh: vehículo. $n = 4-8$.

4.2.6. Expresión de pERK1/2 y pCREB en VTA tras la recaída inducida por TP

Los resultados obtenidos mediante ANOVA de dos vías nos indican que los tratamientos farmacológicos muestran una influencia estadísticamente significativa sobre la fosforilación de ERK1 en VTA [$F(2,21) = 22.60$; $p = 0.0001$]. También encontramos que no existe una influencia directa de los estímulos a los que han sido sometidos los animales [$F(1,21) = 4.020$; $p = 0.0580$] sobre esta fosforilación. Sí que encontramos influencia estadísticamente significativa en la relación entre ambos factores [$F(2,21) = 3.541$; $p = 0.0473$].

Por otro lado, los resultados obtenidos para la fosforilación de ERK1 en VTA nos muestran diferencias significativas entre los distintos grupos de estudio. Desplegando el test de comparación múltiple de Newman-Keuls, encontramos un aumento significativo en la expresión de pERK1 en el grupo que ha recibido estímulo físico y no ha sido administrados con tratamiento con respecto a su grupo control ($p < 0.01$) (Figura 35A). Se

puede observar, también, que los grupos fueron antagonizados farmacológicamente con propranolol y CP-154,526 disminuyeron este incremento ($p < 0.01$).

La realización de ANOVA de dos vías para el estudio de la influencia de los distintos tratamientos a los que han sido sometidos los animales sobre la fosforilación de ERK2 en VTA nos muestra que tanto el estímulo estresante [$F(1,23) = 5.986$; $p = 0.0225$], los tratamientos farmacológicos [$F(2,23) = 15.25$; $p < 0.0001$], así como la interacción entre ambos [$F(2,23) = 3.766$; $p = 0.0385$] presentan una influencia estadísticamente significativa en este proceso.

Además, el ANOVA de una vía muestra un aumento de la fosforilación de ERK2 en el grupo Mor+Nx+Veh (TP) con respecto a su grupo control ($p < 0.01$). En aquellos animales que recibieron el estímulo estresante, así como CP-154,526 y propranolol, se antagonizó este aumento ($p < 0.01$) (Figura 35B).

Al igual que con pERK2, el estudio mediante ANOVA de dos vías muestra la influencia de los tratamientos farmacológicos [$F(2,23) = 22.20$, $p < 0.001$], la aplicación de TP [$F(1,23) = 12.57$; $p = 0.0017$], así como la relación entre ambos [$F(2,23) = 4.666$, $p = 0.0199$] sobre la expresión de pCREB en VTA.

El análisis ANOVA de una vía también nos muestra que los animales sometidos a estrés y que recibieron vehículo presentan un aumento significativo en la expresión de pCREB en VTA con respecto al grupo que no sufrió estrés ($p < 0.01$). Por su parte, los grupos que sí recibieron los antagonistas propranolol y CP-154,526 ($p < 0.01$) experimentaron un descenso significativo en la fosforilación de esta proteína con respecto al grupo que recibió el estímulo y no fue administrado con estos fármacos. Finalmente, los animales que no recibieron estímulo estresante no experimentaron aumento en esta fosforilación (Figura 35C).

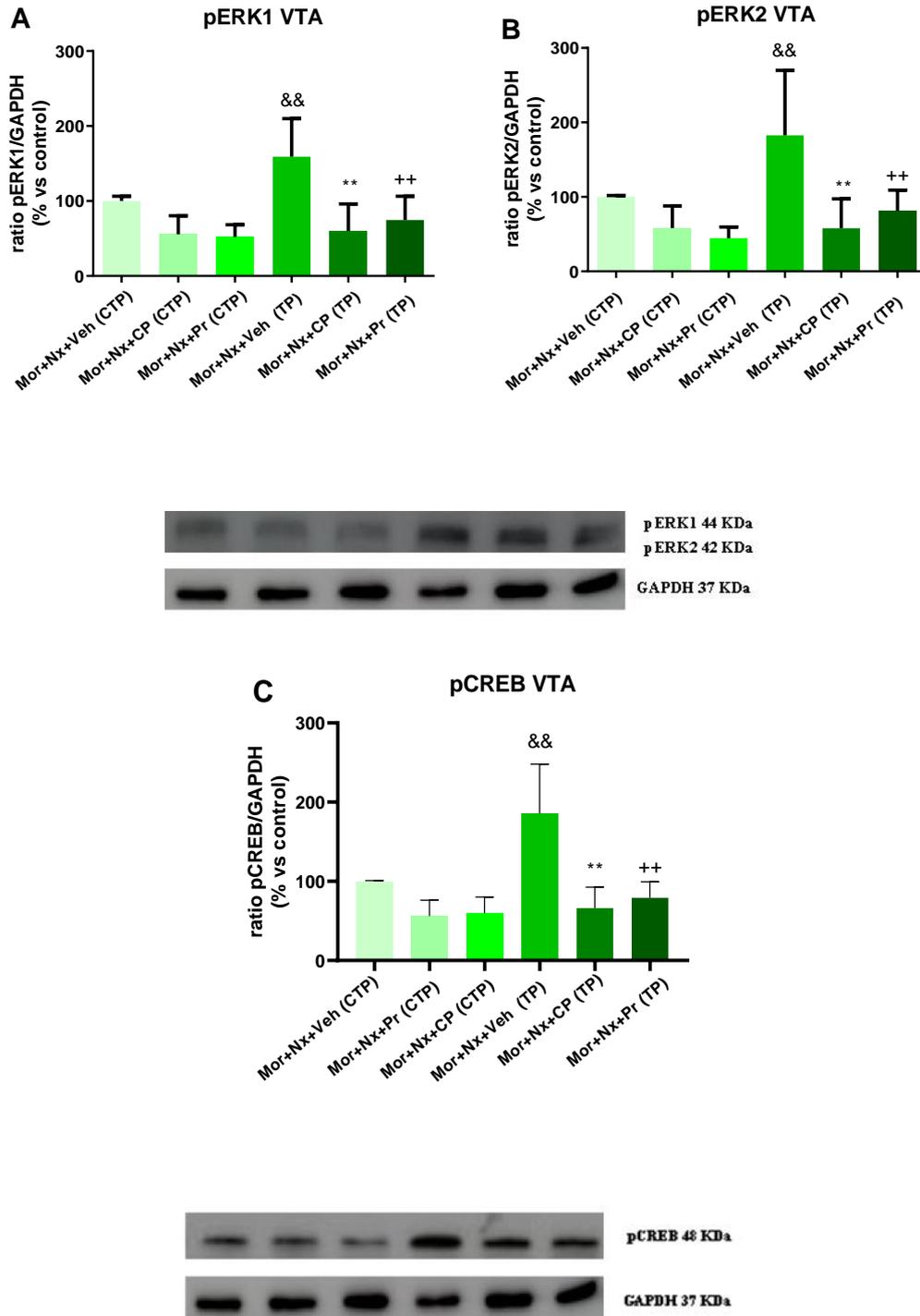


Figura 35. Expresión de pERK1/2 (A y B) y pCREB (C) en área tegmental ventral (VTA) tras la recaída asociada a TP. La inmunorreactividad correspondiente a pERK1/2 y pCREB se expresa como el porcentaje de cambio con respecto al valor control (Mor+Nx+Veh, CTP) definido como el 100% del valor. **p<0.01. ++p<0.01. frente a Mor+Nx+Veh (TP); &&p<0.05 vs Mor+Nx+Veh (CTP). CTP: control Tail Pinch. TP: Tail Pinch. CP: CP-154,526. Pr: propranolol. Mor: morfina. Nx: naloxona. Veh: vehículo. n=4-8.

4.2.7. Expresión de pCREB en DG tras la recaída inducida por TP

Nuestros resultados, medidos con ANOVA de dos vías, para estudiar la influencia de los distintos factores de estudio sobre la fosforilación de CREB en DG, nos muestran que los tratamientos farmacológicos administrados presentan una influencia directa [$F(2,21) = 22.04$; $p < 0.0001$] sobre esta fosforilación. Sin embargo, la aplicación de un estímulo físico estresante no presenta influencia significativa [$F(1,21) = 0.2240$; $p = 0.6409$], aunque sí la interrelación entre ambos factores [$F(2,21) = 22.04$; $p = 0.0004$].

Los resultados obtenidos para los animales que han sido administrados con vehículo y que han recibido el estímulo físico TP muestran un aumento estadísticamente significativo de la expresión de pCREB en DG con respecto a su grupo control ($p < 0.01$). De la misma manera, en la figura 36 observamos un descenso en la fosforilación de esta proteína en los grupos que, habiendo recibido estrés, fueron administrados con antagonistas de los receptores de CRF1 y β -bloqueantes con respecto al grupo que no fue antagonizado tras el estímulo estresante ($p < 0.01$). No se observaron cambios en los grupos control.

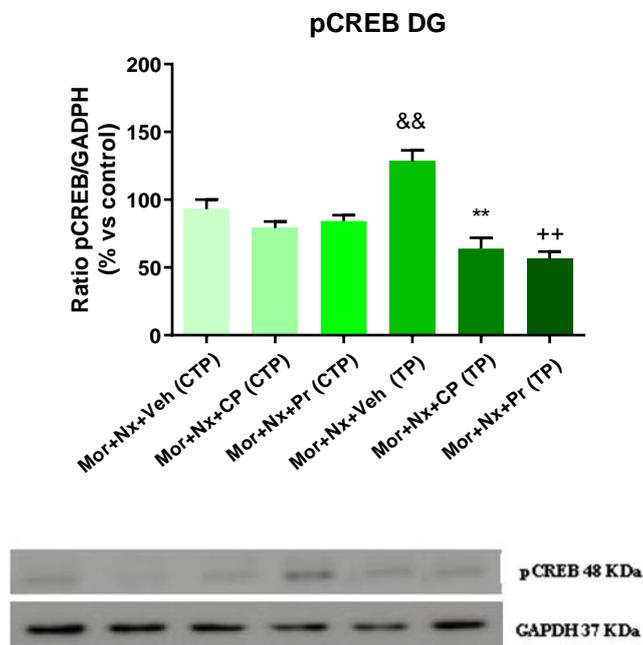


Figura 36. Expresión de pCREB en giro dentado (DG) tras la recaída asociada a TP. La inmunorreactividad correspondiente a pCREB se expresa como el porcentaje de cambio con respecto al valor control (Mor+Nx+Veh, CTP) definido como el 100% del valor. ** $p < 0.01$, ++ $p < 0.01$ vs Mor+Nx+Veh (TP); && $p < 0.05$ vs Mor+Nx+Veh (CTP). CTP: control Tail Pinch. TP: Tail Pinch. CP: CP-154,526. Pr: propranolol. Mor: morfina. Nx: naloxona. Veh: vehículo. $n = 4-8$.

4.2.8 Resumen de las variaciones de la expresión de pERK1/2 y pCREB en los distintos núcleos

NÚCLEO	pERK1			pERK2			pCREB		
	Veh	CP	Pr	Veh	CP	Pr	Veh	CP	Pr
CeA	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑
NAc	=	=	=	↑	↑	↑	=	=	=
BNST	↑	↑	↑	↑	↑	↑	=	↑	↑
BLA	=	=	=	=	=	=	=	=	=
PVN	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑
VTA	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑
DG	-	-	-	-	-	-	↑	↑	↑

Tabla 6. Tabla resumen en la expresión de pERK1/2 y pCREB en los distintos núcleos objeto de estudio en los grupos Mor+Nx+Veh (TP) frente a su control Mor+Nx+Veh (CTP), y Mor+Nx+CP (TP) y Mor+Nx+Pr (TP) frente a Mor+Nx+Veh (TP). ↑: aumento significativo, =: no hay diferencias significativas. CP: CP-154,526. TP: Tail Pinch. Pr: Propanolol. Mor: morfina. Nx: naloxona. Veh: vehículo.

5. DISCUSIÓN



El consumo de sustancias de abuso o drogas supone unos de los mayores problemas de salud pública en la sociedad actual. Los opiáceos, como la morfina y sus derivados, son sustancias con una gran capacidad para producir adicción. En los últimos años se ha visto incrementado el consumo de morfina y de derivados como el fentanilo (Upp y Waljee, 2020). A nivel nacional, también se ha producido un aumento del consumo de fármacos opioides con fines analgésicos bajo prescripción médica (Plan Nacional sobre Drogas, 2022).

El consumo de drogas lleva al individuo a desarrollar ciertas conductas, como el aumento de las veces o cantidad de droga que se consume, dejar de dedicar tiempo a otras actividades para buscar la droga, y otros hechos que derivan en el establecimiento de una dependencia (DSM-V). Cuando una persona dependiente de drogas no consume, aparece un estado caracterizado por la presencia de una serie de efectos negativos, conocido como síndrome de abstinencia, en el que se produce una disminución de la actividad del sistema dopaminérgico o de recompensa, y un aumento de los sistemas de estrés hipotalámico, extrahipotalámico, noradrenérgico y límbico (Koob y Volkow, 2010).

Es conocido que los síntomas negativos asociados al síndrome de abstinencia a sustancias de abuso contribuyen a la cronificación en el consumo de las mismas, al deseo intenso de consumir o “craving” y pueden derivar en una recaída (Koob, 2020), por lo que es básico poder entender los mecanismos implicados en los comportamientos afectivos durante este síndrome. Estudios previos han sugerido que los síntomas negativos del síndrome de abstinencia a nicotina y morfina están asociados a la aversión de plaza, hecho que podría motivar el mantenimiento de su consumo (Budzynska y cols., 2012).

El paradigma de CPA ha sido utilizado en este trabajo para analizar la aversión inducida por el síndrome de abstinencia a morfina. Este modelo nos ayuda a comprender la sintomatología negativa que produce el síndrome de abstinencia tras la administración de Nx y posibilita el estudio de los sustratos anatómicos, farmacológicos, genéticos y moleculares que subyacen en estos fenómenos (Navarro-Zaragoza y col., 2021).

La extinción de esta aversión tiene lugar cuando la asociación se debilita por la exposición repetida al estímulo asociado a la abstinencia, pero en ausencia del estímulo no condicionado, y se completa cuando, al ser posteriormente expuesto el animal, este ya no evita el contexto asociado al estímulo aversivo. Este proceso necesita de un

aprendizaje asociativo, consolidación y formación de una nueva memoria. Entre los sustratos neuronales que median estos componentes de la adicción se encuentran estructuras límbicas como BLA e hipocampo, regiones críticas para el aprendizaje, la memoria y el comportamiento afectivo (Roozendaal y McGaugh, 2011).

En esta investigación hemos observado que, animales dependientes de morfina y a los que posteriormente se les ha administrado un antagonista de los receptores opioides, Nx, pasaron menos tiempo en el compartimento asociado al antagonista opioide con respecto a la etapa de pre-condicionamiento, lo que indica aversión por dicho compartimento, es decir, estos ratones evitan aquél lugar en el que han experimentado una sensación desagradable. Estos resultados son similares a otros obtenidos por nuestro y otros laboratorios en diferentes especies de ratones (García-Carmona y cols., 2012, Martínez-Laorden y cols., 2020, Navarro-Zaragoza y cols., 2021), y demuestran la presencia de un aprendizaje asociado al efecto aversivo provocado por la Nx.

Estudios en animales han mostrado que los contextos asociados a una droga pueden provocar una respuesta condicionada (Schroeder y cols., 2000), y que esta respuesta puede desencadenar, a su vez, una respuesta consciente en el animal, como cambios en la actividad locomotora (Battisti y cols., 1999). Los resultados de nuestro estudio muestran una disminución significativa en el número de cruces que realizaron los animales entre las distintas cámaras de la caja de comportamiento durante el post-condicionamiento, respecto a los observados durante el pre-test. Estos cambios en la actividad locomotora condicionados por el ambiente donde los ratones recibieron la Nx estuvieron acompañados por una menor permanencia en este contexto, como se ha comentado. Nuestros resultados están en consonancia con otros estudios que han mostrado que la respuesta asociada al efecto negativo de una droga, como cambios en la actividad locomotora, puede desencadenarse por exposición al contexto asociado a la droga, pero en ausencia de ella (Kong y cols., 2022).

Existe mucha evidencia científica sobre los mecanismos neurobiológicos de la extinción de la memoria de recompensa (Bernardi y cols., 2006; Sanchís-Segura y Spanagel, 2006; Moorman y Aston-Jones, 2014), sin embargo poco se sabe acerca de la extinción de memorias aversivas provocadas por el síndrome de abstinencia a drogas (Myers y Carlezon, 2010). Nuestros resultados muestran aversión por el compartimento asociado a la Nx en animales dependientes de morfina hasta el día 15, que podría ser

mediada por procesos de consolidación de la memoria durante el post-condicionamiento. Estos resultados coinciden con otras investigaciones previas de nuestro laboratorio, donde los animales tardaron un número similar de días en extinguir su comportamiento aversivo (García-Carmona y cols., 2015, Martínez-Laorden y cols., 2020, Navarro-Zaragoza y cols., 2021). En la actualidad está ampliamente aceptado que la extinción de los recuerdos asociados a drogas es necesaria para instaurar un nuevo aprendizaje que borra el aprendizaje inicial, pero que no produce su olvido. Por esta razón, la extinción de estos recuerdos no resulta eficaz para reducir la recaída, ni en humanos ni en roedores (Everitt, 2014).

Respecto al número de cruces realizado por los ratones entre los diferentes compartimentos de la caja una vez extinguido el comportamiento aversivo, nuestros datos muestran que el número de cruces totales fue significativamente mayor tras la extinción en todos los grupos experimentales, al compararlo con los datos durante el post-condicionamiento. Por otra parte, tras la extinción, no se observaron diferencias con los valores obtenidos en el pre-condicionamiento, es decir, la actividad locomotora volvió a ser similar a la observada en ausencia del estímulo condicionado.

Estudios realizados en humanos y en modelos animales han evidenciado que el estrés desempeñaría un papel crítico en múltiples aspectos de la adicción, como el inicio y mantenimiento de la misma (Cleck y Blendy, 2008; Sinha, 2008; Koob, 2008b). Además, el estrés es considerado como un factor determinante de las recaídas en sujetos que han abandonado el consumo (Sinha, 2007; Martin-Fardon y cols., 2010, Ahrens y cols., 2018). Aunque desde hace tiempo el estrés se ha venido considerando como un factor que incrementa la vulnerabilidad a la adicción, ha sido en los últimos años cuando se han realizado estudios que han permitido entender algunos de los mecanismos responsables. Recientemente, se ha propuesto que las experiencias estresantes a las que se puede ver sometido un individuo, junto con otros factores (circunstancias adversas o experiencias desagradables, influencias genéticas), pueden desencadenar alteraciones que incrementan el riesgo de la adicción (Koob y Le Moal, 2008). Los mecanismos específicos más estudiados por los que el estrés incrementa este riesgo incluyen las modificaciones en la regulación de los circuitos cerebrales del estrés, especialmente los sistemas neuronales del CRF, y las vías noradrenérgicas (Laorden y cols., 2002).

En este estudio hemos utilizado el paradigma de CPA para valorar la posible implicación de los receptores de CRF1 y β -adrenérgicos en la recaída en el comportamiento aversivo desencadenada por estrés físico (TP), un tipo de estrés que se ha utilizado frecuentemente en estudios relacionados con los desórdenes mentales (Prieto y cols., 2003; Ribeiro Do Couto y cols., 2006).

Nuestros resultados muestran que durante la recaída inducida por la exposición a estrés de tipo físico (TP) se produce una disminución del tiempo que el animal pasa en el compartimento asociado a la Nx, del que probablemente tiene recuerdos negativos, volviendo a valores similares a los observados durante el post-condicionamiento. Un estudio aún no publicado de nuestro laboratorio ha mostrado resultados similares tras la aplicación de otros tipos de estrés, como es el estrés social o *social defeat* y el estrés por inmovilización o restraint. Por otra parte, la administración de CP-154,526 y propranolol, antagonistas de los receptores de CRF1 y β -adrenérgicos, respectivamente, revirtió este efecto, lo que sugiere que el CRF1R y, por tanto, el sistema cerebral del estrés, y la neurotransmisión noradrenérgica a través de sus receptores β , son necesarios para la recaída en el CPA inducida por estrés en animales que habían extinguido su aversión. Estos resultados están de acuerdo con estudios previos de nuestro y de otros laboratorios donde se observó que la administración sistémica de antagonistas de CRF1R (Contarino y Papaleo, 2005; Stinus y cols., 2005; Valero y cols., 2018) o la delección del gen encargado de la producción de CRF1R (García-Carmona y cols., 2012) disminuye la aversión de plaza inducida por el síndrome de abstinencia a morfina. En nuestro laboratorio también observamos que los antagonistas de CRF1R eran capaces de bloquear los síntomas negativos del síndrome de abstinencia a morfina (Navarro-Zaragoza y cols., 2010). Además, en modelos de CPP, se ha visto que el propranolol bloquea el proceso de reconsolidación de la memoria de recompensa provocada por la administración de morfina (Robinson y Franklin, 2007; Wu y cols., 2014). Otros estudios han mostrado que el propranolol disminuye la respuesta fisiológica provocada por la reactivación de la memoria de un evento traumático (Brunet y cols., 2008) o que es capaz de modular el procesamiento de la memoria asociada a la recaída a cocaína (Saladin y cols., 2013). Todos estos resultados nos ayudan a pensar en el posible papel terapéutico de estos fármacos en la prevención de recaídas en sujetos adictos.

Con relación al número de cruces realizado por los animales entre los diferentes compartimentos de la caja durante la recaída inducida por estrés, nuestros datos muestran

que el número de cruces totales fue significativamente menor, al compararlo con los datos tras la extinción de la aversión en este grupo experimental, indicando que el estrés físico indujo la reactivación del CPA y, por tanto, redujo la actividad locomotora. Esto indicaría que los cambios en la actividad del ratón podrían ser debidos a estímulos condicionados asociados a la droga que provocarían la recaída en el comportamiento anterior (Hou y cols., 2023).

Uno de los mayores problemas de la adicción es la tendencia a las recaídas que se produce entre los sujetos adictos. En la compulsión por el uso de la droga y posterior recaída influyen factores relacionados con la ansiedad y estructuras cerebrales relacionadas con el estrés. En concreto, la amígdala extendida y el eje HHA han sido implicados en múltiples aspectos del ciclo de la adicción (Koob y Volkow, 2010). La amígdala extendida está constituida por diferentes estructuras que se encuentran interconectadas anatómicamente y funcionalmente, incluyendo a CeA, BNST y a la parte más externa (shell) de NAc. Estas regiones reciben numerosas proyecciones de estructuras límbicas, como BLA e hipocampo, y de núcleos noradrenérgicos, como el NTS y, a su vez, envían proyecciones a numerosas áreas cerebrales. Se ha propuesto que este sistema podría desempeñar una importante función en algunos de los componentes negativos asociados al síndrome de abstinencia a muchas sustancias de abuso, mediante los sistemas neuronales de CRF, dinorfina y NA, que desempeñarían un papel crítico en los efectos del estrés en la adicción. Dichos sistemas de neurotransmisión han sido implicados en varios aspectos de la dependencia, como el deseo incontrolado por el consumo (craving), las recaídas tras largos periodos de abstinencia y la sintomatología aversiva que caracteriza al síndrome de abstinencia a diferentes sustancias de abuso (Sinha, 2007 y 2008).

Las sustancias de abuso producen alteraciones en la regulación del sistema cerebral del estrés, tales como modificaciones en la liberación de CRF, ACTH y GC, que podrían contribuir significativamente a los estados emocionales negativos que caracterizan el síndrome de abstinencia. Todo ello implica un aumento en la tendencia a las recaídas (Le Moal y Koob, 2007; Briand y Blendy, 2010). Diferentes estudios han propuesto que el eje HHA, al igual que la amígdala extendida, jugarían un importante papel en la vulnerabilidad al inicio de consumo de drogas mediante la liberación de CRF y GC (Goeders, 2003; Ambroggi y cols., 2009). Además, el síndrome de abstinencia se ha asociado con un aumento en la liberación de CRF y NA en BNST y amígdala, junto

con una activación del eje HHA, y se ha propuesto que este eje sería vital para la adquisición del hábito de consumo de drogas y que los GC, junto con los neurotransmisores del sistema del estrés, podrían ser uno de los factores determinantes de la vulnerabilidad al abuso de sustancias adictivas (Sinha, 2008; Le Moal y Koob, 2007).

Por otra parte, el BDNF es una neurotrofina que ha sido intensamente estudiada en los últimos años porque es capaz de regular varias formas de plasticidad sináptica en hipocampo y amígdala (Cowansage y cols., 2010; Bekinschtein y cols., 2013, Andero y cols., 2014; Du y cols., 2023). En el hipocampo, esta neurotrofina está implicada en el aprendizaje (Chen y cols., 2010) y la memoria (Bekinschtein y cols., 2013). Además, BDNF parece ser necesario para la extinción de memorias aversivas en diferentes núcleos cerebrales (Wang y cols., 2012). En relación con las vías de señalización implicadas en las acciones de BDNF sobre la memoria, se ha propuesto que existe una asociación directa entre BDNF, y su receptor TrkB, y la activación de ERK1/2 y CREB durante los procesos de consolidación de la memoria (Bekinschtein y cols., 2013).

Las ERKs juegan un importante papel en la plasticidad sináptica a largo plazo (Thomas y Huganir, 2004) y se consideran potentes reguladores de la transcripción génica en la formación de la memoria a largo plazo (Miller y Marshall, 2005). Se ha postulado que las ERKs regulan la acetilación de histonas en hipocampo (Chandramohanetal, 2008). Además, se ha observado una activación de estas proteínas en CPF ventromedial tras la extinción de la memoria aversiva (Wang y cols., 2012). Las ERKs pueden regular la transcripción génica mediante la fosforilación de CREB a través de la cascada de señalización mediada por las MAPKs (Ma y cols., 2023). También se sabe que CREB está implicado en los procesos de memoria (Han y cols., 2007; Zhou y cols., 2009; Rogerson y cols., 2014; Park y cols., 2020).

Ya que es conocido que la adicción, el estrés y la memoria comparten mecanismos de modulación, en este estudio hemos investigado los posibles cambios moleculares que se originan en los sistemas del estrés hipotalámico y extrahipotalámico, y en los sistemas mesocorticolímbico dopaminérgico y límbico durante la recaída inducida por TP. Para ello, determinamos la expresión de las proteínas pERK1/2 y pCREB a nivel de distintos núcleos cerebrales de los sistemas mencionados.

En los núcleos CeA, PVN y VTA, nuestros resultados muestran un aumento significativo en la fosforilación de ERK1 y ERK2 en los animales a los que se les indujo

TP y que no fueron previamente tratados con ningún fármaco respecto al grupo control que no recibió el estímulo estresante. Esto indica un papel de la proteína ERK en el proceso adictivo, que ya se había observado en otros estudios (Cao y cols., 2005; Li y cols., 2010; Almela y cols., 2012). Por otro lado, la administración de CP-154,526 y propranolol en los animales sometidos a TP indujo una disminución significativa en los valores de esta proteína, comparado con el grupo sometido a estrés físico que no recibió tratamiento con estos fármacos. Con respecto a la expresión de pCREB en estos núcleos y DG tras la recaída inducida por el estrés aplicado, observamos un aumento de esta proteína, que fue antagonizado por la administración de los antagonistas de los receptores de CRF1 y β -adrenérgicos. Estos resultados también sugieren la participación de CREB en los procesos de memoria, como se ha comentado previamente.

CeA es un núcleo del sistema del estrés extrahipotalámico, rico en neuronas de CRF, capaz de mediar las respuestas de miedo y de aversión de plaza. De acuerdo con los resultados obtenidos en este trabajo a este nivel con CP-154,526 en la recaída, estudios previos han mostrado que la administración de antagonistas de CRF, como el α -helical CRF, bilateralmente en CeA, es capaz de revertir el CPA asociado a la administración de antagonistas opioides a animales dependientes de morfina, indicando que el bloqueo de los circuitos de CRF en amígdala debilita los estímulos aversivos y sugiere un papel del CRF a este nivel en la adquisición de las respuestas comportamentales asociadas a los efectos negativos provocados por el síndrome de abstinencia a morfina (Heinrichs y cols., 1995).

Se ha propuesto que los cambios en BDNF y en su vía de señalización alteran la función de las neuronas del circuito VTA-NAc y otras regiones del sistema de recompensa para modular la respuesta motivacional asociada al consumo de drogas (Pierce y Bari, 2001; Bolanos y Nestler, 2004). Esta plasticidad neuronal a nivel de VTA es crítica para el establecimiento de la dependencia de sustancias de abuso. Estudios previos han mostrado que la conexión a través de aferencias gabaérgicas entre CeA y VTA es esencial para la adquisición de la respuesta negativa asociada al síndrome de abstinencia a morfina (Jiang y cols., 2021). Por tanto, los resultados similares obtenidos en nuestro estudio a nivel de CeA y de VTA con respecto a la expresión de pERK y pCREB serían consistentes con esta interconexión entre los circuitos cerebrales de recompensa y del estrés.

El hipocampo es una región cerebral que se ha relacionado con los procesos asociativos implicados en la memoria de drogas. Este núcleo recibe aferencias directas de NAc y puede activar neuronas dopaminérgicas en VTA (Zhou y Zhu, 2006). Es conocido que PVN tiene un importante papel en los efectos reforzadores de los opioides (Zhou y Zhu, 2006) y recientemente se ha sugerido que la respuesta de PVN a diferentes señales es reforzada a través de estimulación indirecta procedente de neuronas dopaminérgicas de VTA (Ewan y Martin, 2011). Además, se sabe que PVN e hipocampo están relacionados con el sistema de recompensa (Cooper y cols., 2017). Estudios previos de nuestro laboratorio han mostrado un incremento de neuronas positivas para CREB en PVN y DG durante el CPP inducido por morfina, aumento que fue atenuado por la administración sistémica de CP-154,526 en ambos núcleos, sugiriendo un papel de CREB en las propiedades reforzantes positivas de la morfina (García-Carmona y cols., 2015). Los resultados de nuestro estudio muestran datos similares en PVN y VTA, tanto para pERK como para pCREB, junto con DG, durante la recaída asociada a morfina, lo que refuerza esta conexión entre núcleos cerebrales pertenecientes a los sistemas límbico, del estrés y mesocorticolímbico y apunta a la importancia de CREB en los procesos de memoria asociada a drogas.

También con relación a la implicación del CRF en el hipocampo, se ha demostrado que antagonistas del CRF1R, como el SSR125543A, son capaces de revertir la alteración en la neurogénesis hipocampal inducida por el estrés, reforzando la idea del importante papel de este péptido del sistema del estrés en la plasticidad neuronal (Alonso y cols, 2004).

Como se ha comentado anteriormente, se sabe que BDNF, ERK y CREB trabajan conjuntamente para promover la plasticidad cerebral mediante la transducción de señales extracelulares al núcleo para regular la expresión génica (Ehrlich y Josselyn, 2016). La vía de transducción de señales de las MAPKs transmite información sobre estímulos extracelulares para regular la expresión de CREB (Lee y Messing, 2008). El hecho de que en nuestro estudio observemos cambios en la expresión de pERK en BNST, pero no de pCREB, sugiere que otras vías de señalización como la vía de la PKA, la vía de calcio intracelular a través de las quinasas dependientes de calmodulina (CaMK) o la vía del fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K)/Akt podrían estar participando en la regulación de este factor de transcripción en este núcleo cerebral durante el proceso de recaída en el consumo de sustancias de abuso.

BLA es una región cerebral involucrada en la adquisición y consolidación de memorias asociativas relacionadas con las drogas (He y cols., 2011; Guo y cols., 2024) y diversos autores han mostrado cambios en la vía de señalización MEK-ERK, por ejemplo, durante la extinción del CPP inducido por morfina (Wang y cols., 2014) o tras la extinción de memorias de miedo (Heinrichs y cols., 2013; Kawaminami y cols., 2022). Sin embargo, y, en consonancia con los resultados obtenidos en este trabajo, donde no observamos cambios en la fosforilación de ERK o CREB en este núcleo tras la recaída inducida por estrés, Guo y cols. (2024) han demostrado una respuesta diferente durante la recaída de memorias asociadas al síndrome de abstinencia a morfina en función de las proyecciones neuronales desde BLA. Así, se observaron cambios en pERK en neuronas que proyectan a NAc, pero no en las que proyectan al córtex prelímbico. Otro estudio (Song y cols., 2019) mostró que, aunque las neuronas localizadas en BLA que proyectan a esta región límbica están implicadas en la recuperación de la memoria asociada al síndrome de abstinencia a morfina, no se observaron cambios en la expresión del marcador de plasticidad neuronal Arc, un gen que está asociado con la recuperación de la memoria (Alaghban y cols., 2014). Por otra parte, se ha visto que la respuesta al CPP inducido por morfina es dependiente de la zona de la amígdala analizada, observando cambios en CeA, pero no en BLA (Navratilova y cols., 2020). Por tanto, se necesitan más estudios para conocer cómo participan estos circuitos neuronales en la regulación de la vía de señalización BDNF-ERK-CREB y otras vías.

En cuanto al núcleo accumbens, estudios recientes han mostrado que las subregiones de NAc, corteza y núcleo, juegan papeles diferentes en los procesos de memoria asociados a drogas. Por ejemplo, Miller y Marshall (2005) observaron que estímulos contextuales asociados a la cocaína activan la vía de las ERK solamente en el núcleo de NAc. Sin embargo, estudios de microdiálisis han mostrado un aumento en la liberación de DA en la corteza de NAc, pero no en el núcleo, asociado a la memoria relacionada con la administración de morfina (Bassareo y cols., 2007). Otros autores han concluido que para la recuperación del comportamiento de búsqueda de heroína es necesaria la activación de la corteza de NAc pero no de receptores D1 o la liberación de glutamato en el núcleo de este (Bossert y cols., 2006). Por último, otros estudios han mostrado que el CPP de morfina incrementa la fosforilación de ERK selectivamente en la corteza de NAc, pero no en el núcleo (Xu y cols., 2012). Teniendo en cuenta todos

estos datos, podemos sugerir que la corteza de NAc, pero no el núcleo, estaría implicada en la respuesta condicionada inducida por la memoria asociada al consumo de opioides.

Por tanto, nuestros resultados sugieren la implicación de las vías de señalización de las ERK, así como del factor de transcripción CREB en los cambios observados tras la exposición a estrés de tipo físico en distintos núcleos cerebrales como CeA, DG, PVN o VTA en ratones con antecedentes de dependencia de morfina, lo que además, sugiere la participación de estos núcleos en los procesos de aprendizaje y consolidación de la memoria presentes durante la adicción a sustancias de abuso, así como un papel central para el receptor 1 de CRF y el receptor β -adrenérgico en la aparición de recaídas en adicción, y su relación con las vías anteriormente mencionadas.

6. CONCLUSIONES



Tras analizar los resultados de este estudio podemos concluir que:

1. La administración de Nx a ratones tratados crónicamente con morfina induce un síndrome de abstinencia con un efecto aversivo, medido mediante el paradigma de CPA. La menor permanencia de los animales en el contexto asociado a la Nx estuvo acompañada de una disminución significativa en el número de cruces que realizaron los animales entre las distintas cámaras de la caja de comportamiento.
2. La aplicación de un estímulo estresante, como es el TP o pinzamiento de cola, induce la recaída en el comportamiento aversivo en animales dependientes de morfina que habían extinguido este comportamiento. La administración de CP-154,526 y propranolol, antagonistas selectivos del CRF1R y del receptor β -adrenérgico, respectivamente, fue capaz de antagonizar este efecto. Además, durante la recaída, el número de cruces totales fue significativamente menor, al compararlo con los datos tras la extinción de la aversión, indicando que el estrés físico indujo la reactivación del CPA y, por tanto, redujo la actividad locomotora. Estos resultados demuestran que los sistemas de CRF y noradrenérgico están claramente implicados en los procesos adictivos, particularmente, en los efectos aversivos asociados al síndrome de abstinencia a morfina.
3. Durante la recaída provocada por la aplicación de TP se produce un incremento en la fosforilación de ERK y CREB en CeA, PVN, VTA y DG, que fue antagonizado por la administración de CP-154,526 y propranolol. También observamos un aumento de pERK, pero no de pCREB, en BNST, revertido por estos fármacos. Finalmente, no se observaron cambios en la expresión de pERK y pCREB en BLA y en NAc. Estos resultados indican que existen regiones cerebrales críticas en las recaídas en el comportamiento aversivo inducido por un episodio agudo de estrés físico y otras que no estarían directamente implicadas en estos procesos. Sin embargo, son necesarios más estudios para conocer cómo participan estos circuitos neuronales en la regulación de la vía de señalización BDNF-ERK-CREB.
4. Nuestros resultados sugieren que el CRF1R y el receptor β -adrenérgico participan en los procesos de aprendizaje que subyacen en las recaídas en los comportamientos aversivos inducidas por estrés y que CP-154,526 y propranolol podrían ser buenos candidatos para el tratamiento de sujetos adictos en la prevención de las recaídas en el consumo de sustancias de abuso.

7. BIBLIOGRAFÍA



Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios (AEMPS). Utilización de medicamentos opioides en España durante el periodo 2008-2015. Informe de utilización de medicamentos U/OPI/V1/13022017; 2017.

Ahrens S, Wu MV, Furlan A, Hwang G-R, Paik R, Li H, et al. A central extended amygdala circuit that modulates anxiety. *J Neurosci*. 2018; 38:5567-83. DOI: 10.1523/jneurosci.0705-18.2018.

Alegre CR, Leiva SJ. Esquema de tratamiento escalonado no opioide para reducir la adicción a la morfina: reporte de un caso. *Rev Esp Drogodepend*. 2020; 45:87-92.

Al-Hasani R, McCall JG, Bruchas MR. Exposure to chronic mild stress prevents kappa opioid-mediated reinstatement of cocaine and nicotine place preference. *Front Pharmacol*. 2013a; 4:96. DOI: 10.3389/fphar.2013.00096.

Al-Hasani R, McCall JG, Foshage AM, Bruchas MR. Locus coeruleus kappa-opioid receptors modulate reinstatement of cocaine place preference through a noradrenergic mechanism. *Neuropsychopharmacology*. 2013b; 38:2484-97. DOI: 10.1038/npp.2013.151.

Al-Hasani R, McCall JG, Shin G, Gomez AM, Schmitz GP, Bernardi JM, et al. Distinct subpopulations of nucleus accumbens dynorphin neurons drive aversion and reward. *Neuron*. 2015; 87:1063-77. DOI: 10.1016/j.neuron.2015.08.019.

Almela P, Navarro-Zaragoza J, García-Carmona J-A, Mora L, Hidalgo J, Milanés MV, et al. Role of corticotropin-releasing factor (CRF) receptor-1 on the catecholaminergic response to morphine withdrawal in the nucleus accumbens (NAc). *PLoS One*. 2012; 7:e47089. DOI: 10.1371/journal.pone.0047089.

Alonso R, Griebel G, Pavone G, Stemmelin J, Le Fur G, Soubrié P. Blockade of CRF(1) or V(1b) receptors reverses stress-induced suppression of neurogenesis in a mouse model of depression. *Mol Psychiatry*. 2004; 9:278-86, 224. DOI: 10.1038/sj.mp.4001464.

Álvarez Y, Farré M. Farmacología de los opioides. *Adicciones*. 2005; 17:21-40. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/2891/289122022016.pdf>.

Amaral DG, Scharfman HE, Lavenex P. The dentate gyrus: fundamental neuroanatomical organization (dentate gyrus for dummies). *Prog Brain Res*. 2007; 163:3-22. DOI: 10.1016/S0079-6123(07)63001-5.

Ambroggi FC, Turiault M, Milet A, Deroche-Gamonet V, Parnaudeau S, Balado E, et al. Stress and addiction: glucocorticoid receptor in dopaminergic neurons facilitates cocaine seeking. *Nat Neurosci*. 2009; 12:247-49. DOI: 10.1038/nn.2282.

American Society of Addiction Medicine (ASAM), 2010

- Andero R, Choi DC, Ressler KJ. BDNF-TrkB receptor regulation of distributed adult neural plasticity, memory formation, and psychiatric disorders. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 2014; 122:169-92. DOI: 10.1016/B978-0-12-420170-5.00006-4.
- Avery SN, Clauss JA, Blackford JU. The human BNST: Functional role in anxiety and addiction. *Neuropsychopharmacology.* 2016; 41:126-41. DOI: 10.1038/npp.2015.185.
- Bading H, Greenberg ME. Stimulation of protein tyrosine phosphorylation by NMDA receptor activation. *Science.* 1991; 253: 912-4. DOI: 10.1126/science.1715095.
- Baldassa S, Zippel R, Sturani E. Depolarization-induced signaling to Ras, Rap1 and MAPKs in cortical neurons. *Brain Res Mol Brain Res.* 2003; 119:111-22. DOI: 10.1016/j.molbrainres.2003.08.020.
- Bale TL, Vale WW. CRF and CRF receptors: Role in stress responsivity and other behaviors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2004; 44:525-557. DOI: 10.1146/annurev.pharmtox.44.101802.121410.
- Banks ML, Olson ME, Janda KD. Immunopharmacotherapies for treating opioid use disorder. *Trends Pharmacol Sci.* 2018; 39:908-11. DOI: 10.1016/j.tips.2018.08.001.
- Bardo MT, Rowlett JK, Harris MJ. Conditioned place preference using opiate and stimulant drugs: a meta-analysis. *Neurosci Biobehav Rev.* 1995; 19:39-51. DOI: 10.1016/0149-7634(94)00021-r.
- Bartenev KS. Implicación del receptor dopaminérgico D4 en la adicción a morfina. [Tesis Doctoral]. Universidad de Málaga Editorial. 2020.
- Bassareo V, De Luca MA, Di Chiara G. Differential impact of pavlovian drug conditioned stimuli on in vivo dopamine transmission in the rat accumbens shell and core and in the prefrontal cortex. *Psychopharmacology.* 2007; 191:689-703. DOI: 10.1007/s00213-006-0560-7.
- Battisti JJ, Chang CH, Uretsky NJ, Wallace LJ. Sensitization of stereotyped behavior to amphetamine is context and response dependent. *Pharmacol Biochem Behav.* 1999; 63:263-9. DOI: 10.1016/s0091-3057(98)00259-7.
- Bekinschtein P, Kent BA, Oomen CA, Clemenson GD, Gage FH, Saksida LM, et al. BDNF in the dentate gyrus is required for consolidation of “pattern-separated” memories. *Cell Rep.* 2013; 5:759-68. DOI: 10.1016/j.celrep.2013.09.027.
- Benavides M, Laorden ML, Milanés MV. 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.* 2005; 92:246-54. DOI: 10.1111/j.1471-4159.2004.02865.x.
- Bernardi RE, Lattal KM, Berger SP. Postretrieval propranolol disrupts a cocaine conditioned place preference. *Neuroreport.* 2006; 17:1443-7. DOI: 10.1097/01.wnr.0000233098.20655.26.

- Berridge CW, Waterhouse BD. The locus coeruleus–noradrenergic system: modulation of behavioral state and state-dependent cognitive processes. *Brain Res Rev.* 2003; 42:33-84. DOI: 10.1016/s0165-0173(03)00143-7.
- Bittar TP, Labonté B. Functional contribution of the medial prefrontal circuitry in major depressive disorder and stress-induced depressive-like behaviors. *Front Behav Neurosci.* 2021; 15:699592. DOI: 10.3389/fnbeh.2021.699592.
- Bolanos CA, Nestler EJ. Neurotrophic mechanisms in drug addiction. *Neuromolecular Med.* 2004; 5:69-83. DOI: 10.1385/NMM:5:1:069.
- Bossert JM, Gray SM, Lu L, Shaham, Y. Activation of group II metabotropic glutamate receptors in the nucleus accumbens shell attenuates context-induced relapse to heroin seeking. *Neuropsychopharmacology.* 2006; 31:2197-209. DOI: 10.1038/sj.npp.1300977.
- Bremer PT, Janda KD. Conjugate vaccine immunotherapy for substance use disorder. *Pharmacol Rev.* 2017; 69:298-315. DOI: 10.1124/pr.117.013904.
- Briand LA, Blendy JA. Molecular and genetic substrates linking stress and addiction. *Brain Res.* 2010; 1314:219-34. DOI: 10.1016/j.brainres.2009.11.002.
- Brunet A, Orr SP, Tremblay J, Robertson K, Nader K, Pitman RK. Effect of post-retrieval propranolol on psychophysiologic responding during subsequent script-driven traumatic imagery in post-traumatic stress disorder. *J Psychiatr Res.* 2008; 42:503-6. DOI: 10.1016/j.jpsychires.2007.05.006.
- Brunet A, Poundja J, Tremblay J, Bui E, Thomas E, Orr SP, et al. Trauma reactivation under the influence of propranolol decreases posttraumatic stress symptoms and disorder: 3 open-label trials: 3 Open-label trials. *J Clin Psychopharmacol.* 2011; 31:547-50. DOI: 10.1097/JCP.0b013e318222f360.
- Bulin SE, Mendoza ML, Richardson DR, Song KH, Solberg TD, Yun S, et al. Dentate gyrus neurogenesis ablation via cranial irradiation enhances morphine self-administration and locomotor sensitization: Ablation of neurogenesis and morphine addiction. *Addict Biol.* 2018; 23:665-75. DOI: 10.1111/adb.12524.
- Calhoun GG, Tye KM. Resolving the neural circuits of anxiety. *Nat Neurosci.* 2015; 18:1394-404. DOI: 10.1038/nn.4101.
- Canadian Agency for Drugs and Technologies in Health, 2013
- Carboni E, Vacca C. Conditioned place preference. A simple method for investigating reinforcing properties in laboratory animals. *Methods Mol Med.* 2003; 79:481-98. DOI: 10.1385/1-59259-358-5:481.
- Carlezon WA Jr, Duman RS, Nestler EJ. The many faces of CREB. *Trends Neurosci.* 2005; 28:436-45. DOI: 10.1016/j.tins.2005.06.005.

- Carroll ME, Comer SD. Animal models of relapse. *Exp Clin Psychopharmacol.* 1996; 4:11-8. DOI: 10.1037/1064-1297.4.1.11.
- Cassel S, Carouge D, Gensburger C, Anglard P, Burgun C, Dietrich J-B, et al. Fluoxetine and cocaine induce the epigenetic factors MeCP2 and MBD1 in adult rat brain. *Mol Pharmacol.* 2006; 70:487-92. DOI: 10.1124/mol.106.022301.
- Catani M, Dell'Acqua F, Thiebaut de Schotten M. A revised limbic system model for memory, emotion and behaviour. *Neurosci Biobehav Rev.* 2013; 37:1724-37. DOI: 10.1016/j.neubiorev.2013.07.001.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Estimaciones de liberación rápida de muertes por sobredosis de drogas con fentanilo, metanfetamina, cocaína, heroína y oxicodona: Estados Unidos, 2021. 2023. Disponible en: <https://blogs.cdc.gov/nchs/2023/05/03/7338/>.
- Cepeda A, Kaplan C, Neaigus A, Cano MÁ, Villarreal Y, Valdez A. Injecting transition risk and depression among Mexican American non-injecting heroin users. *Drug Alcohol Depend.* 2012; 125 Suppl 1:S12-7. DOI: 10.1016/j.drugalcdep.2012.05.035.
- Cepeda C, Colwell CS, Itri JN, Chandler SH, Levine MS. Dopaminergic modulation of NMDA-induced whole cell currents in neostriatal neurons in slices: contribution of calcium conductances. *J Neurophysiol.* 1998; 79:82-94. DOI: 10.1152/jn.1998.79.1.82.
- Chan HCS, Filipek S, Yuan S. The principles of ligand specificity on beta-2-adrenergic receptor. *Sci Rep.* 2016; 6: 34736. DOI: 10.1038/srep34736.
- Chapleo CB, Crossley DI. Terapias de buprenorfina para el tratamiento de la dependencia a opiáceos (Subutex® y Suboxone®). *Trastor Adict.* 2003; 5: 320-8. DOI: 10.1016/s1575-0973(03)70129-9.
- Charbogne P, Gardon O, Martín-García E, Keyworth HL, Matsui A, Mechling AE, et al. Mu opioid receptors in gamma-aminobutyric acidergic forebrain neurons moderate motivation for heroin and palatable food. *Biol Psychiatry.* 2017; 81:778-88. DOI: 10.1016/j.biopsych.2016.12.022.
- Charbogne P, Kieffer BL, Befort K. 15 years of genetic approaches in vivo for addiction research: Opioid receptor and peptide gene knockout in mouse models of drug abuse. *Neuropharmacology.* 2014; 76 Pt B:204-17. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2013.08.028.
- Charmandari E, Tsigos C, Chrousos G. Endocrinology of the stress response. *Annu Rev Physiol.* 2005; 67:259-284. DOI: 10.1146/annurev.physiol.67.040403.120816
- Chen A, Blount A, Vaughan J, Brar B, Vale W. Urocortin II gene is highly expressed in mouse skin and skeletal muscle tissues: localization, basal expression in corticotropin-releasing factor receptor (CRFR) 1- and CRFR2-null mice, and regulation by glucocorticoids. *Endocrinology.* 2004; 145:2445-57. DOI: 10.1210/en.2003-1570.

- Chen LY, Rex CS, Pham DT, Lynch G, Gall CM. BDNF signaling during learning is regionally differentiated within hippocampus. *J Neurosci.* 2010; 30:15097-101. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.3549-10.2010.
- Chen M, Chiu T, Lee E. Noradrenergic mediation of the memory-enhancing effect of corticotropin-releasing factor in the locus coeruleus of rats. *Psychoneuroendocrinology*, 1992; 17:113-24. DOI: 10.1016/0306-4530(92)90050-h.
- Chergui K, Lacey MG. Modulation by dopamine D1-like receptors of synaptic transmission and NMDA receptors in rat nucleus accumbens is attenuated by the protein kinase C inhibitor Ro 32-0432. *Neuropharmacology*. 1999; 38:223-31. DOI: 10.1016/s0028-3908(98)00187-7.
- Cleck JN, Blendy JA. Making a bad thing worse: adverse effects of stress on drug addiction. *J Clin Invest.* 2008; 118:454-61. DOI: 10.1172/JCI33946.
- Colvin LA, Bull F, Hales TG. Perioperative opioid analgesia-when is enough too much? A review of opioid-induced tolerance and hyperalgesia. *Lancet.* 2019; 393:1558-68. DOI: 10.1016/s0140-6736(19)30430-1.
- Contarino A, Papaleo F. The corticotropin-releasing factor receptor 1 pathway mediates the negative affective states of opiate withdrawal. *Proc Nat Acad Sci USA.* 2005; 102:18649-54. DOI: 10.1073/pnas.0506999102.
- Cooper S, Robison AJ, Mazei-Robison MS. Reward circuitry in addiction. *Neurotherapeutics.* 2017; 14:687-97. DOI: 10.1007/s13311-017-0525-z.
- Corominas M, Roncero C, Bruguera E, Casas M. Sistema dopaminérgico y adicciones. *Rev Neurol.* 2007; 44:23-31. DOI: 10.33588/rn.4401.2006222.
- Cowansage KK, LeDoux JE, Monfils MH. Brain-derived neurotrophic factor: a dynamic gatekeeper of neural plasticity. *Curr Mol Pharmacol.* 2010; 3:12-29. DOI: 10.2174/1874467211003010012.
- Dautzenberg FM, Hauger RL. The CRF peptide family and their receptors: yet more partners discovered. *Trends Pharmacol Sci.* 2002; 23:71-7. DOI: 10.1016/s0165-6147(02)01946-6.
- De Kloet ER, Joëls M, Holsboer F. Stress and the brain: from adaptation to disease. *Nat Rev Neurosci.* 2005; 6:463-75. DOI: 10.1038/nrn1683.
- De Souza EB, Grigoriadis DE. CHAPTER X Multiple brain corticotropin-releasing factor receptors and binding protein. In *Handbook of Chemical Neuroanatomy* (pp. 477-508). 2000. DOI: 10.1016/S0924-8196(00)80012-3.
- De Vries TJ, Shippenberg TS. Neural systems underlying opiate addiction. *J Neurosci.* 2002; 22:3321-5. DOI: 10.1523/jneurosci.22-09-03321.

De Wit H. Priming effects with drugs and other reinforcers. *Exp Clin Psychopharmacol.* 1996; 4:5-10. DOI: 10.1037/1064-1297.4.1.5.

Dedic N, Chen A, Deussing JM. The CRF family of neuropeptides and their receptors - mediators of the central stress response. *Curr Mol Pharmacol.* 2018; 11:4-31. DOI: 10.2174/1874467210666170302104053.

Devilbiss DM, Waterhouse BD, Berridge CW, Valentino R. Corticotropin-releasing factor acting at the locus coeruleus disrupts thalamic and cortical sensory-evoked responses. *Neuropsychopharmacology.* 2012; 37:2020-30. DOI: 10.1038/npp.2012.50.

Dhaliwal A, Gupta M. Physiology, Opioid Receptor. StatPearls Publishing. 2023.

Di Chiara G, Bassareo V. Reward system and addiction: what dopamine does and doesn't do. *Curr Opin Pharmacol.* 2007; 7:233. DOI: 10.1016/j.coph.2007.02.001.

Di Chiara G, Imperato A. Preferential stimulation of dopamine release in the nucleus accumbens by opiates, alcohol, and barbiturates: studies with transcerebral dialysis in freely moving rats. *Ann N Y Acad Sci.* 1986; 473:367-81. DOI: 10.1111/j.1749-6632.1986.tb23629.x.

Di Chiara G. Drug addiction as dopamine-dependent associative learning disorder. *Eur J Pharmacol.* 1999; 375:13-30. DOI: 10.1016/s0014-2999(99)00372-6.

Dong Y, Green T, Saal D, Marie H, Neve R, Nestler EJ, et al. CREB modulates excitability of nucleus accumbens neurons. *Nat Neurosci.* 2006; 9:475-7. DOI: 10.1038/nn1661.

Du Y, Li Y, Zhao X, Yao Y, Wang B, Zhang L, Wang G. Psilocybin facilitates fear extinction in mice by promoting hippocampal neuroplasticity. *Chin Med J.* 2023; 136:29832992. DOI: 10.1097/CM9.0000000000002647.

Dulka BN, Ford EC, Lee MA, Donnell NJ, Goode TD, Prosser R, et al. Proteolytic cleavage of proBDNF into mature BDNF in the basolateral amygdala is necessary for defeat-induced social avoidance. *Learn Mem.* 2016; 23:156-60. DOI: 10.1101/lm.040253.115.

Edwards S, Koob GF. Experimental psychiatric illness and drug abuse models: from human to animal, an overview. *Methods Mol Biol.* 2012; 829:31-48. DOI: 10.1007/978-1-61779-458-2_2.

Enoch MA. The influence of gene-environment interactions on the development of alcoholism and drug dependence. *Curr Psychiatry Rep.* 2012; 14:150-8. DOI: 10.1007/s11920-011-0252-9.

Erb S, Shaham Y, Stewart J. The role of corticotropin-releasing factor and corticosterone in stress- and cocaine-induced relapse to cocaine seeking in rats. *J Neurosci.* 1998 Jul 15;18(14):5529-36. doi: 10.1523/JNEUROSCI.18-14-05529.1998.

- Ernfors P, Wetmore C, Olson L, Persson H. Identification of cells in rat brain and peripheral tissues expressing mRNA for members of the nerve growth factor family. *Neuron*. 1990; 5:511-26. DOI: 10.1016/0896-6273(90)90090-3.
- Everitt BJ. Neural and psychological mechanisms underlying compulsive drug seeking habits and drug memories - indications for novel treatments of addiction. *Eur J Neurosci*. 2014; 40:2163-82. DOI: 10.1111/ejn.12644.
- Ewan EE, Martin TJ. Rewarding electrical brain stimulation in rats after peripheral nerve injury: decreased facilitation by commonly abused prescription opioids. *Anesthesiology*. 2011; 115:1271-80. DOI: 10.1097/ALN.0b013e3182330448.
- Feld M, Dimant B, Delorenzi A, Coso O, Romano A. Phosphorylation of extra-nuclear ERK/MAPK is required for long-term memory consolidation in the crab *Chasmagnathus*. *Behav Brain Res*. 2005; 158:251-61. DOI: 10.1016/j.bbr.2004.09.005.
- Feltenstein MW, See RE. The neurocircuitry of addiction: an overview. *Br J Pharmacol*. 2008; 154:261-74. DOI: 10.1038/bjp.2008.51.
- Fields HL, Hjelmstad GO, Margolis EB, Nicola SM. Ventral tegmental area neurons in learned appetitive behavior and positive reinforcement. *Annu Rev Neurosci*. 2007; 30:289-316. DOI: 10.1146/annurev.neuro.30.051606.094341.
- Fiellin DA, Schottenfeld RS, Cutter CJ, Moore BA, Barry DT, O'Connor PG. Primary care-based buprenorphine taper vs maintenance therapy for prescription opioid dependence: a randomized clinical trial. *JAMA Intern Med*. 2014; 174:1947-54. DOI: 10.1001/jamainternmed.2014.5302.
- Filliol D, Ghozland S, Chluba J, Martin M, Matthes HW, Simonin F, Befort K, Gavériaux-Ruff C, Dierich A, LeMeur M, Valverde O, Maldonado R, Kieffer BL. Mice deficient for delta- and mu-opioid receptors exhibit opposing alterations of emotional responses. *Nat Genet*. 2000; 25:195-200. DOI: 10.1038/76061.
- Finkbeiner S, Tavazoie SF, Maloratsky A, Jacobs KM, Harris KM, Greenberg ME. CREB: a major mediator of neuronal neurotrophin responses. *Neuron*. 1997; 19:1031-47. DOI: 10.1016/s0896-6273(00)80395-5.
- Fiore RS, Bayer VE, Pelech SL, Posada J, Cooper JA, Baraban JM. P42 mitogen-activated protein kinase in brain: Prominent localization in neuronal cell bodies and dendrites. *Neuroscience*. 1993; 55:463-72. DOI: 10.1016/0306-4522(93)90516-i.
- Gafford GM, Ressler KJ. GABA and NMDA receptors in CRF neurons have opposing effects in fear acquisition and anxiety in central amygdala vs. bed nucleus of the stria terminalis. *Horm Behav*. 2015; 76:136-42. DOI: 10.1016/j.yhbeh.2015.04.001.

García-Carmona JA, Almela P, Baroja-Mazo A, Milanés MV, Laorden ML. Restricted role of CRF1 receptor for the activity of brainstem catecholaminergic neurons in the negative state of morphine withdrawal. *Psychopharmacology (Berl)*. 2012; 220:379-93. DOI: 10.1007/s00213-011-2478-y.

García-Carmona JA, Baroja-Mazo A, Milanés MV, Laorden ML. Sex differences between CRF1 receptor deficient mice following naloxone-precipitated morphine withdrawal in a conditioned place aversion paradigm: implication of HPA axis. *PLoS One*. 2015; 10:e0121125. DOI: 10.1371/journal.pone.0121125.

Gingeras TR. Origin of phenotypes: genes and transcripts. *Genome Res*. 2007; 17:682-90. DOI: 10.1101/gr.6525007.

Goeders E. The impact of stress on addiction. *Eur Neuropsychopharmacol*. 2003; 13:435-41. DOI: 10.1016/j.euroneuro.2003.08.004.

Goins EC, Bajic D. Astrocytic hypertrophy in the rat ventral tegmental area following chronic morphine differs with age. *J Neurol Neurorehabilit Res*. 2018; 3:14-21. DOI: 10.35841/neurology-neurorehabilitation.3.1.14-21.

Goldberg AD, Allis CD, Bernstein E. Epigenetics: a landscape takes shape. *Cell*. 2007; 128:635-8. DOI: 10.1016/j.cell.2007.02.006.

Goldman D, Oroszi G, Ducci F. The genetics of addictions: uncovering the genes. *Nat Rev Genet*. 2005; 6:521-32. DOI: 10.1038/nrg1635.

González B, Gancedo SN, Garazatua SAJ, Roldán E, Vitullo AD, González CR. Dopamine receptor D1 contributes to cocaine epigenetic reprogramming of histone modifications in male germ cells. *Front Cell Dev Biol*. 2020; 8:216. DOI: 10.3389/fcell.2020.00216.

Gracia-Rubio I, Martínez-Laorden E, Moscoso-Castro M, Milanés MV, Laorden ML, Valverde O. Maternal separation impairs cocaine-induced behavioural sensitization in adolescent mice. *PLoS One*. 2016; 11:e0167483. DOI: 10.1371/journal.pone.0167483.

Gungor NZ, Pare D. Functional heterogeneity in the bed nucleus of the stria terminalis. *J Neurosci*. 2016; 36:8038-49. DOI: 10.1523/jneurosci.0856-16.2016.

Guo X, Yuan Y, Su X, Cao Z, Chu C, Lei C, et al. Different projection neurons of basolateral amygdala participate in the retrieval of morphine withdrawal memory with diverse molecular pathways. *Mol Psychiatry*. 2024; 29:793-808. DOI: 10.1038/s41380-023-02371-x.

Han J-H, Kushner SA, Yiu AP, Cole CJ, Matynia A, Brown RA, et al. Neuronal competition and selection during memory formation. *Science*. 2007; 316:457-60. DOI: 10.1126/science.1139438.

Hauger RL, Olivares-Reyes JA, Braun S, Catt KJ, Dautzenberg FM. Mediation of corticotropin releasing factor type 1 receptor phosphorylation and desensitization by protein kinase C: a possible role in stress adaptation. *J Pharmacol Exp Ther.* 2003; 306:794-803. DOI: 10.1124/jpet.103.050088.

He YY, Xue YX, Wang JS, Fang Q, Liu JF, Xue LF, et al. PKMzeta maintains drug reward and aversion memory in the basolateral amygdala and extinction memory in the infralimbic cortex. *Neuropsychopharmacology.* 2011; 36:1972-81.

Heidari MH, Amini A, Bahrami Z, Shahriari A, Movafag A, Heidari R. Effect of chronic morphine consumption on synaptic plasticity of rat's hippocampus: A transmission electron microscopy study. *Neurol Res Int.* 2013; 2013:290414. DOI: 10.1155/2013/290414.

Heimer L, Alheid GF. Piecing together the puzzle of basal forebrain anatomy. *Adv Exp Med Biol.* 1991; 295:1-42. DOI: 10.1007/978-1-4757-0145-6_1.

Heinrichs SC, Leite-Morris KA, Guy MD, Goldberg LR, Young AJ, Kaplan GB. Dendritic structural plasticity in the basolateral amygdala after fear conditioning and its extinction in mice. *Behav Brain Res.* 2013; 248:80-4. DOI: 10.1016/j.bbr.2013.03.048.

Heinrichs SC, Menzaghi F, Schulteis G, Koob GF, Stinus L. Suppression of corticotropin-releasing factor in the amygdala attenuates aversive consequences of morphine withdrawal. *Behav Pharmacol.* 1995; 6:74-80. DOI: 10.1097/00008877-199501000-00011.

Hofer M, Pagliusi SR, Hohn A, Leibrock J, Barde YA. Regional distribution of brain-derived neurotrophic factor mRNA in the adult mouse brain. *EMBO J.* 1990; 9: 2459-64. DOI: 10.1002/j.1460-2075.1990.tb07423.x.

Holly EN, DeBold JF, Miczek KA. Increased mesocorticolimbic dopamine during acute and repeated social defeat stress: modulation by corticotropin releasing factor receptors in the ventral tegmental area. *Psychopharmacology.* 2015; 232:4469-79. DOI: 10.1007/s00213-015-4082-z.

Horvitz JC. Mesolimbocortical and nigrostriatal dopamine responses to salient non-reward events. *Neuroscience.* 2000; 96:651-6. DOI: 10.1016/s0306-4522(00)00019-1.

Host L, Dietrich J-B, Carouge D, Aunis D, Zwiller J. Cocaine self-administration alters the expression of chromatin-remodelling proteins; modulation by histone deacetylase inhibition. *J Psychopharmacol.* 2011; 25:222-9. DOI: 10.1177/0269881109348173.

Hou X-F, Zhao Y-B, Yang Y-X, Zhu J, Zhu L-S, Xu L, et al. A morphine reward generalization mouse model based on conditioned place preference and aversion. *Brain Behav.* 2023; 13:e2970. DOI: 10.1002/brb3.2970.

Hsu SY, Hsueh AJ. Human stresscopin and stresscopin-related peptide are selective ligands for the type 2 corticotropin-releasing hormone receptor. *Nat Med.* 2001; 7:605-11. DOI: 10.1038/87936.

- Hu MC, Griesler P, Wall M, Kandel DB. Age-related patterns in nonmedical prescription opioid use and disorder in the US population at ages 12-34 from 2002 to 2014. *Drug Alcohol Depend.* 2017; 177:237-43. DOI: 10.1016/j.drugalcdep.2017.03.024.
- Hummel M, Cummons T, Lu P, Mark L, Harrison JE, Kennedy JD, et al. Pain is a salient “stressor” that is mediated by corticotropin-releasing factor-1 receptors. *Neuropharmacology.* 2010; 59:160-6. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2010.05.001.
- Hyman SE, Malenka RC. Addiction and the brain: the neurobiology of compulsion and its persistence. *Nat Rev Neurosci.* 2001; 2:695-703. DOI: 10.1038/35094560.
- Ibáñez-Cuadrado A. Genética de las adicciones. *Adicciones.* 2008; 20:103-10. DOI: 10.20882/adicciones.273.
- Igaz LM, Winograd M, Cammarota M, Izquierdo LA, Alonso M, Izquierdo I, et al. Early activation of extracellular signal-regulated kinase signaling pathway in the hippocampus is required for short-term memory formation of a fear-motivated learning. *Cell Mol Neurobiol.* 2006; 26:989-1002. DOI: 10.1007/s10571-006-9116-y.
- Ikemoto S. Dopamine reward circuitry: two projection systems from the ventral midbrain to the nucleus accumbens-olfactory tubercle complex. *Brain Res Rev.* 2007; 56:27-78. DOI: 10.1016/j.brainresrev.2007.05.004.
- Ingallinesi M, Rouibi K, Le Moine C, Papaleo F, Contarino A. CRF2 receptor-deficiency eliminates opiate withdrawal distress without impairing stress coping. *Mol Psychiatry.* 2012; 17:1283-94. DOI: 10.1038/mp.2011.119.
- Inoue M, Mishina M, Ueda H. Locus-specific rescue of GluRε1 NMDA receptors in mutant mice identifies the brain regions important for morphine tolerance and dependence. *J Neurosci.* 2003; 23:6529-36. DOI: 10.1523/jneurosci.23-16-06529.2003.
- Jackson KJ, McLaughlin JP, Carroll FI, Damaj MI. Effects of the kappa opioid receptor antagonist, norbinaltorphimine, on stress and drug-induced reinstatement of nicotine-conditioned place preference in mice. *Psychopharmacology (Berl).* 2013; 226:763-8. DOI: 10.1007/s00213-012-2716-y.
- Jiang C, Yang X, He G, Wang F, Wang Z, Xu W, et al. CRH^{CeA→VTA} inputs inhibit the positive ensembles to induce negative effect of opiate withdrawal. *Mol Psychiatry.* 2021; 26:6170-86. DOI: 10.1038/s41380-021-01321-9.
- Jobs ML, Aharonovich E, Epstein DH, Phillips KA, Reamer D, Anderson M, et al. Effects of preresactivation propranolol on cocaine craving elicited by imagery script/cue sets in opioid-dependent polydrug users: A randomized study. *J Addict Med.* 2015; 9:491-8. DOI: 10.1097/adm.000000000000169.

Joëls M, De Kloet ER. Mineralocorticoid and glucocorticoid receptors in the brain. Implications for ion permeability and transmitter systems. *Prog Neurobiol.* 1994; 43:1-36. DOI: 10.1016/0301-0082(94)90014-0.

Johnson M. Molecular mechanisms of beta(2)-adrenergic receptor function, response, and regulation. *J Allergy Clin Immunol.* 2006; 117:18-24; quiz 25. DOI: 10.1016/j.jaci.2005.11.012.

Kalivas PW, O'Brien C. Drug addiction as a pathology of staged neuroplasticity. *Neuropsychopharmacology.* 2008; 33:166-80. DOI: 10.1038/sj.npp.1301564.

Kalivas PW, Volkow ND. The neural basis of addiction: a pathology of motivation and choice. *Am J Psychiatry.* 2005; 162:1403-13. DOI: 10.1176/appi.ajp.162.8.1403.

Karpova NN, Lindholm JSO, Kuleskaya N, Onishchenko N, Vahter M, Popova D, et al. TrkB overexpression in mice buffers against memory deficits and depression-like behavior but not all anxiety- and stress-related symptoms induced by developmental exposure to methylmercury. *Front Behav Neurosci.* 2014; 8:315. DOI: 10.3389/fnbeh.2014.00315.

Kawaminami A, Yamada D, Yanagisawa S, Shirakata M, Iio K, Nagase H, et al. Selective δ -opioid receptor agonist, KNT-127, facilitates contextual fear extinction *via* infralimbic cortex and amygdala in mice. *Front Behav Neurosci.* 2022; 16:808232. DOI: 10.3389/fnbeh.2022.808232.

Kelly A, Laroche S, Davis S. Activation of mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase in hippocampal circuitry is required for consolidation and reconsolidation of recognition memory. *J Neurosci.* 2003; 23:5354-60. DOI: 10.1523/jneurosci.23-12-05354.2003.

Kendler KS, Myers J, Prescott CA. Specificity of genetic and environmental risk factors for symptoms of cannabis, cocaine, alcohol, caffeine, and nicotine dependence. *Arch Gen Psychiatry.* 2007; 64:1313-20. DOI: 10.1001/archpsyc.64.11.1313.

Kenny PJ. Reward mechanisms in obesity: new insights and future directions. *Neuron.* 2011 Feb 24;69(4):664-79. DOI: 10.1016/j.neuron.2011.02.016.

Kieffer BL, Befort K, Gavériaux-Ruff C, Hirth CG. The delta-opioid receptor: isolation of a cDNA by expression cloning and pharmacological characterization. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1994; 91:1193. DOI: 10.1073/pnas.91.3.1193-c.

Kim J, Zhang X, Muralidhar S, LeBlanc SA, Tonegawa S. Basolateral to central amygdala neural circuits for appetitive behaviors. *Neuron.* 2017; 93:1464-1479.e5. DOI: 10.1016/j.neuron.2017.02.034.

Kim VN, Nam J-W. Genomics of microRNA. *Trends Genet.* 2006; 22:165-73. DOI: 10.1016/j.tig.2006.01.003.

Knapska E, Kaczmarek L. A gene for neuronal plasticity in the mammalian brain: Zif268/Egr-1/NGFI-A/Krox-24/TIS8/ZENK? *Prog Neurobiol.* 2004; 74:183-211. DOI: 10.1016/j.pneurobio.2004.05.007.

- Knoll AT, Carlezon WA Jr. Dynorphin, stress, and depression. *Brain Res.* 2010; 1314:56-73. DOI: 10.1016/j.brainres.2009.09.074.
- Kogan JH, Nestler EJ, Aghajanian GK. Elevated basal firing rates and enhanced responses to 8-Br-cAMP in locus coeruleus neurons in brain slices from opiate-dependent rats. *Eur J Pharmacol.* 1992; 211:47-53. DOI: 10.1016/0014-2999(92)90261-2.
- Kong L, Shu X, Tang S, Ye R, Sun H, Jiang S, et al. SLL-627 is a highly selective and potent κ opioid receptor (KOR) agonist with an unexpected nonreduction in locomotor activity. *J Med Chem.* 2022; 65: 10377-10392. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.2c00014.
- Koob GF, Ahmed SH, Boutrel B, Chen SA, Kenny PJ, Markou A, et al. Neurobiological mechanisms in the transition from drug use to drug dependence. *Neurosci Biobehav Rev.* 2004; 27:739-49. DOI: 10.1016/j.neubiorev.2003.11.007.
- Koob GF, Kandel D, Volkow ND. Pathophysiology of Addiction. In *Psychiatry* (pp. 354-378). 2008. John Wiley & Sons, Ltd. DOI: 10.1002/9781118753378.ch22.
- Koob GF, Kreek MJ. Stress, dysregulation of drug reward pathways, and the transition to drug dependence. *Am J Psychiatry.* 2007; 164:1149-59. DOI: 10.1176/appi.ajp.2007.05030503.
- Koob GF, Le Moal M. Drug abuse: hedonic homeostatic dysregulation. *Science.* 1997; 278:52-8. DOI: 10.1126/science.278.5335.52.
- Koob GF, Le Moal M. Drug addiction, dysregulation of reward, and allostasis. *Neuropsychopharmacology.* 2001; 24:97-129. DOI: 10.1016/S0893-133X(00)00195-0.
- Koob GF, Le Moal M. Neurobiological mechanisms for opponent motivational processes in addiction. *Phil Trans R Soc B.* 2008; 363:3113-3123. DOI: 10.1098/rstb.2008.0094.
- Koob GF, Le Moal M. Plasticity of reward neurocircuitry and the “dark side” of drug addiction. *Nat Neurosci.* 2005; 8:1442-4. DOI: 10.1038/nn1105-1442.
- Koob GF, Simon EJ. The neurobiology of addiction: Where we have been and where we are going. *J Drug Issues.* 2009; 39:115-32. DOI: 10.1177/002204260903900110.
- Koob GF, Volkow ND. Neurocircuitry of addiction. *Neuropsychopharmacology.* 2010; 35:217-38. DOI: 10.1038/npp.2009.110.
- Koob GF, Zorrilla EP. Neurobiological mechanisms of addiction: focus on corticotropin-releasing factor. *Curr Opin Investig Drugs.* 2010; 11:63-71.
- Koob GF. A role for brain stress systems in addiction. *Neuron.* 2008b; 59:11-34. DOI: 10.1016/j.neuron.2008.06.012.

- Koob GF. Corticotropin-releasing factor, neuroplasticity (sensitization), and alcoholism. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008a; 105:8809-10. DOI: 10.1073/pnas.0804354105.
- Koob GF. Dynamics of neuronal circuits in addiction: reward, antireward, and emotional memory. *Pharmacopsychiatry*. 2009; 42 Suppl 1:S32-41. DOI: 10.1055/s-0029-1216356.
- Koob GF. Neurobiology of opioid addiction: Opponent process, hyperkatifeia, and negative reinforcement. *Biol Psychiatry*. 2020; 87:44-53. DOI: 10.1016/j.biopsych.2019.05.023.
- Kostich WA, Chen A, Sperle K, Largent BL. Molecular identification and analysis of a novel human corticotropin-releasing factor (CRF) receptor: the CRF2gamma receptor. *Mol Endocrinol*. 1998; 12:1077-85. DOI: 10.1210/mend.12.8.0145.
- Krupitsky E, Nunes EV, Ling W, Gastfriend DR, Memisoglu A, Silverman BL. Injectable extended-release naltrexone (XR-NTX) for opioid dependence: long-term safety and effectiveness: Extended-release naltrexone. *Addiction*. 2013; 108:1628-37. DOI: 10.1111/add.12208.
- Kumar A, Choi K-H, Renthal W, Tsankova NM, Theobald DEH, Truong H-T, et al. Chromatin remodeling is a key mechanism underlying cocaine-induced plasticity in striatum. *Neuron*. 2005; 48:303-14. DOI: 10.1016/j.neuron.2005.09.023.
- Kuperman Y, Chen A. Urocortins: emerging metabolic and energy homeostasis perspectives. *Trends Endocrinol Metab*. 2008; 19:122-9. DOI: 10.1016/j.tem.2007.12.002.
- Land BB, Bruchas MR, Lemos JC, Xu M, Melief EJ, Chavkin C. The dysphoric component of stress is encoded by activation of the dynorphin kappa-opioid system. *J Neurosci*. 2008; 28:407-14. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.4458-07.2008.
- Langlois LD, Nugent FS. Opiates and plasticity in the ventral tegmental area. *ACS Chem Neurosci*. 2017; 8:1830-8. DOI: 10.1021/acschemneuro.7b00281.
- Laorden ML, Castells MT, Milanés MV. Effects of morphine and morphine withdrawal on brainstem neurons innervating hypothalamic nuclei that control the pituitary-adrenocortical axis in rats. *Br J Pharmacol*. 2002; 136:67-75. DOI: 10.1038/sj.bjp.0704684.
- Laorden ML, Núñez C, Almela P, Milanés MV. Morphine withdrawal-induced c-fos expression in the hypothalamic paraventricular nucleus is dependent on the activation of catecholaminergic neurones: Morphine withdrawal and catecholaminergic neurones. *J Neurochem*. 2002; 83:132-40. DOI: 10.1046/j.1471-4159.2002.01123.x.
- Le Merrer J, Becker JAJ, Befort K, Kieffer BL. Reward processing by the opioid system in the brain. *Physiol Rev*. 2009; 89:1379-412. DOI: 10.1152/physrev.00005.2009.
- Le Moal M, Koob GF. Drug addiction: Pathways to the disease and pathophysiological perspectives. *Eur Neuropsychopharmacol*. 2007; 17:377-93. DOI: 10.1016/j.euroneuro.2006.10.006.

- LeDoux JE. Emotion circuits in the brain. *Annu Rev Neurosci.* 2000; 23:155-84. DOI: 10.1146/annurev.neuro.23.1.155.
- Lee AM, Messing RO. Protein kinases and addiction. *Annals N Y Acad Sci.* 2008; 1141:22-57. DOI: 10.1196/annals.1441.022.
- Li C, Chen P, Vaughan J, Blount A, Chen A, Jamieson PM, et al. Urocortin III is expressed in pancreatic beta-cells and stimulates insulin and glucagon secretion. *Endocrinology.* 2003; 144:3216-24. DOI: 10.1210/en.2002-0087.
- Liaw CW, Grigoriadis DE, Lorang MT, De Souza EB, Maki RA. Localization of agonist- and antagonist-binding domains of human corticotropin-releasing factor receptors. *Mol Endocrinol.* 1997; 11:2048-53. DOI: 10.1210/mend.11.13.0034.
- Lin YJ, Greif GJ, Freedman JE. Permeation and block of dopamine-modulated potassium channels on rat striatal neurons by cesium and barium ions. *J Neurophysiol.* 1996; 76:1413-22. DOI: 10.1152/jn.1996.76.3.1413.
- Lodge DJ, Grace AA. Acute and chronic corticotropin-releasing factor 1 receptor blockade inhibits cocaine-induced dopamine release: Correlation with dopamine neuron activity. *J Pharmacol Exp Ther.* 2005; 314:201-6. DOI: 10.1124/jpet.105.084913.
- Lukkes JL, Staub DR, Dietrich A, Truitt W, Neufeld-Cohen A, Chen A, et al. Topographical distribution of corticotropin-releasing factor type 2 receptor-like immunoreactivity in the rat dorsal raphe nucleus: co-localization with tryptophan hydroxylase. *Neuroscience.* 2011; 183:47-63. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2011.03.047.
- Ma M, Quan H, Chen S, Fu X, Zang L, Dong L. The anxiolytic effect of polysaccharides from *Stellariae Radix* through monoamine neurotransmitters, HPA axis, and ECS/ERK/CREB/BDNF signaling pathway in stress-induced male rats. *Brain Res Bull.* 2023; 203:110768. DOI: 10.1016/j.brainresbull.2023.110768.
- Maj M, Turchan J, Śmiałowska M, Przewłocka B. Morphine and cocaine influence on CRF biosynthesis in the rat central nucleus of amygdala. *Neuropeptides.* 2003; 37:105-10. DOI: 10.1016/s0143-4179(03)00021-0.
- Manual Diagnóstico y Estadístico de los Trastornos Mentales (DSM-5). American Psychiatric Association. 5ª ed. Panamericana. 2013.
- Martín F, Núñez C, Marín MT, Laorden ML, Kovács KJ, Milanés MV. Involvement of noradrenergic transmission in the PVN on CREB activation, TORC1 levels, and pituitary-adrenal axis activity during morphine withdrawal. *PLoS One.* 2012; 7:e31119. DOI: 10.1371/journal.pone.0031119.

Martínez-Laorden E, Navarro-Zaragoza J, Milanés MV, Laorden ML, Almela P. Conditioned aversive memory associated with morphine withdrawal increases brain-derived neurotrophic factor in dentate gyrus and basolateral amygdala. *Addict Biol.* 2020; 25:e12792. DOI: 10.1111/adb.12792.

Martínez-Laorden E. Cambios adaptativos cardíacos durante la dependencia de morfina. Implicación de la proteína de choque térmico Hsp27. [Tesis Doctoral]. Facultad de Medicina. Universidad de Murcia. 2014.

Martin-Fardon R, Zorrilla EP, Ciccocioppo R, Weiss F. Role of innate and drug-induced dysregulation of brain stress and arousal systems in addiction: Focus on corticotropin-releasing factor, nociceptin/orphanin FQ, and orexin/hypocretin. *Brain Res.* 2010; 1314:145-61. DOI: 10.1016/j.brainres.2009.12.027.

Matthes HW, Maldonado R, Simonin F, Valverde O, Slowe S, Kitchen I, et al. Loss of morphine-induced analgesia, reward effect and withdrawal symptoms in mice lacking the mu-opioid-receptor gene. *Nature.* 1996; 383:819-23. DOI: 10.1038/383819a0.

Maze I, Russo SJ. Transcriptional mechanisms: underlying addiction-related structural plasticity. *Mol Interv.* 2010; 10:219-30. DOI: 10.1124/mi.10.4.5.

McCarthy CI. Estudio de los efectos de la actividad constitutiva del receptor de dopamina tipo 1 (D1R) sobre los canales de calcio operados por voltaje (CaV) y su rol en neuronas de la corteza prefrontal. [Tesis Doctoral]. Universidad Nacional de La Plata. 2022.

McEwen BS, Gianaros PJ. Central role of the brain in stress and adaptation: links to socioeconomic status, health, and disease: Central links between stress and SES. *Ann N Y Acad Sci.* 2010; 1186:190-222. DOI: 10.1111/j.1749-6632.2009.05331.x.

McFarland K, Kalivas PW. The circuitry mediating cocaine-induced reinstatement of drug-seeking behavior. *J Neurosci.* 2001; 21:8655-63. DOI: 10.1523/jneurosci.21-21-08655.2001.

McLaughlin JP, Land BB, Li S, Pintar JE, Chavkin C. Prior activation of kappa opioid receptors by U50,488 mimics repeated forced swim stress to potentiate cocaine place preference conditioning. *Neuropsychopharmacology.* 2006; 31:787-94. DOI: 10.1038/sj.npp.1300860.

McQuown SC, Wood MA. Epigenetic regulation in substance use disorders. *Curr Psychiatry Rep.* 2010; 12:145-53. DOI: 10.1007/s11920-010-0099-5.

Méndez EF, Grimm SL, Stertz L, Gorski D, Movva SV, Najera K, et al. A human stem cell-derived neuronal model of morphine exposure reflects brain dysregulation in opioid use disorder: Transcriptomic and epigenetic characterization of postmortem-derived iPSC neurons. *Front Psychiatry.* 2023; 14:1070556. DOI: 10.3389/fpsyt.2023.1070556.

Mesulam MM. Principles of behavioral and cognitive neurology. 2nd ed. Cary, NC, Estados Unidos de América: Oxford University Press. 2010.

Miller CA, Marshall JF. Molecular substrates for retrieval and reconsolidation of cocaine-associated contextual memory. *Neuron*. 2005; 47:873-84. DOI: 10.1016/j.neuron.2005.08.006.

Ministerio de Sanidad y Consumo. Guía de Práctica Clínica para el Manejo de Pacientes con Trastornos de Ansiedad en Atención Primaria. Madrid: Plan Nacional para el SNS del MSC. Unidad de Evaluación de Tecnologías Sanitarias. Agencia Laín Entralgo. 2008. Guías de Práctica Clínica en el SNS: UETS N° 2006/10.2008.

Moles A, Kieffer BL, D'Amato FR. Deficit in attachment behavior in mice lacking the mu-opioid receptor gene. *Science*. 2004; 304:1983-6. DOI: 10.1126/science.1095943.

Montagud-Romero S, Núñez C, Blanco-Gandía MC, Martínez-Laorden E, Aguilar MA, Navarro-Zaragoza J, et al. Repeated social defeat and the rewarding effects of cocaine in adult and adolescent mice: dopamine transcription factors, proBDNF signaling pathways, and the TrkB receptor in the mesolimbic system. *Psychopharmacology (Berl)*. 2017; 234:2063-75. DOI: 10.1007/s00213-017-4612-y.

Moorman DE, Aston-Jones G. Orbitofrontal cortical neurons encode expectation-driven initiation of reward-seeking. *J Neurosci*. 2014; 34:10234-46. DOI: 10.1523/jneurosci.3216-13.2014.

Nagelhout GE, Hummel K, de Goeij MCM, De Vries H, Kaner E, Lemmens P. How economic recessions and unemployment affect illegal drug use: A systematic realist literature review. *Int J Drug Policy*. 2017; 44:69-83. DOI: 10.1016/j.drugpo.2017.03.013.

Nair-Roberts RG, Chatelain-Badie SD, Benson E, White-Cooper H, Bolam JP, Ungless MA. Stereological estimates of dopaminergic, GABAergic and glutamatergic neurons in the ventral tegmental area, substantia nigra and retrorubral field in the rat. *Neuroscience*. 2008; 152:1024-31. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2008.01.046.

National Institute on Drug Abuse (NIDA). How effective are medications to treat opioid use disorder? 2021 [citado el 3 de octubre de 2023]. Disponible en: <https://nida.nih.gov/publications/research-reports/medications-to-treat-opioid-addiction/efficacy-medications-opioid-use-disorder>.

National Institute on Drug Abuse (NIDA). Medicamentos para el tratamiento del trastorno por consumo de opioides. 2023 [citado el 3 de octubre de 2023]. Disponible en: <https://nida.nih.gov/es/publicaciones/serie-de-reportes/medicamentos-para-el-tratamiento-del-trastorno-por-consumo-de-opioides/panorama-general>.

Navarro-Zaragoza J, Hidalgo JM, Laorden ML, Milanés MV. Glucocorticoid receptors participate in the opiate withdrawal-induced stimulation of rats NTS noradrenergic activity and in the somatic signs of morphine withdrawal: Glucocorticoid receptor and opiate withdrawal. *Br J Pharmacol*. 2012; 166:2136-47. DOI: 10.1111/j.1476-5381.2012.01918.x.

Navarro-Zaragoza J, Martínez-Laorden E, Teruel-Fernández FJ, Gómez-Murcia V, Cánovas A, Milanés MV, et al. Naloxone-induced conditioned place aversion score and extinction period are higher

in C57BL/6J morphine-dependent mice than in Swiss: Role of HPA axis. *Pharmacol Biochem Behav.* 2021; 201:173106. DOI: 10.1016/j.pbb.2021.173106.

Navarro-Zaragoza J, Núñez C, Laorden ML, Milanés MV. Effects of corticotropin-releasing factor receptor-1 antagonists on the brain stress system responses to morphine withdrawal. *Mol Pharmacol.* 2010; 77:864-73. DOI: 10.1124/mol.109.062463.

Navratilova E, Nation K, Remeniuk B, Neugebauer V, Bannister K, Dickenson AH, et al. Selective modulation of tonic aversive qualities of neuropathic pain by morphine in the central nucleus of the amygdala requires endogenous opioid signaling in the anterior cingulate cortex. *Pain.* 2020; 161:609-18. DOI: 10.1097/j.pain.0000000000001748.

Nestler EJ, Aghajanian GK. Molecular and cellular basis of addiction. *Science.* 1997; 278:58-63. DOI: 10.1126/science.278.5335.58.

Nestler EJ. Cellular basis of memory for addiction. *Dialogues Clin Neurosci.* 2013; 15:431-43. DOI: 10.31887/dcns.2013.15.4/enestler.

Nestler EJ. Historical review: Molecular and cellular mechanisms of opiate and cocaine addiction. *Trends Pharmacol Sci.* 2004; 25:210-8. DOI: 10.1016/j.tips.2004.02.005.

Nestler EJ. Neurobiology. Total recall-the memory of addiction. *Science.* 2001; 292:2266-7. DOI: 10.1126/science.1063024.

Neugebauer V, Li W, Bird GC, Han JS. The amygdala and persistent pain. *Neuroscientist.* 2004; 10:221-34. DOI: 10.1177/1073858403261077.

Nguyen JD, Grant Y, Taffe MA. Paradoxical changes in brain reward status during oxycodone self-administration in a novel test of the negative reinforcement hypothesis. *Br J Pharmacol.* 2021; 178:3797-812. DOI: 10.1111/bph.15520.

Nicholls L, Bragaw L, Ruetsch C. Opioid dependence treatment and guidelines. *J Manag Care Pharm.* 2010;16(1 Supp B):14-21. DOI: 10.18553/jmcp.2010.16.s1-b.14.

Nieto MM, Guen SLE, Kieffer BL, Roques BP, Noble F. Physiological control of emotion-related behaviors by endogenous enkephalins involves essentially the delta opioid receptors. *Neuroscience.* 2005; 135:305-13. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2005.06.025.

Nieuwenhuys R, Voogd J, van Huijzen C. The human central nervous system: A synopsis and atlas. 2nd ed. Berlín, Alemania: Springer. 2013.

Nunes EJ, Randall PA, Santerre JL, Given AB, Sager TN, Correa M, et al. Differential effects of selective adenosine antagonists on the effort-related impairments induced by dopamine D1 and D2 antagonism. *Neuroscience.* 2010; 170:268-80. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2010.05.068.

Nunes EV, Krupitsky E, Ling W, Zummo J, Memisoglu A, Silverman BL, et al. Treating opioid dependence with injectable extended-release naltrexone (XR-NTX): Who will respond? *J Addict Med.* 2015; 9:238-43. DOI: 10.1097/adm.000000000000125.

O'Brien CP. Evidence-based treatments of addiction. *Philos Trans R Soc B.* 2008; 363:3277-86. DOI: 10.1098/rstb.2008.0105.

O'Donnell P, Grace AA. Dopaminergic reduction of excitability in nucleus accumbens neurons recorded in vitro. *Neuropsychopharmacology.* 1996; 15:87-97. DOI: 10.1016/0893-133X(95)00177-F.

Observatorio Español de las Drogas y las Adicciones (OEDA). Alcohol, tabaco y drogas ilegales en España. Informe 2021. Madrid: Ministerio de Sanidad. Delegación del Gobierno para el Plan Nacional sobre Drogas. Disponible en: <https://pnsd.sanidad.gob.es/profesionales/sistemasInformacion/informesEstadisticas/pdf/2021OEDA-INFORME.pdf>.

Observatorio Español de las Drogas y las Adicciones (OEDA). Encuesta sobre alcohol y drogas en España (EDADES), 1995-2022. Informe 2023. Alcohol, tabaco y drogas ilegales en España. Madrid: Ministerio de Sanidad. Delegación del Gobierno para el Plan Nacional sobre Drogas. Disponible en: https://pnsd.sanidad.gob.es/profesionales/sistemasInformacion/sistemaInformacion/pdf/2019_Informe_EDADES.pdf.

Observatorio Europeo de las Drogas y Toxicomanías (EMCDDA). Informe Europeo sobre Drogas 2021: Tendencias y novedades. Oficina de Publicaciones de la Unión Europea, Luxemburgo.

Ohia-Nwoko O, Kosten TA, Haile CN. Animal models and the development of vaccines to treat substance use disorders. *Int Rev Neurobiol.* 2016; 126:263-91. DOI: 10.1016/bs.irn.2016.02.009.

Opioides en el manejo del dolor. El difícil equilibrio entre la opiofobia y la opiofilia. INFAC. 2014 [citado el 3 de octubre de 2023]. Disponible en: <https://www.fundacionfemeba.org.ar/blog/farmacologia-7/post/opiodes-en-el-manejo-del-dolor-el-dificil-equilibrio-entre-la-opiofobia-y-la-opiofilia-42263>.

Organización Mundial de la Salud (OMS), 2009

Oyola MG, Handa RJ. Hypothalamic–pituitary–adrenal and hypothalamic–pituitary–gonadal axes: sex differences in regulation of stress responsivity. *Stress.* 2017; 20:476-94. DOI: 10.1080/10253890.2017.1369523.

Pace TWW, Gaylord RI, Jarvis E, Girotti M, Spencer RL. Differential glucocorticoid effects on stress-induced gene expression in the paraventricular nucleus of the hypothalamus and ACTH secretion in the rat. *Stress.* 2009; 12:400-11. DOI: 10.1080/10253890802530730.

Palchadhuri MR, Wille S, Mevenkamp G, Spiess J, Fuchs E, Dautzenberg FM. Corticotropin-releasing factor receptor type 1 from *Tupaia belangeri*--cloning, functional expression and tissue distribution. *Eur J Biochem.* 1998; 258:78-84. DOI: 10.1046/j.1432-1327.1998.2580078.x.

Pandey P, Mersha MD, Dhillon HS. A synergistic approach towards understanding the functional significance of dopamine receptor interactions. *J Mol Signal.* 2013; 8:13. DOI: 10.1186/1750-2187-8-13.

Papaleo F, Ghozland S, Ingallinesi M, Roberts AJ, Koob GF, Contarino A. Disruption of the CRF(2) receptor pathway decreases the somatic expression of opiate withdrawal. *Neuropsychopharmacology.* 2008; 33:2878-87. DOI: 10.1038/npp.2008.8.

Park A, Jacob AD, Walters BJ, Park S, Rashid AJ, Jung JH, et al. A time-dependent role for the transcription factor CREB in neuronal allocation to an engram underlying a fear memory revealed using a novel in vivo optogenetic tool to modulate CREB function. *Neuropsychopharmacology.* 2020; 45:916-24. DOI: 10.1038/s41386-019-0588-0.

Paxinos G, Watson C. *The rat brain in stereotaxic coordinates: Hard cover edition.* 6th ed. Academic Press. 2006.

Peck KR, Parker MA, Sigmon SC. Reasons for non-medical use of prescription opioids among young adults: Role of educational status. *Prev Med.* 2019; 128:105684. DOI: 10.1016/j.ypmed.2019.03.047.

Perrin M, Donaldson C, Chen R, Blount A, Berggren T, Bilezikjian L, Sawchenko P, Vale W. Identification of a second corticotropin-releasing factor receptor gene and characterization of a cDNA expressed in heart. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995 Mar 28;92(7):2969-73. DOI: 10.1073/pnas.92.7.2969.

Perrin MH, Donaldson CJ, Chen R, Lewis KA, Vale WW. Cloning and functional expression of a rat brain corticotropin releasing factor (CRF) receptor. *Endocrinology.* 1993; 133:3058-61. DOI: 10.1210/endo.133.6.8243338.

Perrin MH, Vale WW. Corticotropin releasing factor receptors and their ligand family. *Ann N Y Acad Sci.* 1999; 885:312-28. DOI: 10.1111/j.1749-6632.1999.tb08687.x.

Perrine SA, Hoshaw BA, Unterwald EM. Delta opioid receptor ligands modulate anxiety-like behaviors in the rat. *Br J Pharmacol.* 2006; 147:864-72. DOI: 10.1038/sj.bjp.0706686.

Perrine SA, Sheikh IS, Nwaneshiudu CA, Schroeder JA, Unterwald EM. Withdrawal from chronic administration of cocaine decreases delta opioid receptor signaling and increases anxiety- and depression-like behaviors in the rat. *Neuropharmacology.* 2008; 54:355-64. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2007.10.007.

- Phillips HS, Hains JM, Laramée GR, Rosenthal A, Winslow JW. Widespread expression of BDNF but not NT3 by target areas of basal forebrain cholinergic neurons. *Science*. 1990; 250:290-4. DOI: 10.1126/science.1688328.
- Pierce RC, Bari AA. The role of neurotrophic factors in psychostimulant-induced behavioral and neuronal plasticity. *Rev Neurosci*. 2001; 12:95-110.
- Pisarchik A, Slominski A. Molecular and functional characterization of novel CRFR1 isoforms from the skin: Characterization of novel CRFR1 isoforms. *Eur J Biochem*. 2004; 271:2821-30. DOI: 10.1111/j.1432-1033.2004.04216.x.
- Pollice R, Casacchia M, Bianchini V, Mazza M, Conti CM, Roncone R. Severe Tramadol addiction in a 61 year-old woman without a history of substance abuse. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2008; 21:475-6. DOI: 10.1177/039463200802100230.
- Polter AM, Kauer JA. Stress and VTA synapses: implications for addiction and depression. *Eur J Neurosci*. 2014; 39:1179-88. DOI: 10.1111/ejn.12490.
- Prieto JF, Álvarez A, Olea MJ, Montero, I. Utilización de gabapentina durante la desintoxicación de pacientes cocainómanos. *Trastor Adict*. 2001; 3:287-8. DOI: 10.1016/s1575-0973(01)78576-5.
- Prieto M, Gómez FM, Teresa M. Effects of acute, repeated and chronic variable stress on in vivo tyrosine hydroxylase activity and on alpha(2)-adrenoceptor sensitivity in the rat brain. *Stress*. 2003; 6:281-7. DOI: 10.1080/10253890310001603648.
- Przybylski J, Roulet P, Sara SJ. Attenuation of emotional and nonemotional memories after their reactivation: role of beta adrenergic receptors. *J Neurosci*. 1999; 19:6623-8. DOI: 10.1523/jneurosci.19-15-06623.1999.
- Rastegar D, Fingerhood MI. *The American Society of Addiction Medicine handbook of addiction medicine*. 2nd ed. Oxford University Press. 2020.
- Redgrave P, Gurney K, Reynolds J. What is reinforced by phasic dopamine signals? *Brain Res Rev*. 2008; 58:322-39. DOI: 10.1016/j.brainresrev.2007.10.007.
- Redila VA, Chavkin C. Stress-induced reinstatement of cocaine seeking is mediated by the kappa opioid system. *Psychopharmacology (Berl)*. 2008; 200:59-70. DOI: 10.1007/s00213-008-1122-y.
- Regueras E, López-Guzmán J. Análisis histórico de la epidemia de opioides de Estados Unidos (Parte I). *MPJ*. 2021; 51-60. DOI: 10.20986/mpj.2021.1010/2021.
- Renthal W, Maze I, Krishnan V, Covington HE 3rd, Xiao G, Kumar A, et al. Histone deacetylase 5 epigenetically controls behavioral adaptations to chronic emotional stimuli. *Neuron*. 2007; 56:517-29. DOI: 10.1016/j.neuron.2007.09.032.

Reul JM, De Kloet ER. Two receptor systems for corticosterone in rat brain: microdistribution and differential occupation. *Endocrinology*. 1985; 117:2505-11. DOI: 10.1210/endo-117-6-2505.

Ribeiro Do Couto B, Aguilar MA, Manzanedo C, Rodríguez-Arias M, Armario A, Miñarro J. Social stress is as effective as physical stress in reinstating morphine-induced place preference in mice. *Psychopharmacology (Berl)*. 2006; 185:459-70. DOI: 10.1007/s00213-006-0345-z.

Rivier C, Vale W. Involvement of corticotropin-releasing factor and somatostatin in stress-induced inhibition of growth hormone secretion in the rat. *Endocrinology*. 1985; 117:2478-82. DOI: 10.1210/endo-117-6-2478.

Robbins TW, Everitt BJ. Neurobehavioural mechanisms of reward and motivation. *Curr Opin Neurobiol*. 1996; 6:228-36. DOI: 10.1016/s0959-4388(96)80077-8.

Robinson MJF, Franklin KBJ. Central but not peripheral beta-adrenergic antagonism blocks reconsolidation for a morphine place preference. *Behav Brain Res*. 2007; 182:129-34. DOI: 10.1016/j.bbr.2007.05.023.

Robison AJ, Nestler EJ. Transcriptional and epigenetic mechanisms of addiction. *Nat Rev Neurosci*. 2011; 12:623-37. DOI: 10.1038/nrn3111.

Rodrigues SM, Schafe GE, LeDoux JE. Intra-amygdala blockade of the NR2B subunit of the NMDA receptor disrupts the acquisition but not the expression of fear conditioning. *J Neurosci*. 2001; 21:6889-96. DOI: 10.1523/jneurosci.21-17-06889.2001.

Rogers TJ. Bidirectional regulation of opioid and chemokine function. *Front Immunol*. 2020; 11:94. DOI: 10.3389/fimmu.2020.00094.

Rogerson T, Cai DJ, Frank A, Sano Y, Shobe J, Lopez-Aranda MF, et al. Synaptic tagging during memory allocation. *Nat Rev Neurosci*. 2014; 15:157-69. DOI: 10.1038/nrn3667.

Roman-Vendrell C, Yudowski GA. Real-time imaging of mu opioid receptors by total internal reflection fluorescence microscopy. *Methods Mol Biol*. 2015; 1230:79-86. DOI: 10.1007/978-1-4939-1708-2_6.

Rougé-Pont F, Usiello A, Benoit-Marand M, Gonon F, Piazza PV, Borrelli E. Changes in extracellular dopamine induced by morphine and cocaine: Crucial control by D2 receptors. *J Neurosci*. 2002; 22:3293-301. DOI: 10.1523/jneurosci.22-08-03293.2002.

Roxo MR, Franceschini PR, Zubaran C, Kleber FD, Sander JW. The limbic system conception and its historical evolution. *Sci World J*. 2011; 11:2428-41. DOI: 10.1100/2011/157150.

Rudolf G, Walsh J, Plawman A, Gianutsos P, Alto W, Mancl L, et al. A novel non-opioid protocol for medically supervised opioid withdrawal and transition to antagonist treatment. *Am J Drug Alcohol Abuse*. 2018; 44:302-9. DOI: 10.1080/00952990.2017.1334209.

- Russo SJ, Bolanos CA, Theobald DE, DeCarolis NA, Renthal W, Kumar A, et al. IRS2-Akt pathway in midbrain dopamine neurons regulates behavioral and cellular responses to opiates. *Nat Neurosci*. 2007; 10:93-9. DOI: 10.1038/nn1812.
- Saitoh A, Yoshikawa Y, Onodera K, Kamei J. Role of delta-opioid receptor subtypes in anxiety-related behaviors in the elevated plus-maze in rats. *Psychopharmacology (Berl)*. 2005; 182:327-34. DOI: 10.1007/s00213-005-0112-6.
- Sáiz PA, Jiménez L, Díaz EM, García-Portilla MP, Marina P, Al-Halabí S, et al. Patología dual en trastornos de ansiedad: recomendaciones en el tratamiento farmacológico. *Adicciones*. 2014; 26:254. DOI: 10.20882/adicciones.7.
- Saladin ME, Gray KM, McRae-Clark AL, Larowe SD, Yeatts SD, Baker NL, et al. A double blind, placebo-controlled study of the effects of post-retrieval propranolol on reconsolidation of memory for craving and cue reactivity in cocaine dependent humans. *Psychopharmacology (Berl)*. 2013; 226:721-37. DOI: 10.1007/s00213-013-3039-3.
- Salsitz E, Wiegand T. Pharmacotherapy of opioid addiction: “putting a real face on a false demon”. *J Med Toxicol*. 2016; 12:58-63. DOI: 10.1007/s13181-015-0517-5.
- San Juan P. Trastorno por consumo de sustancias. *Medicine*. 2019; 12:4984-92. DOI: 10.1016/j.med.2019.09.003.
- Sanchís-Segura C, Spanagel R. Behavioural assessment of drug reinforcement and addictive features in rodents: an overview. *Addict Biol*. 2006; 1:2-38. DOI: 10.1111/j.1369-1600.2006.00012.x.
- Sanna PP, Simpson C, Lutfjens R, Koob G. ERK regulation in chronic ethanol exposure and withdrawal. *Brain Res*. 2002; 948:186-91. DOI: 10.1016/s0006-8993(02)03191-8.
- Schroeder BE, Holahan MR, Landry CF, Kelley AE. Morphine-associated environmental cues elicit conditioned gene expression. *Synapse*. 2000; 37:146-58. DOI: 10.1002/1098-2396(200008)37:2<146::AID-SYN8>3.0.CO;2-#.
- Schultz W. Behavioral dopamine signals. *Trends Neurosci*. 2007; 30:203-10. DOI: 10.1016/j.tins.2007.03.007.
- Schwabe L, Nader K, Wolf OT, Beaudry T, Pruessner JC. Neural signature of reconsolidation impairments by propranolol in humans. *Biol Psychiatry*. 2012; 71:380-6. DOI: 10.1016/j.biopsych.2011.10.028.
- Scofield MD, Heinsbroek JA, Gipson CD, Kupchik YM, Spencer S, Smith ACW, et al. The nucleus accumbens: Mechanisms of addiction across drug classes reflect the importance of glutamate homeostasis. *Pharmacol Rev*. 2016; 68:816-71. DOI: 10.1124/pr.116.012484.

- Sesack SR, Grace AA. Cortico-basal ganglia reward network: microcircuitry. *Neuropsychopharmacology*. 2010; 35:27-47. DOI: 10.1038/npp.2009.93.
- Shackman AJ, Fox AS. Contributions of the central extended amygdala to fear and anxiety. *J Neurosci*. 2016; 36:8050-63. DOI: 10.1523/jneurosci.0982-16.2016.
- Shaham Y, Shalev U, Lu L, de Wit H, Stewart J. The reinstatement model of drug relapse: history, methodology and major findings. *Psychopharmacology (Berl)*. 2003 Jul;168(1-2):3-20. doi: 10.1007/s00213-002-1224-x.
- Shalev U, Grimm JW, Shaham Y. Neurobiology of relapse to heroin and cocaine seeking: a review. *Pharmacol Rev*. 2002 Mar;54(1):1-42. doi: 10.1124/pr.54.1.1.
- Shen H, Moussawi K, Zhou W, Toda S, Kalivas PW. Heroin relapse requires long-term potentiation-like plasticity mediated by NMDA2b-containing receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011; 108:19407-12. DOI: 10.1073/pnas.1112052108.
- Shipton EA, Shipton EE, Shipton AJ. A review of the opioid epidemic: What do we do about it? *Pain Ther*. 2018; 7:23-36. DOI: 10.1007/s40122-018-0096-7.
- Sinha R. Chronic stress, drug use, and vulnerability to addiction. *Ann N Y Acad Sci*. 2008; 1141:105-30. DOI: 10.1196/annals.1441.030.
- Sinha R. The role of stress in addiction relapse. *Curr Psych Report*. 2007; 9:388-95. DOI: 10.1007/s11920-007-0050-6.
- Smith SM, Vale WW. The role of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in neuroendocrine responses to stress. *Dialogues Clin Neurosci*. 2006; 8:383-95. DOI: 10.31887/dcns.2006.8.4/ssmith.
- Soeter M, Kindt M. Stimulation of the noradrenergic system during memory formation impairs extinction learning but not the disruption of reconsolidation. *Neuropsychopharmacology*. 2012; 37:1204-15. DOI: 10.1038/npp.2011.307.
- Song J, Shao D, Guo X, Zhao Y, Cui D, Ma Q, et al. Crucial role of feedback signals from prelimbic cortex to basolateral amygdala in the retrieval of morphine withdrawal memory. *Sci Adv*. 2019; 5:eaat3210. DOI: 10.1126/sciadv.aat3210.
- Sordo L, Barrio G, Bravo MJ, Indave BI, Degenhardt L, Wiessing L, et al. Mortality risk during and after opioid substitution treatment: systematic review and meta-analysis of cohort studies. *BMJ*. 2017; 357:j1550. DOI: 10.1136/bmj.j1550.
- Sperling RE, Gomes SM, Sypek EI, Carey AN, McLaughlin JP. Endogenous kappa-opioid mediation of stress-induced potentiation of ethanol-conditioned place preference and self-administration. *Psychopharmacology (Berl)*. 2010; 210:199-209. DOI: 10.1007/s00213-010-1844-5.

- Stinus L, Cador M, Zorrilla EP, Koob GF. Buprenorphine and a CRF1 antagonist block the acquisition of opiate withdrawal-induced conditioned place aversion in rats. *Neuropsychopharmacology*. 2005; 30:90-8. DOI: 10.1038/sj.npp.1300487.
- Stuber GD, Sparta DR, Stamatakis AM, van Leewen WA, Hardjoprajitno JE, Saemi C, et al. Excitatory transmission from the amygdala to nucleus accumbens facilitates reward seeking. *Nature*. 2011; 475:377-380. DOI: 10.1038/nature10194.
- Sun J, Nan G. The extracellular signal-regulated kinase 1/2 pathway in neurological diseases: A potential therapeutic target (Review). *Int J Mol Med*. 2017; 39:1338-46. DOI: 10.3892/ijmm.2017.2962.
- Sun Z, Xu X, He J, Murray A, Sun M-A, Wei X, et al. EGR1 recruits TET1 to shape the brain methylome during development and upon neuronal activity. *Nat Commun*. 2019; 10:3892. DOI: 10.1038/s41467-019-11905-3.
- Surmeier DJ, Kitai ST. State-dependent regulation of neuronal excitability by dopamine. *Nihon Shinkei Seishin Yakurigaku Zasshi*. 1997; 17:105-10.
- Swanson LW. The projections of the ventral tegmental area and adjacent regions: A combined fluorescent retrograde tracer and immunofluorescence study in the rat. *Brain Res Bull*. 1982; 9:321-53. DOI: 10.1016/0361-9230(82)90145-9.
- Swendsen J, Le Moal M. Individual vulnerability to addiction: Vulnerability to addiction. *Ann N Y Acad Sci*. 2011; 1216:73-85. DOI: 10.1111/j.1749-6632.2010.05894.x.
- Taylor SL, Stanek LM, Ressler KJ, Huhman KL. Differential brain-derived neurotrophic factor expression in limbic brain regions following social defeat or territorial aggression. *Behav Neurosci*. 2011; 125:911-20. DOI: 10.1037/a0026172.
- Toubia T, Khalife T. The endogenous opioid system: Role and dysfunction caused by opioid therapy. *Clin Obstet Gynecol*. 2019; 62:3-10. DOI: 10.1097/GRF.0000000000000409.
- Tovote P, Fadok JP, Lüthi A. Neuronal circuits for fear and anxiety. *Nat Rev Neurosci*. 2015; 16:317-31. DOI: 10.1038/nrn3945.
- Townsend EA, Banks ML. Preclinical evaluation of vaccines to treat opioid use disorders: How close are we to a clinically viable therapeutic? *CNS Drugs*. 2020; 34:449-61. DOI: 10.1007/s40263-020-00722-8.
- Uhl GR, Koob GF, Cable J. The neurobiology of addiction: Neurobiology of addiction. *Ann N Y Acad Sci*. 2019; 145:5-28. DOI: 10.1111/nyas.13989.
- Ulrich-Lai YM, Herman JP. Neural regulation of endocrine and autonomic stress responses. *Nat Rev Neurosci*. 2009; 10:397-409. DOI: 10.1038/nrn2647.

Upp LA, Waljee JF. The opioid epidemic. *Clin Plast Surg.* 2020; 47:181-90. DOI: 10.1016/j.cps.2019.12.005.

Valdez GR, Koob GF. Allostasis and dysregulation of corticotropin-releasing factor and neuropeptide Y systems: implications for the development of alcoholism. *Pharmacol Biochem Behav.* 2004; 79:671-89. DOI: 10.1016/j.pbb.2004.09.020.

Valdez GR, Roberts AJ, Chan K, Davis H, Brennan M, Zorrilla EP, et al. Increased ethanol self-administration and anxiety-like behavior during acute ethanol withdrawal and protracted abstinence: Regulation by corticotropin-releasing factor. *Alcohol Clin Exp Res.* 2002; 26:1494-1501. DOI: 10.1111/j.1530-0277.2002.tb02448.x.

Valero E, Gómez-Milanés I, Almela P, Ribeiro Do Couto B, Laorden ML, Milanés MV, et al. The involvement of CRF1 receptor within the basolateral amygdala and dentate gyrus in the naloxone-induced conditioned place aversion in morphine-dependent mice. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2018; 84:102-14. DOI: 10.1016/j.pnpbp.2018.01.018.

Villarreal JS, Barea-Rodríguez EJ. ERK phosphorylation is required for retention of trace fear memory. *Neurobiol Learn Mem.* 2006; 85:44-57. DOI: 10.1016/j.nlm.2005.08.005.

Volkow ND, Li T-K. The neuroscience of addiction. *Nat Neurosci.* 2005; 8:1429-30. DOI: 10.1038/nn1105-1429.

Volkow ND, Michaelides M, Baler R. The neuroscience of drug reward and addiction. *Physiol Rev.* 2019; 99:2115-40. DOI: 10.1152/physrev.00014.2018.

Volkow ND, Rutter J, Pollock JD, Shurtleff D, Baler R. One SNP linked to two diseases—addiction and cancer: A Double Whammy?: Nicotine addiction and lung cancer susceptibility. *Mol Psychiatry.* 2008; 13:990-2. DOI: 10.1038/mp.2008.71.

Volkow ND, Skolnick P. New medications for substance use disorders: challenges and opportunities. *Neuropsychopharmacology.* 2012; 37:290-2. DOI: 10.1038/npp.2011.84.

Von Zastrow M, Svingos A, Haberstock-Debic H, Evans C. Regulated endocytosis of opioid receptors: cellular mechanisms and proposed roles in physiological adaptation to opiate drugs. *Curr Opin Neurobiol.* 2003; 13:348-53. DOI: 10.1016/s0959-4388(03)00069-2.

Walker BM, Rasmussen DD, Raskind MA, Koob GF. A1-noradrenergic receptor antagonism blocks dependence-induced increases in responding for ethanol. *Alcohol.* 2008; 42:91-7. DOI: 10.1016/j.alcohol.2007.12.002.

Walsh SL, Geter-Douglas B, Strain EC, Bigelow GE. Enadoline and butorphanol: evaluation of kappa-agonists on cocaine pharmacodynamics and cocaine self-administration in humans. *J Pharmacol Exp Ther.* 2001; 299:147-58.

- Wang J, Li Z, Tu Y, Gao F. The dopaminergic system in the ventral tegmental area contributes to morphine analgesia and tolerance. *Neuroscience*. 2023; 527:74-83. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2023.05.026.
- Wang L, Han L, Xue P, Hu X, Wong S-W, Deng M, et al. Dopamine suppresses osteoclast differentiation via cAMP/PKA/CREB pathway. *Cell Signal*. 2021; 78:109847. DOI: 10.1016/j.cellsig.2020.109847.
- Wang W-S, Kang S, Liu W-T, Li M, Liu Y, Yu C, Chen J, Chi Z-Q, He L, Liu J-G. Extinction of aversive memories associated with morphine withdrawal requires ERK-mediated epigenetic regulation of brain-derived neurotrophic factor transcription in the rat ventromedial prefrontal cortex. *J Neurosci*. 2012; 32:13763-75. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.1991-12.2012.
- Wang Y, Lai J, Cui H, Zhu Y, Zhao B, Wang W, et al. Inhibition of histone deacetylase in the basolateral amygdala facilitates morphine context-associated memory formation in rats. *J Mol Neurosci*. 2014; 55:269-78. DOI: 10.1007/s12031-014-0317-4.
- Weiss F, Koob GF. Drug addiction: functional neurotoxicity of the brain reward systems. *Neurotox Res*. 2001; 3:145-56. DOI: 10.1007/BF03033235.
- Wellbrock C, Karasarides M, Marais R. The RAF proteins take centre stage. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2004; 5:875-85. DOI: 10.1038/nrm1498.
- West AR, Grace AA. Opposite influences of endogenous dopamine D1 and D2 receptor activation on activity states and electrophysiological properties of striatal neurons: studies combining in vivo intracellular recordings and reverse microdialysis. *J Neurosci*. 2002; 22:294-304. DOI: 10.1523/jneurosci.22-01-00294.2002.
- White FJ, Wang RY. Electrophysiological evidence for the existence of both D-1 and D-2 dopamine receptors in the rat nucleus accumbens. *J Neurosci*. 1986; 6:274-80. DOI: 10.1523/jneurosci.06-01-00274.1986
- Wise RA. Dopamine, learning and motivation. *Nat Rev Neurosci*. 2004; 5:483-94. DOI: 10.1038/nrn1406.
- Wise RA. Neurobiology of addiction. *Curr Opin Neurobiol*. 1996; 6:243-51. DOI: 10.1016/s0959-4388(96)80079-1.
- World Health Organization (WHO). Lexicon of alcohol and drug terms. 1994.
- Wu Y, Li Y, Yang X, Sui N. Differential effect of beta-adrenergic receptor antagonism in basolateral amygdala on reconsolidation of aversive and appetitive memories associated with morphine in rats. *Addict Biol*. 2014; 19:5-15. DOI: 10.1111/j.1369-1600.2012.00443.x.

- Xu Y, Lv X-F, Cui C-L, Ge F-F, Li Y-J, Zhang H-L. Essential role of NR2B-containing NMDA receptor-ERK pathway in nucleus accumbens shell in morphine-associated contextual memory. *Brain Res Bull.* 2012; 89:22-30. DOI: 10.1016/j.brainresbull.2012.06.012.
- Yahyavi-Firouz-Abadi N, See RE. Anti-relapse medications: preclinical models for drug addiction treatment. *Pharmacol Ther.* 2009; 124:235-47. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2009.06.014.
- Yan Y, Newman AH, Xu M. Dopamine D1 and D3 receptors mediate reconsolidation of cocaine memories in mouse models of drug self-administration. *Neuroscience.* 2014; 278:154-64. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2014.08.008.
- Yang LZ, Tovote P, Rayner M, Kockskämper J, Pieske B, Spiess J. Corticotropin-releasing factor receptors and urocortins, links between the brain and the heart. *Eur J Pharmacol* 2010; 632: 1- 6. DOI: 10.1016/j.ejphar.2010.01.027
- Zanos P, Georgiou P, Wright SR, Hourani SM, Kitchen I, Winsky-Sommerer R, Bailey A. The oxytocin analogue carbetocin prevents emotional impairment and stress-induced reinstatement of opioid-seeking in morphine-abstinent mice. *Neuropsychopharmacology.* 2014; 39:855-65. DOI: 10.1038/npp.2013.285.
- Zárate S, Cardenas FP, Acevedo-Triana C, Sarmiento-Bolaños MJ, León LA. Efectos del estrés sobre los procesos de plasticidad y neurogénesis: una revisión. *Univ Psychol.* 2014; 13:1181-214. <http://dx.doi.org/10.1114/4/Javeriana.U.PSY13-3.eepp>.
- Zhang J, Liu Z, Liu X, Wang X, Yu L. Intravenous injection of GluR2-3Y inhibits repeated morphine-primed reinstatement of drug seeking in rats. *Brain Sci.* 2023b; 13:590. DOI: 10.3390/brainsci13040590.
- Zhang J, Lu Y, Jia M, Bai Y, Sun L, Dong Z, et al. Kappa opioid receptor in nucleus accumbens regulates depressive-like behaviors following prolonged morphine withdrawal in mice. *iScience.* 2023a; 26:107536. DOI: 10.1016/j.isci.2023.107536.
- Zhang Y, Xu C, Zheng H, Loh HH, Law P-Y. Morphine modulates adult neurogenesis and contextual memory by impeding the maturation of neural progenitors. *PLoS One.* 2016; 11:e0153628. DOI: 10.1371/journal.pone.0153628.
- Zhou LF, Zhu YP. Changes of CREB in rat hippocampus, prefrontal cortex and nucleus accumbens during three phases of morphine induced conditioned place preference in rats. *J Zhejiang Univ Sci B.* 2006; 7:107-113. DOI: 10.1631/jzus.2006.B0107.
- Zhou Y, Won J, Karlsson MG, Zhou M, Rogerson T, Balaji J, et al. CREB regulates excitability and the allocation of memory to subsets of neurons in the amygdala. *Nat Neurosci.* 2009; 12:1438-43. DOI: 10.1038/nn.2405.

Zhu Y, Wang K, Ma T, Ji Y, Lou Y, Fu X, et al. Nucleus accumbens D1/D2 circuits control opioid withdrawal symptoms in mice. *J Clin Invest.* 2023; 133:163266. DOI: 10.1172/jci163266.

Zorrilla EP, Logrip ML, Koob GF. Corticotropin releasing factor: a key role in the neurobiology of addiction. *Front Neuroendocrinol.* 2014; 35:234-44. DOI: 10.1016/j.yfrne.2014.01.001.