



UNIVERSIDAD DE MURCIA

FACULTAD DE MEDICINA

Cambios Adaptativos Cardíacos Durante la Dependencia de Morfina. Implicación de la Proteína de Choque Térmico Hsp27

D^a . Elena Martínez Laorden

2014

2014



Universidad de Murcia

Facultad de Medicina

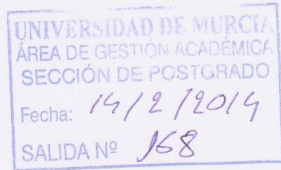
Departamento de Farmacología

CAMBIOS ADAPTATIVOS CARDIACOS
DURANTE LA DEPENDENCIA DE
MORFINA. IMPLICACIÓN DE LA PROTEINA
DE CHOQUE TÉRMICO Hsp27



Elena Martínez Laorden

Memoria presentada para optar al grado de Doctor



UNIVERSIDAD DE
MURCIA

Vicerrectorado de
Estudios

D^a ELENA MARTÍNEZ LAORDEN
C/ Castillo de Ricote, 16, 2^o C
30506 ALTORREAL (MOLINA DE SEGURA)

Vista la solicitud presentada el día 31 de enero de 2014, por D^a ELENA MARTÍNEZ LAORDEN, con D.N.I.:48.400.880-W, sobre autorización para presentación de tesis doctoral como compendio de publicaciones con carácter previo a la tramitación de la misma en la Universidad de Murcia, le comunico que la Comisión de General de Doctorado, vistos:

- el informe previo del Presidente de la Comisión Académica del Doctorado en Integración y Modulación de Señales en Biomedicina , y
- el visto bueno de la Comisión de Ramas de Conocimiento de Ciencias de la Salud ,

resolvió, en su sesión de 14 de febrero de 2014, **ACEDER** a lo solicitado por la interesada pudiendo, por lo tanto, presentar su tesis doctoral en la modalidad de compendio de publicaciones.

Lo que en cumplimiento del artículo 58 de la vigente Ley 30/1992, de Régimen Jurídico de las Administraciones Públicas y del Procedimiento Administrativo Común, de 26 de noviembre, se **notifica a** D^a ELENA MARTÍNEZ LAORDEN, significándole que contra este acuerdo, y conforme a lo establecido en el artículo 21.2 de los Estatutos de la Universidad de Murcia, podrá interponer recurso de alzada ante el Sr. Rector Magfco de esta Universidad, en el plazo de un mes a partir del día siguiente a la recepción de la misma.

Murcia, 14 de febrero de 2014
Vicerrectora de Estudios y
Presidenta de la Comisión General de Doctorado



Jaes
Concepción Palacios Bernal



UNIVERSIDAD DE
MURCIA

D^a. María Luisa Laorden Carrasco, Catedrática de Universidad del Área de Farmacología en el Departamento de Farmacología, AUTORIZA:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada " CAMBIOS ADAPTATIVOS CARDIACOS DURANTE LA DEPENDENCIA DE MORFINA. IMPLICACIÓN DE LA PROTEINA DE CHOQUE TÉRMICO Hsp27 ", realizada por D^a. Elena Martínez Laorden, bajo mi inmediata dirección y supervisión, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

En Murcia, a 24 de Enero de 2014



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

Mod:T-20



UNIVERSIDAD DE
MURCIA

D^a. Pilar Almela Rojo, Doctora de Universidad del Área de Tecnología Farmacéutica en el Departamento de Farmacología, AUTORIZA:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada " CAMBIOS ADAPTATIVOS CARDIACOS DURANTE LA DEPENDENCIA DE MORFINA. IMPLICACIÓN DE LA PROTEINA DE CHOQUE TÉRMICO Hsp27 ", realizada por D^a. Elena Martínez Laorden, bajo mi inmediata dirección y supervisión, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

En Murcia, a 24 de Enero de 2014



Mod:T-20

La tesis doctoral titulada “Cambios adaptativos cardiacos durante la dependencia de morfina. Implicación de la proteína de choque térmico Hsp27” es un compendio de trabajos previamente publicados.

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

- ✓ Martínez-Laorden E, Hurle MA, Milanés MV, Laorden ML, Almela P (2012) *Morphine withdrawal activates hypothalamic-pituitary adrenal and heat shock protein 27 in the left ventricle: Role of extracellular signal-regulated kinase*. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. 342: 665-675. **Índice de impacto: 3.891**
- ✓ Navarro-Zaragoza J, Martínez-Laorden E, Mora L, Hidalgo J, Milanés MV, Laorden ML (2014) *Cardiac adverse effects of naloxone-precipitated morphine withdrawal on right ventricle: Role of Corticotropin-releasing factor (CRF) 1 receptor*. Toxicology and Applied Pharmacology. 275: 28-35. **Índice de impacto: 3.975**
- ✓ Martínez-Laorden E, García-Carmona JA, Baroja Mazo A, Romecín P, Atucha NM, Milanés MV, Laorden ML (2014) *Corticotropin-releasing factor (CRF) receptor-1 is involved in the response of heart to morphine withdrawal*. British Journal of Pharmacology. 171: 688-700. **Índice de Impacto:5.067**

El presente trabajo experimental ha dado lugar a las siguientes comunicaciones:

✓ **7th Forum of European Neuroscience (FENS), Amsterdam 2010**

Martínez-Laorden E, Almela P, Mora L, Milanés MV, Laorden ML. *Heat shock protein (Hsp) 27 is expressed in cardiac tissues of rats chronically treated with morphine and after naloxone-precipitated withdrawal*

✓ **European Opioid Conference (EOC), Cracovia 2011**

Almela P, Martínez-Laorden E, Mora L, Milanés MV, Laorden ML. *Morphine withdrawal regulates phosphorylation of heat shock protein 27 through extracellular- signal-regulated kinase in the heart (Oral)*

✓ **XXXIII Congreso de la Sociedad Española de Farmacología, Málaga 2011**

González-Cuello A, Martínez-Laorden E, Laorden ML, Milanés MV, Almela P. *Implication of extracellular signal-regulated kinase in the activation of heat shock protein 27 observed after naloxone-induced morphine withdrawal in the rat heart*

✓ **24 Congreso Nacional de la Sociedad Española de Neurociencia, Salamanca 2011**

Laorden ML, Martínez-Laorden E, Milanés MV, Almela P. *Implication of catecholamines on the activation of heat shock protein 27 observed after naloxone- induced morphine withdrawal in rat heart*

✓ **6th European Congress of Pharmacology, Granada 2012**

Martínez-Laorden E, Laorden ML, Milanés MV, Almela P. *Expression and Hsp27, Troponin T and Troponin I co-localization in cardiac tissue after naloxone-precipitated morphine withdrawal*

✓ **6th European Congress of Pharmacology Granada, July 2012**

Almela P, Martínez-Laorden E, Mora L, Milanés MV, Laorden ML. *Role of COMT in catecholamines metabolism during morphine withdrawal*

✓ **9th European Opioid Conference, Guildford 2013**

Navarro-Zaragoza J, Martínez-Laorden E, Milanés MV, Laorden ML. *Corticotropin releasing factor-1 blockade attenuates cardiac adaptive effects on noradrenergic pathways during morphine withdrawal*

✓ **9th European Opioid Conference, Guildford 2013**

Martínez-Laorden E, Laorden ML, Milanés MV, Almela P *Morphine withdrawal regulates HSP27 phosphorylation at ser 82 and tropomyosin and m-calpain expression in cardiac tissue*

✓ **9th European Opioid Conference, Guildford 2013**

García-Carmona JA, Martínez-Laorden E, Milanés MV, Laorden ML. *Corticotropin releasing factor receptor-1 is involved in the alteration of hemodynamic variables in the heart after morphine withdrawal*

✓ **9th European Opioid Conference, Guildford 2013**

García-Carmona JA, Martínez-Laorden E, Baroja-Mazo MV, Milanés ML, Laorden ML. *Corticotropin releasing factor receptor-1 mediates catecholaminergic activation in the heart left ventricle after morphine withdrawal*

✓ **XXXIV Congreso Nacional de la Sociedad Española de Farmacología, San Pedro del Pinatar 2013**

García-Carmona JA, García-Pérez D, Martínez-Laorden E, Milanés MV, Laorden ML. *Assessing students' knowledge and understanding of pharmacology by a reevaluation with different types of exam*

✓ **XXXIV Congreso Nacional de la Sociedad Española de Farmacología, San Pedro del Pinatar 2013**

Martínez-Laorden E, García-Carmona JA, Hidalgo JM, Mora L, Baroja-Mazo A, Almela P, Milanés MV, Laorden ML. *Role of crf1-receptor in the enhancement of tyrosine-hydroxylase phosphorylation at serine 40 (thpser40) after morphine withdrawal in the right ventricle*

✓ **Comunicación Científica RED DE TRASTORNOS ADICTIVOS, Oviedo 2013**

Martínez-Laorden E, García-Carmona JA, Milanés MV, Laorden ML. *Cardiac adaptive changes observed after naloxone-precipitated withdrawal. Role of CRF1 receptor*

Este trabajo de investigación ha sido subvencionado por los siguientes Organismos Públicos:

- ✓ Ministerio de ciencia e innovación (SAF/FEDER-2010-17907) Mecanismos neurobiológicos implicados en la preferencia de plaza a morfina y en aversión a naloxona. Papel de los receptores de CRF1

- ✓ Comisión interministerial de Ciencia y Tecnología MEC (SAF/FEDER2009/07178) Implicación del sistema cerebral del estrés en la dependencia a opiáceos. Mecanismos celulares y moleculares

- ✓ Ministerio de Educación Y Ciencia (SAF2007-62758) Implicación del CRF extrahipotalámico en la tolerancia/dependencia de morfina

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría dar las gracias a todas las personas que han hecho posible la realización de esta Tesis Doctoral.

En primer lugar quiero agradecer su gran dedicación a mis Directoras de Tesis, Luisi y Pilar.

Luisi, gracias por transmitirme tu ilusión por la ciencia, tu afán de superación y tu profundo conocimiento en el campo de las adicciones. Te estaré eternamente agradecida por la oportunidad que me has brindado.

Pilar, gracias por tu ayuda y dedicación en este proyecto.

También quiero agradecer a Marivi lo bien que me ha tratado desde que vine a este departamento y la cantidad de cosas que he aprendido de ella.

A mis compañeros de departamento de Farmacología, en especial a Lucía e Iván con los que además me une una profunda amistad.

Mil gracias a Juani, Fara y Aurora por su ayuda con las técnicas de HPLC, inmunofluorescencia y cortes en microtomo.

Dar las gracias a mis padres, Toya y Cristóbal, y a mi hermana Carolina, por hacerme ver lo importante que es tener interés por las cosas, por apoyarme en todo momento en mi decisión de realizar esta tesis y por ayudarme tanto en el ámbito laboral como personal.

Por último a mi marido, Damián, ¿que hubiera hecho sin tu ayuda? mil gracias por tu apoyo incondicional.

ABREVIATURAS

AC: Adenilato ciclasa.

ACTH: Hormona adrenocorticotropa.

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

ANOVA: Análisis de varianza

BSA: Albúmina de suero bovino.

MB-COMT: Catecol-o-metil transferasa de membrana

S-COMT: Catecol-o-metil transferasa soluble

CREB: Proteína de unión al elemento de respuesta del AMPc

CRF: Factor liberador de corticotropina.

CRF1R: Receptor 1 de CRF

DA: Dopamina.

DAPI: 4,6-diaminino-2-fenilindol

DMSO: Dimetilsulfóxido

ERK: Protein kinasa regulada por señales extracelulares.

GRP: Proteína regulada por glucosa

HHA: Eje hipotálamo-hipófisis-adrenal

HPLC: Cromatografía líquida de alta resolución

HR: Frecuencia cardíaca

HSF: Factor de choque térmico

HSP: Proteínas de choque térmico

IgG: Inmunoglobulina G

KO: Knockout

MAP: Presión arterial media

MAPK: Protein kinasas activadas por mitógenos

NA: Noradrenalina.

NCNA: no colinérgico no adrenérgico

NMN: normetanefrina

NAc: Núcleo accumbens.

NTS: Núcleo del tracto solitario.

PBS: Tampón fosfato salino.

PFC: Corteza prefrontal.

PK: Protein kinasa.

PKA: Protein kinasa A.

PKC: Protein kinasa C.

PKD: Protein kinasa D

PVDF: Fluoruro de polivinildieno

PVN: Núcleo paraventricular del hipotálamo.

SDS: Dodecil sulfato sódico

Ser: Serina

SNC: Sistema nervioso central.

SNP: Sistema nervioso periférico

TBS-T: Tris buffer salino-tween 20

TH: Tirosina hidroxilasa

Tn: Troponina

cTnC: Troponina C

cTnI: Troponina I

cTnT:troponina T

VTA: Área tegmental ventral

WB: Western-blot

WT: Wild-type



Índice

ÍNDICE

1- COMPENDIO DE ARTÍCULOS

1.1 Morphine withdrawal activates hypothalamic-pituitary-adrenal axis and heat shock protein 27 in the left ventricle: Role of extracellular signal-regulated kinase.

1.2 Cardiac adverse effects of naloxone-precipitated morphine withdrawal on right ventricle: Role of Corticotropin-releasing factor (CRF) 1 receptor.

1.3 Corticotropin-releasing factor (CRF) receptor-1 is involved in the response of heart to morphine withdrawal.

2- INTRODUCCIÓN

2.1. Neurobiología de la adicción	1
2.1.1 Refuerzo positivo	2
2.1.2. Tolerancia, sensibilidad y síndrome de abstinencia	4
2.1.3. Recaídas	7
2.2. Conexión cerebro-corazón.....	9
2.3. Adicción y cambios adaptativos cardiacos	12
2.3.1. Sistema simpático	12
2.3.2. Análogos del CRF.....	14
2.3.3. Proteínas de choque térmico.....	16

3- OBJETIVOS	23
---------------------------	-----------

4- MÉTODOS	26
-------------------------	-----------

4.1. Animales.....	26
--------------------	----

4.2. Genotipación	26
4.3. Procedimiento experimental	27
4.3.1. Procedimiento experimental en ratas	28
4.3.2. Procedimiento experimental en ratones.....	29
4.4. Variables hemodinámicas	30
4.5. Radioinmunoensayo (RIA).....	30
4.6. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).....	30
4.7. Inmunofluorescencia	31
4.8. Western blot	33
4.9. Análisis estadístico	35
5- RESULTADOS Y DISCUSIÓN	37
6- CONCLUSIONES	47
7- BIBLIOGRAFÍA.....	49

La tesis doctoral titulada “Cambios adaptativos cardiacos durante la dependencia de morfina. Implicación de la proteína de choque térmico Hsp27” es un compendio de trabajos previamente publicados.

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

1- Martínez-Laorden E, Hurlé MA, Milanés MV, Laorden ML, Almela P (2012) *Morphine withdrawal activates hypothalamic-pituitary adrenal and heat shock protein 27 in the left ventricle: Role of extracellular signal-regulated kinase*. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. 342: 665-675. **Índice de impacto: 3.891**

Abstract: The negative affective states of withdrawal involve the recruitment of brain and peripheral stress circuitry [e.g., noradrenergic activity, induction of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical (HPA) axis, and the expression and activation of heat shock proteins (Hsps)]. The present study investigated the role of extracellular signal-regulated protein kinase (ERK) and β -adrenoceptor on the response of stress systems to morphine withdrawal by the administration of [amino[(4-aminophenyl)thio]methylene]-2-(trifluoromethyl)benzeneacetonitrile (SL327), a selective inhibitor of ERK activation, or propranolol (a β -adrenoceptor antagonist). Dependence on morphine was induced by a 7-day subcutaneous implantation of morphine pellets. Morphine withdrawal was precipitated on day 8 by the injection of naloxone (2 mg/kg s.c.). Plasma concentrations of adrenocorticotropin and corticosterone were determined by radioimmunoassay; noradrenaline (NA) turnover in left ventricle was determined by high-performance liquid chromatography; and catechol-O-methyl transferase (COMT) and Hsp27 expression and phosphorylation at Ser82 were determined by quantitative blot immunolabeling. Morphine-withdrawn rats showed an increase of NA turnover and COMT expression in parallel with an enhancement of adrenocorticotropin and plasma corticosterone concentrations. In addition, we observed an enhancement of Hsp27 expression and phosphorylation. Pretreatment with SL327 or propranolol significantly reduced morphine withdrawal-induced increases of plasma adrenocorticotropin and Hsp27 phosphorylation at Ser82 without any changes in plasma corticosterone levels. The present findings demonstrate that morphine withdrawal is capable of inducing the activation of HPA axis in parallel with an enhancement of Hsp27 expression and Hsp27 phosphorylation at Ser82 and suggest a role for β -adrenoceptors and ERK pathways in mediating morphine-withdrawal activation of the HPA axis and cellular stress response.

Dirección url:

<http://jpet.aspetjournals.org/content/342/3/665.long>

2- Navarro-Zaragoza J, Martínez-Laorden E, Mora L, Hidalgo J, Milanés MV, Laorden ML (2014) *Cardiac adverse effects of naloxone-precipitated morphine withdrawal on right ventricle: Role of Corticotropin-releasing factor (CRF) 1 receptor*. Toxicology and Applied Pharmacology. 275: 28-35. **Índice de impacto: 3.975**

Abstract: Opioid addiction is associated with cardiovascular disease. However, mechanisms linking opioid addiction and cardiovascular disease remain unclear. This study investigated the role of corticotropin-releasing factor (CRF) 1 receptor in mediating somatic signs and the

behavioural states produced during withdrawal from morphine dependence. Furthermore, it studied the efficacy of CRF1 receptor antagonist, CP-154,526 to prevent the cardiac sympathetic activity induced by morphine withdrawal. In addition, tyrosine hydroxylase (TH) phosphorylation pathways were evaluated. Like stress, morphine withdrawal induced an increase in the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis activity and an enhancement of noradrenaline (NA) turnover. Pre-treatment with CRF1 receptor antagonist significantly reduced morphine withdrawal-induced increases in plasma adrenocorticotropic hormone (ACTH) levels, NA turnover and TH phosphorylation at Ser31 in the right ventricle. In addition, CP-154,526 reduced the phosphorylation of extracellular signal-regulated kinase (ERK) after naloxone-precipitated morphine withdrawal. In addition, CP-154,526 attenuated the increases in body weight loss during morphine treatment and suppressed some of morphine withdrawal signs. Altogether, these results support the idea that cardiac sympathetic pathways are activated in response to naloxone-precipitated morphine withdrawal suggesting that treatment with a CRF1 receptor antagonist before morphine withdrawal would prevent the development of stress-induced behavioural and autonomic dysfunction in opioid addicts.

Dirección url:

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0041008X13005747>

3- Martínez-Laorden E, García-Carmona JA, Baroja Mazo A, Romecín P, Atucha NM, Milanés MV, Laorden ML (2014) *Corticotropin-releasing factor (CRF) receptor-1 is involved in the response of heart to morphine withdrawal*. British Journal of Pharmacology. 171: 688-700.

Índice de Impacto: 5.067

Abstract:

BACKGROUND AND PURPOSE: The negative affective states of withdrawal involve the recruitment of brain and peripheral stress circuitry [noradrenergic activity, induction of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical (HPA) axis and activation of heat shock proteins (Hsps)]. Corticotropin-releasing factor (CRF) pathways are important mediators in the negative symptoms of opioid withdrawal. We performed a series of experiments to characterize the role of the CRF1 receptor in the response of stress systems to morphine withdrawal and its effect in the heart using genetically engineered mice lacking functional CRF1 receptors.

EXPERIMENTAL APPROACH: Wild-type and CRF1 receptor-knockout mice were treated with increasing doses of morphine. Precipitated withdrawal was induced by naloxone. Plasma adrenocorticotropic hormone (ACTH) and corticosterone levels, the expression of myocardial Hsp27, Hsp27 phosphorylated at Ser(82), membrane (MB)-COMT, soluble (S)-COMT protein and NA turnover were evaluated by RIA, immunoblotting and HPLC.

KEY RESULTS: During morphine withdrawal we observed an enhancement of NA turnover in parallel with an increase in mean arterial blood pressure (MAP) and heart rate (HR) in wild-type mice. In addition, naloxone-precipitated morphine withdrawal induced an activation of HPA axis and Hsp27. The principal finding of the present study was that plasma ACTH and corticosterone levels, MB-COMT, S-COMT, NA turnover, and Hsp27 expression and activation observed during morphine withdrawal were significantly inhibited in the CRF1 receptor-knockout mice.

CONCLUSION AND IMPLICATIONS: Our results demonstrate that CRF/CRF1 receptor activation may contribute to stress-induced cardiovascular dysfunction after naloxone-precipitated morphine withdrawal and suggest that CRF/CRF1 receptor pathways could contribute to cardiovascular disease associated with opioid addiction.

Dirección url:

<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/bph.12511/abstract;jsessionid=327530B0C03DA7C8B104434B4584A186.f04t03>



Introducción

La dependencia de drogas o sustancias de abuso sigue siendo uno de los principales problemas sanitarios a los que se enfrenta la sociedad actual. El consumo de drogas se produce en entornos de ocio y se inicia en personas muy jóvenes, que conocen los riesgos de estas conductas, pero optan por ignorarlos. El impacto que tiene el consumo de las distintas sustancias de abuso continúa siendo elevado, por ello, la prevención y tratamiento de las adicciones constituyen uno de los principales problemas planteados en el ámbito de la salud pública mundial.

La investigación en el campo de las adicciones ha centrado sus esfuerzos en conocer los posibles cambios que se producen tras el consumo de drogas, tanto a nivel de sistema nervioso central (SNC) como periférico (SNP), a corto, medio y largo plazo, con la finalidad de conocer los mecanismos implicados en dichos cambios, lo que permitirá el desarrollo de nuevas dianas terapéuticas que mejoren el tratamiento y eviten las recaídas.

2.1. Neurobiología de la adicción

La adicción a drogas se define como un desorden neurológico crónico, con tendencia a la recaída, caracterizado por (a) búsqueda y consumo compulsivo de la droga, (b) pérdida del control sobre el consumo de la misma, y (c) aparición de un estado emocional negativo (disforia, ansiedad, irritabilidad) cuando no se tiene acceso a la droga (Koob, 2013). Las recaídas son una característica común de las adicciones y el principal problema sanitario.

En los procesos adictivos podemos distinguir tres etapas claramente definidas (Koob y Zorrilla, 2010): **Inicio:** comienza con el consumo puntual de la droga, que ejerce un efecto placentero (reforzador positivo), con lo cual dicho consumo se prolonga en el tiempo, pasando a ser crónico. Los efectos reforzadores positivos de las drogas se consideran como una de las primeras etapas de la adicción. **Mantenimiento:** El cese del consumo de las sustancias de abuso produce una serie de efectos aversivos,

tanto fisiológicos como psicológicos (reforzadores negativos); para evitar esta sintomatología negativa, se perpetúa el consumo. **Recaída:** Tras el cese del consumo y debido a una serie de factores psicológicos, estresantes o a las claves ligadas al consumo, el sujeto presenta un deseo incontrolado (craving) de volver a consumir (Koob, 2013). En otras palabras, podríamos decir que el inicio del consumo se corresponde con un atracón/intoxicación por la droga, el mantenimiento se refleja con la abstinencia/efectos negativos que se producen tras el cese, y la recaída equivaldría a la preocupación/anticipación ("deseo") por volver a consumir la droga (Figura 1).

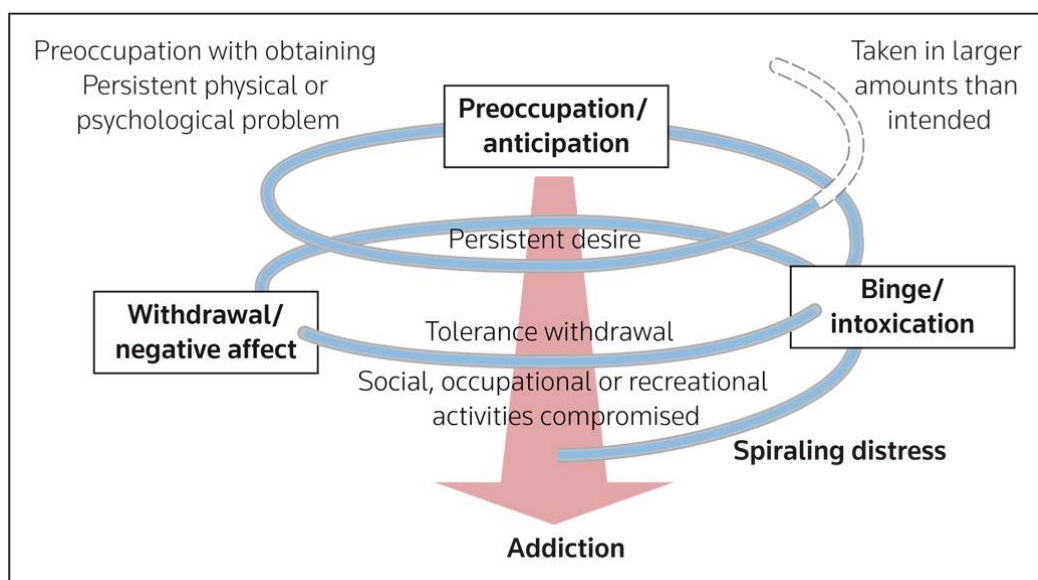


Figura 1. Etapas del ciclo de la adicción a drogas. Tomada de Koob y Zorrilla 2010

2.1.1. Refuerzo positivo

Uno de los principales circuitos neuronales implicados en el placer y la euforia ocasionados por el consumo de drogas es el sistema dopaminérgico mesocorticolímbico o "sistema de recompensa". Éste se compone de proyecciones que van desde el área tegmental ventral (VTA), donde se encuentran los cuerpos neuronales al núcleo accumbens (NAc), corteza prefrontal (PFC) y estriado. La PFC, la amígdala, el tálamo dorsomedial y el hipocampo envían proyecciones asimismo al NAc

y éste, a su vez, al VTA. Los núcleos y áreas cerebrales implicados en las distintas etapas de la adicción están relacionados entre sí en un circuito anatómico y funcional, siendo el NAc, dentro del sistema de recompensa, el transportador de información entre las distintas regiones cerebrales (Figura 2).

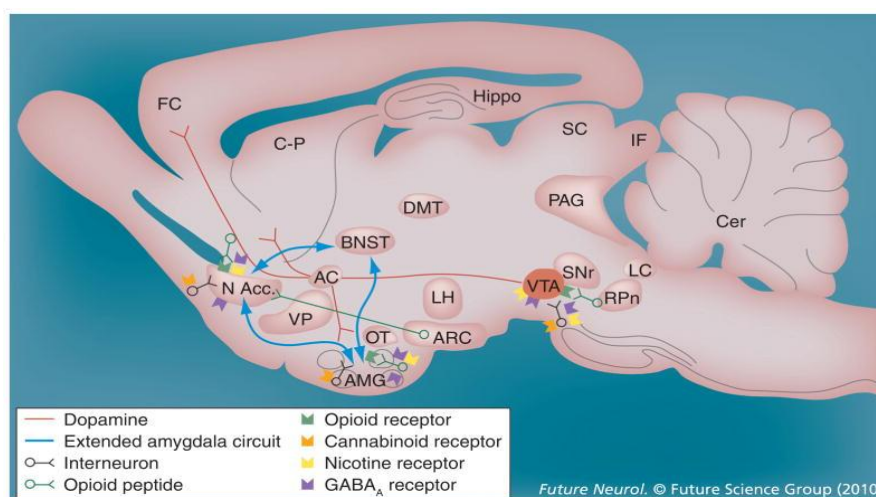


Figura 2. Vías y neurotransmisores implicados en la adicción. Tomada de Edwards y Koob, 2010

La activación de estos sistemas de recompensa da lugar a un incremento en la liberación de dopamina (DA) en el NAc y PFC. Aunque la DA se considera el neurotransmisor principalmente implicado en los efectos reforzantes de las sustancias de abuso, recientemente se ha propuesto que también la noradrenalina (NA) estaría implicada en diferentes etapas de la adicción y en particular en los efectos tanto reforzantes como aversivos de las drogas. De hecho, es conocido que el VTA y el NAc reciben proyecciones noradrenérgicas procedentes del núcleo del tracto solitario (NTS), siendo este núcleo la principal fuente noradrenérgica que recibe el NAc (Weinshenker y Schroeder, 2007).

Se sabe que la *recompensa* desempeña un papel fundamental en el proceso que dirige a un individuo a formar preferencias nuevas. Las sustancias de abuso inducen *recompensa*, la cual puede entenderse como un cambio fisiológico y subjetivo positivo, excitante o calmante, y perceptible por el individuo. La asociación y predicción de la

recompensa puede desencadenar el deseo por el consumo.

2.1.2. Tolerancia, sensibilidad y síndrome de abstinencia

Tras el consumo crónico de sustancias de abuso se produce una disminución de la activación del sistema dopaminérgico mesocorticolímbico, un fenómeno conocido como tolerancia (disminución del efecto por el consumo repetido de la droga) (Koob y Le Moal, 1997), lo que implica la necesidad de ir aumentando el consumo de la droga para obtener los efectos placenteros producidos al inicio del consumo. Al mismo tiempo, algunas drogas producen un efecto opuesto a la tolerancia, lo que se conoce como sensibilización (aumento de la respuesta) (Koob y Le Moal, 2008). La sensibilización se asocia a cambios en las vías glutamatérgicas que proyectan a los circuitos mesocorticolímbicos. Esta sensibilización puede durar mucho tiempo después del cese del consumo y ser la responsable del deseo compulsivo de la búsqueda y del consumo de la droga y, por consiguiente, de la recaída.

Tras el cese del consumo tiene lugar un estado aversivo negativo caracterizado por depresión, disforia, estrés, insomnio (síndrome de abstinencia). Este síndrome se caracteriza por una disminución de la actividad dopaminérgica mesocorticolímbica (George y cols., 2012), junto con una activación del sistema cerebral del estrés constituido por la amígdala extendida y el eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (HHA). El eje HHA es un complejo sistema neuroendocrino involucrado en diversas funciones fisiológicas centrales y periféricas, como situaciones de estrés generadas durante la adicción a drogas o sustancias de abuso. Está compuesto por el núcleo paraventricular (PVN) del hipotálamo, el lóbulo anterior de la hipófisis y la corteza de las glándulas suprarrenales. El factor liberador de corticotropina (CRF) es un mediador clave de las respuestas ante situaciones de estrés. Es sintetizado en el PVN en respuesta al estrés, estimulando la síntesis y secreción de la hormona adrenocorticotropa (ACTH) en la adenohipófisis mediante la activación del receptor de CRF1 y ésta, a su vez, induce la

síntesis y liberación de glucocorticoides (cortisol en humanos y corticosterona en roedores) de la corteza suprarrenal al torrente sanguíneo. Los receptores de glucocorticoides se localizan en las estructuras anatómicas que conforman los circuitos de recompensa. La activación de estos receptores podría aumentar la activación de estos circuitos y favorecer una conducta compulsiva hacia el consumo de drogas.

El CRF también se localiza fuera del eje HHA modulando el control autónomo y el comportamiento frente al estrés. Este sistema tiene como componente fundamental la amígdala extendida que comprende: núcleo central de la amígdala, el núcleo de la estría terminal y la corteza del NAc. En el núcleo central de la amígdala y el núcleo de la estría terminal existen una gran cantidad de neuronas de CRF que envían proyecciones al VTA y a los núcleos bulbares: NTS y área ventrolateral del bulbo (núcleos catecolaminérgicos), lo que induce un aumento en la liberación de DA y NA, respectivamente. Se ha postulado que el eje HHA y el sistema del estrés extrahipotalámico jugarían un papel importante en las recaídas (Koob, 2008).

Los receptores de CRF, CRF1 y CRF2, pertenecen al grupo de receptores acoplados a proteínas Gs; al ser activados por CRF y sus análogos transducen sus señales a las células mediante adenil ciclasa (AC), incrementando la síntesis de adenosín monofosfato-3',5'-cíclico (AMPC) (Figura 3). Ambos tipos de receptores se localizan en diferentes núcleos y áreas del SNC y a nivel periférico, como en el tejido cardíaco (Takahashi, 2012). Se ha postulado que estos receptores están implicados en diversos desórdenes asociados con el estrés, ansiedad, depresión y adicción; parece ser que los receptores de CRF1 median los efectos aversivos que aparecen durante el estrés y la adicción (Gammatopoulos, 2012).

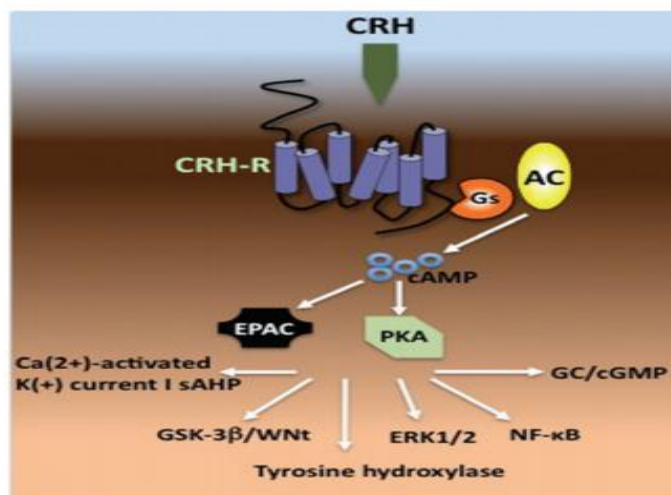


Figura 3. Receptor de CRF acoplado a proteína G. Tomada de Gammatopoulos, 2012

No sólo el CRF está implicado en los efectos aversivos de las drogas sino que también los sistemas noradrenérgicos juegan un papel importante. La amígdala extendida y el PVN reciben proyecciones noradrenérgicas del NTS (Koob, 2009). Además, se ha postulado la existencia de una interacción entre las neuronas de CRF y de NA; las neuronas de CRF activarían la liberación de NA, y a su vez, neuronas noradrenérgicas estimularían la liberación de CRF (Koob y Zorrilla, 2010). La activación del eje HHA ha sido asociada con la activación de las neuronas noradrenérgicas del NTS, que inerva el PVN (Laorden y cols., 2002) (Figura 4).

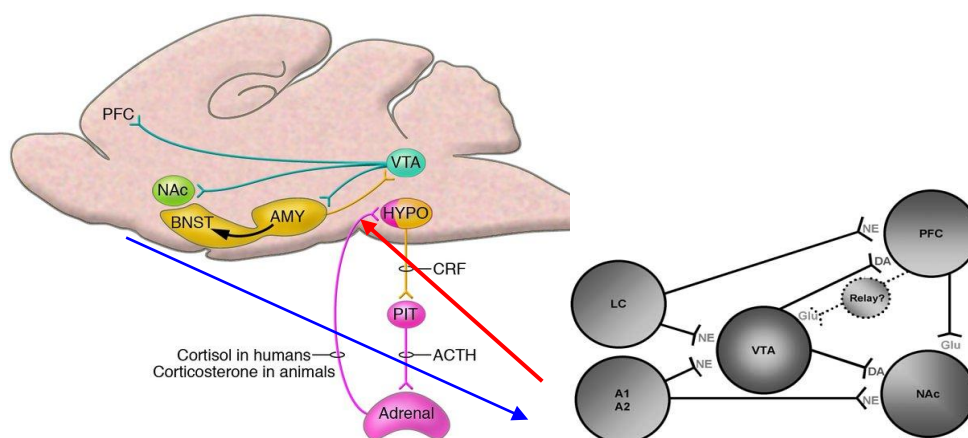


Figura 4. Sistema de CRF hipotalámico y extrahipotalámico, sistema de recompensa y núcleos catecolaminérgicos. Modificada de Cleck y Blendy, 2008

Al inicio de la adicción se produce un aumento de la actividad de los sistemas de recompensa, pero a lo largo del proceso adictivo va disminuyendo la liberación de DA y aumentando la activación del sistema cerebral del estrés y, por tanto, la liberación de sus neurotransmisores (CRF y NA), los cuales son los responsables de los efectos aversivos y negativos que producen las drogas.

2.1.3. Recaídas

Se ha definido la recaída como una búsqueda compulsiva de la droga; la vulnerabilidad a la recaída perdura incluso años después del cese del consumo. Se han descrito diferentes estímulos capaces de inducir la recaída: 1) re-exposición a la droga (Koob y Volkow, 2010), 2) estímulos ambientales asociadas al consumo de drogas (Swendsen y Le Moal, 2011), y 3) situaciones de estrés (Enoch, 2012).

Los efectos de la drogas sobre el cerebro implican variaciones en la plasticidad de estructuras que median el aprendizaje y la memoria, como son la amígdala, el hipocampo y la corteza cerebral. Estas variaciones producen cambios en el comportamiento del adicto y estos cambios están mediados por la memoria asociativa y operacional (Wise, 2004). Un ejemplo de la memoria asociativa es el hecho de que el deseo compulsivo de consumir droga se dispara con la sola exposición a estímulos asociados al consumo, es decir, hay una anticipación al placer (aprendizaje asociativo); por ello, en los tratamientos de deshabituación es importante que los individuos no tengan contacto con situaciones ambientales relacionadas con su adicción.

Actualmente, se sabe que existe una estrecha relación entre estrés y adicción. La exposición tanto a estrés psicológico como fisiológico en cualquier etapa del ciclo de la adicción parece empeorar esta enfermedad, aumentando el comportamiento de búsqueda, la cantidad de droga consumida y las recaídas (Koob y Kreek, 2007). Se ha observado que en animales expuestos a situaciones estresantes aumenta la autoadministración de cocaína (Kosten y cols., 2000). Además se sabe que individuos

con desórdenes psiquiátricos relacionados con el estrés tienen más probabilidades de desarrollar una adicción.

La exposición crónica a sustancias de abuso no sólo modifica los sistemas dopaminérgicos mesocorticolímbicos, sino que también produce alteraciones en los circuitos glutamatérgicos corticales que proyectan al NAc y al VTA (Kalivas y Volkow, 2011). Las modificaciones en los circuitos cortico-estriado-corticales que se producen en los sujetos adictos provoca una disfunción de la PFC, disminuyendo la actividad de la corteza cerebral (encargada de razonar y de la toma de decisiones). En estos sujetos no manda el córtex, sólo el sistema límbico condiciona la conducta; el sujeto se vuelve más instintivo, más centrado en buscar la droga; es incapaz de tomar decisiones equilibradas, sólo pondera la recompensa inmediata, no las consecuencias que va a tener su decisión. Este deseo compulsivo por la búsqueda de la droga lleva al adicto a la recaída.

Por último, los cambios adaptativos que se producen a largo plazo y, concretamente, los relacionados con cambios relativamente estables en la expresión génica mediados por factores de transcripción, podrían contribuir a la aparición de recaídas. Se ha postulado que los cambios en la expresión génica podrían ser los responsables de las alteraciones en la neurotransmisión dopaminérgica y glutamatérgica; así como de los cambios morfológicos (engrosamiento de las espinas dendríticas) en determinados grupos neuronales que presentan los sujetos adictos (Leite-Morris, 2014).

Como se deduce de lo expuesto anteriormente, la adicción es un fenómeno muy complejo que engloba un gran número de cambios adaptativos celulares y moleculares en diferentes núcleos y áreas del SNC. Actualmente, se sabe que estos cambios no sólo ocurren a nivel cerebral sino también a nivel periférico y concretamente a nivel cardíaco.

2.2. CONEXIÓN CEREBRO-CORAZÓN

Los impulsos nerviosos procedentes de la corteza cerebral son integrados en el hipotálamo, fundamentalmente en el PVN, que se comporta como un centro integrador de las funciones tanto vegetativas, como endocrinas y de comportamiento. Una vez integradas en el PVN, las señales se propagan al NTS, el cual a su vez es el principal núcleo integrador de las fibras aferentes sensitivas procedentes de los barorreceptores y quimiorreceptores carotídeos y aórticos. El bulbo raquídeo integra todos los impulsos nerviosos centrales que controlan las funciones cardíacas autónomas. Las neuronas de la porción parvocelular del PVN que sintetizan y liberan CRF modulan la respuesta simpática cardíaca (Kang y cols., 2011). Además, el PVN recibe fibras aferentes procedentes de estructuras límbicas implicadas en el control de la función cardíaca tales como la amígdala, el cortex prefrontal y el septum lateral (Canteras y cols., 1995; Ongur y Price, 1998; Risold y Swanson, 1997) (Figura 5).

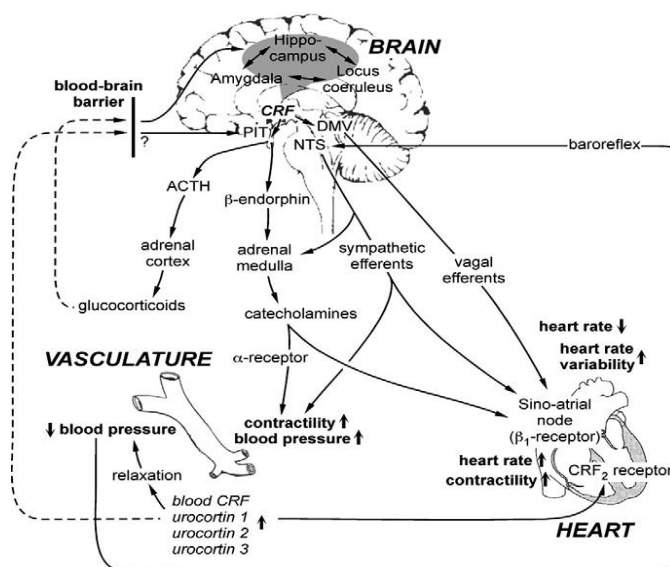


Figura 5. Inervación del corazón. Tomada de Yang y cols., 2010

Estas conexiones entre diferentes núcleos y áreas del SNC y el corazón hablan a favor de una regulación central de la función cardíaca. Si además tenemos en cuenta

que estos circuitos que regulan la función cardíaca sufren cambios adaptativos importantes tras la exposición crónica a drogas, es lógico pensar que estos cambios adaptativos también afecten a las vías de innervación cardíaca, a los neurotransmisores y a los diferentes receptores expresados en tejido cardíaco, tales como receptores adrenérgicos, receptores opioides o receptores para CRF.

Sin embargo, el corazón a lo largo de la historia se ha considerado como un órgano autónomo. Hace unos años se demostró que, junto con la innervación extrínseca (SNC), existe un plexo cardíaco intrínseco distribuido por ambas aurículas hasta los ventrículos derecho e izquierdo. Este plexo, constituido por neuronas cuyos somas están localizados intracardiamente, es bastante más complejo que el sistema autónomo y está formado por diferentes grupos de neuronas que exhiben multitud de sinapsis complejas, con conexiones a todas las regiones del corazón (Pardini y cols., 1987). Con técnicas bioquímicas y farmacológicas se ha demostrado que las neuronas intracardiacas liberan diferentes neurotransmisores: NA, acetilcolina, neuropéptido Y y péptido intestinal vasoactivo (Leger y cols., 1999). Estos resultados sugieren que el plexo cardíaco intrínseco tiene capacidad integradora suficiente para poder funcionar con independencia del SNC, actuando como un pequeño cerebro que regularía y controlaría diferentes funciones cardíacas, entre otras, la frecuencia de descarga del nodo sinoatrial, la actividad del nodo aurículoventricular, las fibras de conducción y la fuerza y frecuencia de contracción cardíaca (Huang y cols., 1993). Además, se ha demostrado que este plexo cardíaco intrínseco contribuye de forma importante al mantenimiento de la función cardíaca en los casos de autotrasplante (Thompson y cols., 1999).

El plexo cardíaco intrínseco, capaz de funcionar de forma independiente, recibe aferencias del sistema nervioso simpático y sistema nervioso parasimpático, que regularían la respuesta de las neuronas intracardiacas a través de diferentes mecanismos de acción todavía no bien establecidos. Este plexo está constituido por diferentes tipos de neuronas, incluyendo neuronas aferentes, interneuronas, circuitos

neuronales locales y neuronas eferentes capaces de generar efectos cardiacos excitatorios e inhibitorios. Además, diferentes estudios (Armour, 1997) han demostrado que el plexo posee receptores muscarínicos, nicotínicos y α y β -adrenérgicos. Este plexo cardiaco intrínseco es capaz de enviar proyecciones a diferentes áreas del SNC relacionadas principalmente con las emociones y con la percepción del dolor (Figura 6). El hecho de que el corazón reciba proyecciones del SNC y a su vez sea capaz de enviar proyecciones al cerebro ha hecho que este órgano recobre una gran importancia como motor independiente e impulsor de cambios cerebrales en determinadas patologías (Rosen, 2012).

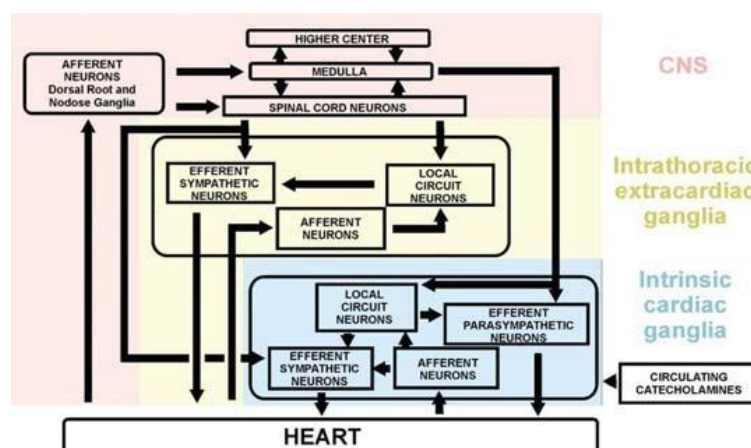


Figura 6. Plexo cardiaco intrínseco. Tomada de Armour, 2008

Si tenemos en cuenta que la regulación de la función cardiaca depende de la coordinación entre la actividad generada por las neuronas localizadas en SNC (inervación cardiaca extrínseca) y las neuronas localizadas en el ganglio cardiaco (inervación cardiaca intrínseca) (Ardell, 1994), los cambios adaptativos cardiacos que se producen tras la administración de drogas podrían ser debidos por una parte a la activación de circuitos neuronales cerebrales y por otra a cambios adaptativos en las neuronas cardiacas intrínsecas, independientes del SNC. Apoyando esta hipótesis, estudios previos de nuestro grupo (Milanés y cols., 2001; González-Cuello y cols., 2004) han demostrado que durante el síndrome de abstinencia a morfina provocado por la administración de naloxona metil yoduro, antagonista cuaternario de los receptores opioides, se produce una hiperactividad noradrenérgica cardiaca y un aumento en la

expresión de c-Fos en diferentes tejidos cardiacos similar a la descrita con naloxona. Si tenemos en cuenta que los antagonistas cuaternarios no cruzan la barrera hematoencefálica, estos datos sugieren que algunos de los cambios adaptativos que se producen durante el síndrome de abstinencia a morfina son debidos a mecanismos periféricos, independientes del SNC.

Actualmente, se conoce que hay una asociación muy importante entre la adicción y los desórdenes cardiacos. Estos desórdenes son de distinta naturaleza, desde una arritmia a un infarto de miocardio, una insuficiencia cardiaca o una muerte súbita (Lippi y cols., 2010). Muchos de los adictos a heroína mueren por muerte súbita asociadas a arritmias (Gavrielatos y Nerantzis, 2011).

2.3. Adicción y cambios adaptativos cardiacos

Como hemos comentado anteriormente, hay una clara relación entre estrés y adicción. Por ello, los estudios sobre los cambios adaptativos cardiacos que ocurren durante la adicción a sustancias de abuso se han centrado en dos sistemas claramente implicados en el estrés: sistema simpático y sistemas de CRF. Ambos se consideran sistemas antirecompensa y juegan un papel fundamental en los efectos aversivos de las drogas y en las recaídas, responsables de que se perpetúen las adicciones.

2.3.1. Sistema simpático

El corazón recibe inervación tanto del sistema nervioso simpático como del parasimpático; la inervación simpática procede del asta intermediolateral de la medula espinal, desde el primer segmento dorsal hasta el segundo o tercero lumbar. De ahí parten las raíces eferentes o fibras preganglionares que conectan con células de los ganglios simpáticos prevertebrales y paravertebrales; desde estos salen las fibras postganglionares, de largo recorrido, que inervan los órganos y tejidos. La distribución de las fibras postganglionares simpáticas depende fundamentalmente de la especie

estudiada, aunque en líneas generales la inervación simpática suele ser más abundante en los nodos, en el tejido de conducción y en las fibras contráctiles, mientras que las fibras postganglionares parasimpáticas se dirigen fundamentalmente a los nodos y, posiblemente, hacia los vasos de la circulación coronaria (Armour, 1996). Junto con los clásicos neurotransmisores NA y acetilcolina, recientemente se ha comprobado la existencia de fibras autónomas no colinérgicas no adrenérgicas (NCNA) que liberan otros neurotransmisores, tales como purinas, serotonina, neuropéptido Y, sustancia P, péptido intestinal vasoactivo, péptidos relacionados con el gen de la calcitonina, óxido nítrico, etc. La liberación de estos neurotransmisores NCNA puede realizarse conjuntamente con los neurotransmisores clásicos acetilcolina y NA, o de forma independiente, produciendo efectos tanto excitatorios como inhibitorios.

Diferentes estudios realizados en animales y en humanos sugieren que en los procesos adictivos se produce una activación de las vías simpáticas cardiacas, uno de los factores responsables de la morbilidad y mortalidad que presentan los adictos. Se ha constatado que la cocaína y otras sustancias de abuso producen una activación del sistema nervioso simpático, lo que conduce a un aumento de NA en la terminal noradrenérgica. La unión de la NA a receptores β -adrenérgicos desencadena la activación de diferentes cascadas intracelulares responsables del aumento de la frecuencia y de la fuerza de contracción cardíaca. La activación de receptores α incrementa la presión arterial. Estos efectos provocan un aumento en la demanda de oxígeno que junto con el bajo aporte de oxígeno ocasionado por la vasoconstricción coronaria, favorece la isquemia y el infarto de miocardio (Schwartz y cols., 2010).

En los adictos a heroína los principales problemas cardiacos se evidencian cuando cesa el consumo o durante el síndrome de abstinencia. Diferentes estudios han demostrado que la exposición crónica a morfina disminuye la actividad simpática, lo que provoca una disminución de la presión arterial y la frecuencia cardíaca. Sin embargo, durante el cese del consumo de heroína se ponen de manifiesto los efectos aversivos de la droga con un incremento de la actividad simpática, evidenciada por un

aumento en las concentraciones de NA en plasma, y en el recambio de NA (Peart y Gross, 2006); paralelamente a este aumento del turnover se ha observado un aumento en la expresión de tirosina hidroxilasa (TH), enzima limitante de la síntesis de catecolaminas (Almela y cols., 2008).

El aumento de la actividad simpática observada en humanos y en roedores adictos a drogas parece ser la responsable de la aparición de arritmias, de necrosis cardíacas y de infartos de miocardio, patologías frecuentes en sujetos adictos (Basso y cols., 2011; Nerantzis y cols., 2011).

El estrés y la adicción producen cambios adaptativos similares en corazón. Cuando el estrés es mantenido, como ocurre durante la abstinencia a drogas, hay un aumento considerable de la actividad simpática junto con altos niveles de cortisol en humanos y corticosterona en ratas. Los glucocorticoides activan los receptores de glucocorticoides presentes en el tejido cardíaco. Estos receptores también podrían estar implicados en los cambios adaptativos cardíacos que aparecen tras el consumo de drogas. Además, esta situación continua de estrés provoca un aumento de las citoquinas proinflamatorias. Así, en pacientes adictos a drogas, se observan reacciones inflamatorias, con infiltraciones de macrófagos alrededor de las zonas necrosadas, dando origen a miocarditis y a otras patologías (Cerretani y cols., 2008; Dettmeyer y cols., 2009).

2.3.2. Análogos del CRF

Mientras que el CRF prácticamente no se expresa en el corazón, las urocortinas (análogos de CRF) se sintetizan en SNC y en músculo cardíaco. La urocortina 1 tiene una afinidad diez veces superior al CRF por el receptor de CRF1, mientras que las urocortina 2 y 3 son potentes agonistas del receptor CRF2 con escaso efecto sobre los receptores de CRF1 (Figura 7). Los receptores para CRF1 y CRF2 se expresan en la musculatura lisa vascular y en el miocardio. Aunque los receptores de CRF1 se

expresan débilmente en situaciones fisiológicas (Kishimoto y cols., 1995), su expresión está regulada al alza en diferentes patologías cardíacas (Yang y cols., 2010). Además, se ha postulado que la activación de los receptores de CRF1 puede contribuir a los cambios adaptativos cardíacos inducidos por situaciones de estrés (Wood y cols., 2012).

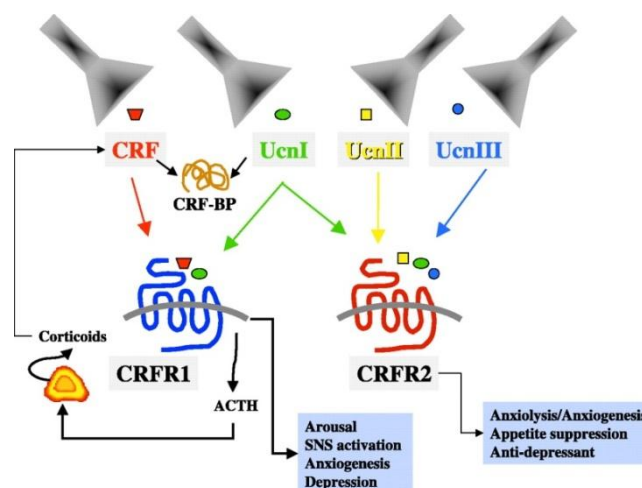


Figura 7. Mecanismo de acción de las urocortinas y del CRF. Tomada de Guillemin, 2005

Numerosos estudios han evaluado el posible papel cardioprotector de las urocortinas. Recientemente, se ha sugerido que las urocortinas pueden jugar un papel importante en la adaptación al estrés. Así, estos péptidos pueden disminuir la frecuencia cardíaca, el inotropismo y las resistencias periféricas; estos efectos han hecho que las urocortinas se propongan como posibles fármacos para el tratamiento de la insuficiencia cardíaca, hipertensión e infarto de miocardio (Ikeda y cols., 2012). Sin embargo, otros autores han observado un aumento en la fuerza de contracción y arritmias tras la administración de urocortinas. Su unión a los receptores de CRF induce la activación de la cascada AMPc vía protein kinasa A (PKA), lo que podría explicar estos efectos excitatorios (Calderón-Sánchez, 2009) Además, se han evidenciado efectos proinflamatorios para las urocortinas con un aumento de la permeabilidad vascular y la degranulación de los mastocitos (Emeto y cols., 2011). Se necesitan estudios complementarios para establecer los efectos beneficiosos o nocivos de estos péptidos.

En cuanto a su posible implicación en la adicción, estudios realizados en SNC han establecido un papel para las urocortinas en el consumo compulsivo de drogas y en las recaídas. Las urocortinas favorecerían los procesos neuroadaptativos tras el consumo de sustancias de abuso (Koob, 2010). Es conocido que tanto la activación de receptores de CRF como de receptores β -adrenérgicos, ambos acoplados a proteínas Gs, produce una activación de la cascada AMPc/PKA. La activación de PKA fosforila a CREB y produce, por tanto, cambios en la expresión de diferentes genes. Se ha comprobado que durante la abstinencia a drogas existe un aumento en la expresión de c-Fos en tejido cardíaco. La distribución de c-Fos en tejido cardíaco no es homogénea, siendo esta expresión mayor en el ventrículo izquierdo que en el ventrículo derecho. Además, se ha comprobado que este aumento en la expresión de c-Fos es debida a mecanismos intrínsecos independientes del SNC (González-Cuello y cols., 2004), lo que sugiere que algunos de los cambios adaptativos cardíacos que se producen en sujetos adictos a drogas son independientes de los cambios adaptativos que ocurren a nivel del SNC.

En base a los datos expuestos anteriormente, podemos afirmar que el corazón de los adictos sufre todas las consecuencias negativas del consumo de drogas: aumento de la actividad simpática, aumento de los sistemas de CRF y exceso de glucocorticoides.

2.3.3. *Proteínas de choque térmico*

Ante un incremento repentino de la temperatura se produce una respuesta celular, perfectamente regulada y conservada a lo largo de la evolución, conocida con el nombre de respuesta al choque térmico (Díez-Fernández y Cascales, 1997). Esta respuesta se caracteriza por un aumento en la síntesis de las proteínas de choque térmico (Hsps), aisladas por primera vez en 1962 tras someter las glándulas salivales de *Drosophila melanogaster* a un incremento de temperatura (Ritossa, 1962). Desde su descubrimiento muchos estudios han puesto de manifiesto la expresión de las Hsps en los distintos tejidos del organismo, no sólo tras un incremento de temperatura, sino

también como mecanismo de defensa ante diversos agentes físicos y químicos que inducen un estrés celular, denominándose también por ello proteínas del estrés (Latchman, 2004).

Pueden diferenciarse dos grupos de proteínas del estrés según el modo de inducción principal: Hsps y proteínas reguladas por glucosa (Grp). Además, las proteínas del estrés se clasifican en diferentes familias en función de su secuencia de aminoácidos y de su peso molecular: bajo peso molecular (15-30 kDa), medio peso molecular (60 kDa, 70 kDa, 90 kDa) y alto peso molecular (100-110 kDa) (Latchman, 2004). La expresión de las proteínas de estrés se regula a nivel transcripcional (Ahn y cols., 2005; Lindquist y Craig, 1988). El incremento de la transcripción requiere la unión de un factor de transcripción, factor de choque térmico (HSF), a una secuencia que se localiza en la región promotora de todos los genes inducibles por el calor (Lis y Wu, 1993). En condiciones normales, el HSF se localiza en el citoplasma celular en forma de monómero, permaneciendo latente sin capacidad para unirse al ADN, pero tras un estímulo, como un incremento de temperatura o la exposición a un agente estresante, es fosforilado por la acción de las MAPK (PK activada por mitógenos) formando trímeros. Esta trimerización es imprescindible para su función, algo que le proporciona la afinidad necesaria para translocarse al núcleo y unirse a la zona del promotor del gen que codifica las distintas Hsps (Guettouche y cols., 2005; Tonkis y Calderwood, 2005). Esto permite que se lleve a cabo la transcripción de los genes hsp, incrementando directamente la síntesis de proteínas Hsps hasta niveles suficientemente altos, los cuales permiten la reparación de las proteínas dañadas y, una vez cumplido su cometido, estas chaperonas se reasocian nuevamente con los HSF, restableciendo su estado inactivo.

La mayoría de las proteínas del estrés se encuentran de forma constitutiva en los distintos tejidos, participando en diversos procesos celulares; mientras que otras se localizan normalmente a baja concentración o en niveles casi indetectables, siendo inducidas rápidamente ante un estrés (Latchman, 2004). Casi todas las Hsps son

capaces de unirse transitoriamente a una gran variedad de proteínas celulares y actuar como chaperonas moleculares, interviniendo tanto en la reparación de proteínas desnaturalizadas tras un daño, como en el equilibrio entre la síntesis, el ensamblaje y la degradación (Wegele y cols., 2004). Tienen una función protectora facilitando el correcto plegamiento de proteínas y previniendo la agregación de proteínas perjudiciales (Kayser y cols., 2013). También participan en diversas funciones que las proteínas desarrollan una vez sintetizadas, facilitando, por ejemplo, su paso a través de las membranas o la actividad de los enzimas (Sharp y cols., 1999).

La familia de las Hsps de bajo peso molecular comparte secuencias homólogas y ciertas propiedades bioquímicas, como la fosforilación y la oligomerización (Haslbeck, 2002). En los humanos, una de las Hsp de bajo peso molecular más importante es la Hsp27 que se expresa fundamentalmente en tejido cardíaco (Kato y cols., 1992).

La regulación postranscripcional de la Hsp27 se realiza por su fosforilación en tres residuos de serina (Ser 15, Ser 78, Ser 82). Esta fosforilación es llevada a cabo fundamentalmente por las proteínas activadas por mitógenos (MK2/3), las cuales son a su vez activadas por p38 o por PK reguladas por señales extracelulares (ERK) (O'Shaughnessy y cols., 2007; Shin y cols., 2009), aunque otras PK como PKD en líneas celulares de páncreas y la PKC pueden fosforilar también a Hsp27, fundamentalmente en el residuo de Ser 82 (Evans y cols., 2008) (Figura 8).

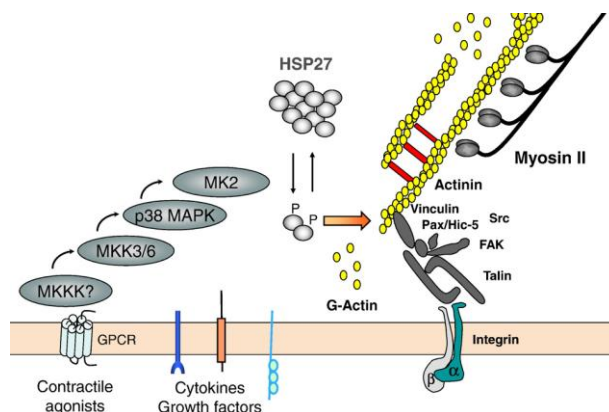


Figura 8. Fosforilación de Hsp27 por las MAPK y estabilización de la actina. Tomada de Slinthone y cols., 2008

Las ERK traducen una amplia gama de estímulos extracelulares en diversas respuestas intracelulares y están implicadas en varios procesos en el SNC, incluyendo la adicción a drogas (Eitan y cols., 2003). Además, se ha descrito que las ERK podrían ser importantes reguladores de la función cardíaca (Michel y cols., 2001) y pueden jugar un importante papel en la secreción neurohormonal (Osterlund y cols., 2011). En este sentido, es conocido que las ERK están implicadas en los cambios adaptativos que se producen en tejido cardíaco durante el síndrome de abstinencia a morfina (Almela y cols., 2007, 2008).

Dentro del posible potencial terapéutico de la Hsp27, cabe destacar su papel cardioprotector, ya que se sintetiza tanto de forma constitutiva como inducible en el tejido cardíaco; este efecto se ha estudiado ampliamente en modelos animales, observándose en ratones que sobre expresan Hsp, un aumento de la supervivencia celular ante un daño letal por isquemia cardíaca, frente aquellos que no sobreexpresan la proteína (Efthymiou y cols., 2004).

La forma no fosforilada de Hsp27 es la responsable de la actividad como chaperona molecular (Guo y Cooper, 2000), participando en la estabilización de los filamentos de actina del citoesqueleto (Cuerrier y cols., 2013), mientras que la forma fosforilada es la responsable de la inhibición de la muerte celular apoptótica inducida por distintos estímulos (Bruey y cols., 2000). La estabilización de los filamentos de actina se produce gracias a los distintos procesos de fosforilación/desfosforilación, que impiden la degradación y despolimerización inducidos por un daño oxidativo o un choque térmico (Valentim y cols., 2003). La inhibición de la muerte celular parece deberse a la interacción directa de Hsp27 con miembros de la maquinaria apoptótica que dan lugar a la supresión de la actividad de la enzima caspasa, una de las principales responsables en la muerte celular. Además, la sobreexpresión de Hsp27, inhibe la liberación del citocromo C y con ello la translocación de moléculas pro-muerte a las mitocondrias (Stetler y cols., 2009)

Se ha sugerido que Hsp27 contribuye al mantenimiento de la integridad de las membranas en diferentes tipos de estrés (Horváth y cols., 2008), protegiendo al corazón a través de sus funciones como: a) chaperona, facilitando la reconstitución del citoesqueleto alterado por el estrés, b) inductora de mecanismos antioxidantes, ya que la producción de radicales libres está involucrada en la generación de lesiones miocárdicas (Bolli, 1992; Lochner y cols., 2009), considerándose como una diana potencial para el tratamiento de la isquemia miocárdica (Zhang y cols., 2006).

Por otra parte, es conocido que la exposición crónica a opioides así como el síndrome de abstinencia provoca una situación severa de estrés que puede desencadenar una degeneración neuronal acompañada de un incremento en la producción de radicales libres de oxígeno, capaces de originar un estrés oxidativo (Oliviera y cols., 2002). Las células responden ante este estrés incrementando la síntesis de diversas proteínas de defensa celular, entre las que cabe destacar las Hsps (Udelsman y cols., 1994).

La situación de estrés provocada durante los procesos adictivos produce la desestabilización de los filamentos de actina, proteína implicada en los procesos de contracción/relajación del músculo cardíaco. Hsp27, en su forma no fosforilada (chaperona), evita la degradación de la actina, estabilizando así los filamentos de esta proteína (Cuerrier y cols., 2013).

Las proteínas esenciales implicadas en el mecanismo de contracción cardíaca son actina, miosina y troponinas (Tn). En 1954, Huxley y Hanson propusieron la "teoría del filamento deslizante", que establece que la contracción muscular resulta del deslizamiento relativo de filamentos de miosina (filamentos gruesos) y filamentos de actina (filamentos delgados). En presencia de Ca^{2+} la Tn se activa para exponer el sitio de unión de actina y miosina. La troponina es un complejo formado por tres proteínas TnT, TnI y TnC, cada una de ellas con una función determinada: TnC, capaz de unir el Ca^{2+} ; TnT se une a la tropomiosina en las fibras musculares manteniendo la unión entre

la actina y la miosina; y la TnI se une a la actina en los miofilamentos delgados con el fin de mantener unido el complejo Tn/tropomiosina, inhibiendo la unión de filamentos de actina y miosina (Kobayashi y cols., 2013) (Figura 9).

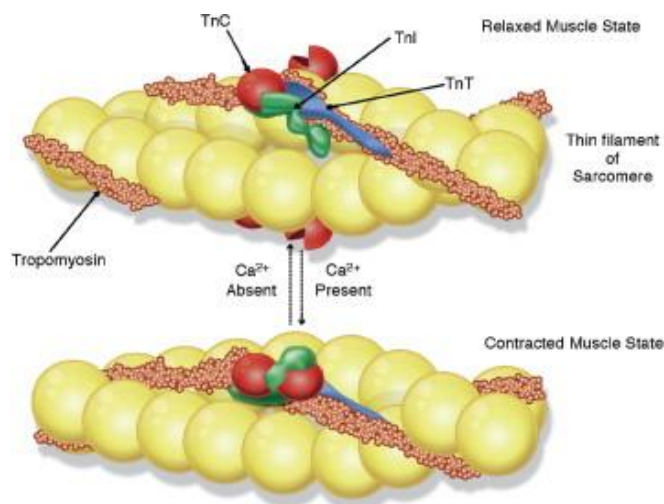


Figura 9. Contracción/relajación cardíaca. Tomada de Shave y cols., 2010

Dos de los principales mecanismos post-transduccionales para la regulación de Hsps son fosforilación y proteólisis (Communal y cols., 2002; Zhang y cols., 2006). La región N-terminal de la TnT cardíaca y la región COOH-terminal de TnI pueden sufrir una proteólisis por μ -calpaína (McDonough y cols., 1999; Di Lisa y cols., 1995). Se ha observado un aumento de actividad de calpaína en ciertas enfermedades cardíacas que cursan con alteraciones en la contractilidad del miocardio, mientras que la administración de inhibidores de calpaína mejoraba la función cardíaca (Greyson y cols., 2008; Mani y cols., 2008).

Por otra parte, se ha descrito que la calpaína podría mediar las alteraciones que se producen durante las situaciones de estrés (Taneike y cols., 2011); en situaciones de estrés la Hsp27 se comporta como un excelente cardioprotector (Efthymiou y cols., 2004; Hollander y cols., 2004; Vander Heidi, 2002) por sus propiedades como chaperona y estabilizadora de la actina (Peart y cols., 2008). Así, se ha demostrado que la isquemia y el choque térmico inducen una translocación de Hsp27 a las bandas

Z en tejido cardiaco (Yoshida y cols., 1999; White y cols., 2006), y se ha sugerido que esta translocación sería la responsable de la estabilización de los miofilamentos, protegiéndoles de la acción de las proteasas y por tanto impidiendo la actividad de la calpaína (Lu y cols., 2008).



Objetivos

Además de los cambios neuroadaptativos que se producen en diferentes núcleos y áreas del SNC durante los procesos adictivos, actualmente se sabe que hay una estrecha relación entre adicción y desórdenes cardiacos. Sin embargo, y a pesar de la relevancia clínica de esta asociación, se conoce muy poco acerca de la pato-fisiología y de los mediadores y mecanismos implicados en esta co-morbilidad. La mayoría de estudios en este sentido se han realizado con cocaína (Aquaro y cols., 2011; Basso y cols., 2011) y se han limitado a la evaluación de factores o vías que se pensaba que podrían mediar las acciones de las drogas (Xu y cols., 2011). Por tanto, el estudio de los mecanismos implicados en los desórdenes cardiacos que producen los procesos adictivos requiere una mayor atención.

Comprender los mecanismos moleculares involucrados en los cambios adaptativos cardiacos tras la exposición a sustancias de abuso constituye un importante reto, debido a que existe todo un complejo sistema de regulación hormonal que se encarga de generar cambios a nivel neuroendocrino, fisiológico, autonómico y conductual, y que permite mantener un estado homeostático. De este complejo sistema hormonal, el CRF, como comentábamos anteriormente, desempeña un papel fundamental en los efectos aversivos de la adicción.

. La heroína produce importantes cambios en los tejidos de conducción cardiacos que llevan a la producción de diferentes tipos de arritmias, responsables de la muerte súbita que acontece en adictos a esta droga (Nerantzis y cols., 2011). sin embargo, existen muy pocos trabajos que evalúen la respuesta cardiaca que se produce tras la adicción a opioides

Por ello, el objetivo general de esta tesis ha sido estudiar las modificaciones cardiacas que se producen durante el tratamiento crónico con morfina y durante el síndrome de abstinencia precipitado por la administración de naloxona e investigar los mecanismos implicados en estos cambios con el fin de desarrollar nuevas dianas terapéuticas.

Nuestros objetivos concretos han sido:

1. Estudiar y establecer algunos de los mecanismos neuroquímicos, celulares y moleculares que se ponen en marcha durante la dependencia de morfina y tras el síndrome de abstinencia. Para ello valoramos la actividad simpática cardiaca, mediante la determinación de la presión arterial media (MAP) y la frecuencia cardiaca (HR), así como los niveles de NA y normetanefrina (NMN), metabolito extraneuronal de NA, para determinar el turnover de NA. Como posibles mecanismos implicados evaluamos: a) la expresión de las dos formas [soluble (S) y de membrana (MB)] de la enzima catecol orto metil transferasa (COMT), una de las enzimas responsables de la producción de NMN y b) la expresión y fosforilación en los residuos de serina 40 y 31 de la proteína TH, enzima limitante de la síntesis de NA.
2. Evaluar el grado de estrés que se produce durante la administración crónica de morfina y durante el síndrome de abstinencia a morfina, valorando la respuesta del eje HHA y la puesta en marcha de mecanismos cardioprotectores. Para ello, se cuantificaron los niveles plasmáticos de ACTH y corticosterona y se valoró la expresión de Hsp27 y la fosforilación de la misma en las Ser 15 y Ser 82.
3. Con el fin de establecer una posible interacción entre la actividad simpática y la respuesta al estrés, valoramos la actividad del eje HHA y la expresión y fosforilación de la Hsp27 en presencia de propranolol, antagonista de los receptores β -adrenérgicos.
4. Para valorar otras cascadas de transducción de señales que podrían estar implicadas en las respuestas al estrés inducido por la precipitación de un síndrome de abstinencia a morfina valoramos la implicación de las ERK en la respuesta del eje HHA (niveles plasmáticos de ACTH y corticosterona), y en la

fosforilación de Hsp27, en la Ser 15 y Ser 82, mediante la administración de SL-327, inhibidor selectivo de la fosforilación de ERK.

5. Una vez establecido el aumento en la expresión de la Hsp27 en diferentes tejidos cardíacos, nuestro siguiente objetivo fue tratar de analizar la respuesta de las proteínas contráctiles del miocardio mediante la determinación de TnT y TnI, así como la expresión de μ -calpaína, enzima encargado de la proteólisis de troponinas. Para investigar un posible nexo de unión entre Hsp27 y troponinas valoramos la expresión de Hsp27, TnT y TnI, así como su co-localización.

6. Con el fin de buscar dianas terapéuticas que pudieran ser de utilidad para el tratamiento de las adicciones, nuestro último objetivo se centró en valorar el papel de los receptores de CRF1 en los signos somáticos observados durante el síndrome de abstinencia a morfina, así como en la actividad del sistema noradrenérgico cardíaco y del eje HHA. También se valoró la implicación de estos receptores en la expresión y fosforilación de Hsp27. Para ello se utilizó el antagonista selectivo de receptores de CRF1 (CP-154,526) y ratones genéticamente deficientes del receptor de CRF1 (CRF^{-/-}, knockout, KO).



Métodos

4.1. Animales

Se han utilizado ratas macho de 220-240 g al inicio del tratamiento de la cepa Sprague-Dawley y ratones macho de la cepa B6,129 CRH^{tklee} de 25-30 g, wild-type (WT, CRF1R+/+) y homocigotos recesivos (KO, CRF1R-/-). Los animales fueron mantenidos en cajas transparentes, con libre acceso a agua y comida, en una habitación a 22±2° C, humedad del 50 ± 10% y con un ciclo de luz/oscuridad de 12 h (8:00-20 h). Los animales fueron manipulados de acuerdo con las normas éticas vigentes (Directiva de la Comunidad Europea de 24 de noviembre de 1986, 86/609/EEC). El estudio fue aprobado por el Comité de Bioética de la Universidad de Murcia (RD/1201/2005).

4.2. Genotipado de ratones

EL ADN para la determinación genética de los ratones se obtuvo de la digestión de una biopsia del extremo final de la cola de los ratones de entre dos y tres semanas de vida, obtenida mediante una cuchilla afilada y con anestesia local con cloruro de etilo. A las muestras obtenidas se les añadió 600 µl de tampón de lisis (Tris-HCl 1M pH 8.5 EDTA 250 mM, 20% SDS, NaCl 1M) conteniendo 100 µg/ml de proteinasa K. A continuación se incubó durante toda la noche a 55 °C en agitación constante. Al día siguiente se centrifugaron las muestras, se extrajo el sobrenadante y se realizó una precipitación con isopropanol. El precipitado se resuspendió en agua estéril (Miller y cols., 1988).

Posteriormente, mediante PCR se amplificaron las secuencias correspondientes al alelo mutado (KO) y normal (WT) para el gen que codifica el receptor de tipo 1 de CRF y se visualizaron las bandas que forman el ADN en un gel de agarosa tras electroforesis. En función de las bandas que aparecen y su tamaño, se clasificaron los animales en tres grupos: Homocigotos dominantes CRF-R1 +/+ o WT, heterocigotos, CRF-R1 +/- o HZ y homocigotos recesivos, CRF-R1 -/- o KO.

4.3 Procedimiento experimental

GRUPOS EXPERIMENTALES

RATA	RATÓN
Placebo s.c. + salino s.c.	WT + salino i.p. + salino s.c.
Placebo s.c + naloxona s.c.	WT + salino i.p + naloxona s.c.
Morfina s.c. + salino s.c.	WT + morfina i.p. + salino s.c.
Morfina s.c.+ naloxona s.c.	WT + morfina i.p. + naloxona s.c.
Placebo s.c. + DMSO i.p + naloxona s.c.	KO + salino i.p. + salino s.c.
Morfina s.c + DMSO i.p + naloxona s.c	KO + salino i.p. + naloxona s.c.
Placebo s.c + SL327 i.p + naloxona s.c	KO + morfina i.p. + salino s.c.
Morfina s.c. + SL327 i.p + naloxona s.c	KO + morfina i.p. + naloxona s.c.
Placebo s.c. + salino i.p + naloxona s.c	
Morfina s.c. + salino i.p + naloxona s.c	
Placebo s.c. + propranolol i.p. + naloxona s.c.	
Morfina s.c + propranolol i.p. + naloxona s.c.	
Placebo s.c + tween 80 i.p. + salino s.c.	
Placebo s.c + tween 80 i.p. + naloxona s.c.	
Placebo s.c + CP-154,526 i.p. + salino s.c	
Placebo s.c + CP-154,526 i.p. + naloxona s.c.	
Morfina s.c + tween 80 i.p. + salino s.c.	
Morfina s.c + tween 80 i.p. + naloxona s.c.	
Morfina s.c + CP-154,526 i.p. + salino s.c.	
Morfina s.c + CP-154,526 i.p. + naloxona s.c.	

4.3.1. Procedimiento experimental en ratas

La dependencia de morfina se indujo mediante la implantación subcutánea de pellets (proporcionados por el Ministerio de Sanidad, Madrid, España) de morfina base (75mg): uno el día 1, dos el día 3 y tres pellets el día 5. En estudios posteriores, la dependencia se indujo el día 1 mediante la implantación s.c de dos pellets de morfina de 75 mg. Se ha demostrado que este último procedimiento produce la concentración plasmática de morfina suficiente para inducir dependencia y un síndrome de abstinencia completo después del tratamiento a corto plazo con antagonistas opioides (Frénois y cols., 2002). La dependencia de morfina se consigue 24 h después de la implantación de pellets de morfina y se mantiene constante durante 15 días (Gold y cols., 1994). Las ratas control recibieron pellets de placebo que contienen el excipiente (lactosa) sin morfina. Para evaluar que la morfina se liberaba correctamente de los pellets, los animales se pesaron a lo largo del tratamiento, ya que es conocido que la administración crónica de morfina induce una disminución en la ganancia de peso corporal debido a la menor ingesta calórica (Berhow y cols., 1995).

El día 6 (en ratas tratadas con 2 pellets de morfina) o el día 8 (6 pellets) se indujo el síndrome de abstinencia mediante la inyección del antagonista naloxona (1 ó 2 mg/kg, s.c.) y se observó si los animales presentaban los siguientes signos de abstinencia: ptosis, castaño de dientes, temblor, piloerección, lagrimeo, rinorrea, salto espontáneo, salivación y diarrea durante un período de 30 min. Además, la pérdida de peso corporal se determinó como la diferencia entre el peso inmediatamente antes de la inyección de naloxona y una segunda determinación efectuada 30, 60, 90 y 120 min más tarde. La pérdida de peso y los demás signos evaluados son indicadores fiables de la abstinencia de opioides en ratas dependientes de morfina.

Para evaluar posibles mecanismos implicados en los cambios adaptivos cardiacos

durante el síndrome de abstinencia, las ratas fueron tratadas con un inhibidor de la fosforilación de ERK, un antagonista de los receptores β -adrenérgicos o un antagonista selectivo de los receptores de CRF1: SL-327 [100 mg/kg, i.p., disuelto en dimetilsulfóxido (DMSO) al 100 %], propranolol (3 mg/kg, i.p.) y CP-154,526 (20 ó 30 mg/kg, i.p. disuelto en tween 80 al 10%), respectivamente. Estas sustancias se administraron 20,30 y 60 min antes de la administración de naloxona. Las dosis utilizadas se basan en la bibliografía y en estudios previos de nuestro grupo.

Los animales fueron sacrificados por decapitación 30, 60, 90 ó 120 min después de la administración de salino o naloxona y se procedió a la apertura del toráx, se separó ventrículo izquierdo y derecho y se almacenó inmediatamente a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ para evaluar diferentes parámetros mediante western-blot (WB) y cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

4.3.2. Procedimiento experimental en ratones

La dependencia de morfina se indujo mediante inyección i.p. de dosis crecientes de morfina (10-60 mg/kg). El grupo control recibió salino. A partir del día 1 y cada 12 h (a las 8:00 y las 20:00) WT y KO fueron tratados de acuerdo con el siguiente protocolo: día 1, 10 mg/kg; día 2, 30 mg/kg; día 3, 50 mg/kg; día 4, 60 mg/kg (una sola inyección por la mañana). El día 4, 1 h después de la última inyección de morfina, se administró salino o naloxona (1 mg/kg, s.c.).

Se cuantificó la ganancia de peso corporal a lo largo del tratamiento con morfina, así como la pérdida de peso durante el síndrome de abstinencia. La pérdida de peso se calculó como la diferencia entre el peso determinado inmediatamente antes de la inyección de salino o naloxona y una segunda determinación efectuada 60 min más tarde.

Los animales se sacrificaron por dislocación cervical 60 min ó 24 h después de la inyección de salino o naloxona. A continuación, se procedió a la apertura del tórax por incisión medioesternal, se diseccionaron ambos ventrículos y se almacenaron inmediatamente a -80 °C, para posteriormente cuantificar los diferentes parámetros evaluados mediante técnicas de WB Y HPLC.

4.4. Variables hemodinámicas

Los animales se anestesiaron con tiopental sódico (40 mg/kg, i.p.), se intubaron y se colocaron en una mesa caliente para mantener la temperatura corporal del animal a 37 °C. Se colocó una cánula de polietileno en la arteria femoral y los catéteres se conectaron a traductores de presión, para medir la MAP y HR. La naloxona (1 ó 2 mg/kg, s.c.) se inyectó tras un periodo de 30 min de estabilización del animal y se midieron ambas variables.

4.5. Radioinmunoensayo (RIA)

Los animales fueron sacrificados 60 min ó 24 h tras la administración de salino o naloxona, la sangre del tronco fue recogida en tubos que contenían EDTA al 5%, manteniéndolos siempre en frío con hielo y fueron posteriormente centrifugados (500 g, 4 °C, 15 min). Una vez centrifugados, se recogió el plasma, fue alicuotado en eppendorf y conservado a -80° C hasta la realización del análisis de ACTH y corticosterona. El análisis se realizó mediante un kit de RIA con anticuerpos específicos.

4.6. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

NA y su metabolito NMN se determinaron por HPLC con detección electroquímica. Cada tejido se pesó, se colocó en un vial de propileno mantenido en frío que contenía 1.5 ml de ácido perclórico (0.1 M) y se homogeneizó con un homogeneizador Polytron-

Type. Los tejidos homogeneizados se centrifugaron (8000 g, 4 °C, 15 min), se retiró el sobrenadante con una jeringa de 1 ml y se filtró a través de un filtro de 0,45 µm (Millipore, Bedford, EE.UU.). El homogeneizado se volvió a centrifugar (6000 g, 4 °C, 20 min) y filtrar en un filtro ultra-free MC 0.2 (Millipore). De cada muestra, se inyectaron 10 µl en una columna de fase reversa C₁₈ (Waters, Milford, MA, EE.UU.). La detección electroquímica de NA y NMN se llevó a cabo con un electrodo de vidrio de carbono fijado a un potencial de 0.65 V con respecto al electrodo de referencia de Ag/AgCl (Waters). La fase móvil consistió en una mezcla de 95 % (v/v) de metanol con agua y acetato de sodio (50 mM), ácido cítrico (20 mM), sulfonato de L-octil-sodio (3.75 mM), di-*n*-butilamina (1 mM) y EDTA (0,135 mM), ajustado a pH 4.3. La velocidad de flujo fue de 0.9 ml/min, y los datos cromatográficos se analizaron mediante un programa informático Millennium 2010 (Millipore). NA y NMN se detectaron simultáneamente por HPLC a unos tiempos de elución de 4.25 y 7.32 min, respectivamente, y se cuantificaron por referencia a las curvas de calibración que se realizaron al principio y al final de cada serie de análisis. Se observaron las relaciones lineales entre la cantidad de inyección estándar y la altura del pico medido. El límite inferior de detección para NA y NMN fue de 100 pg. El contenido de estos metabolitos en ambos ventriculos se expresó como ng/g de peso del tejido.

4.7. Inmunofluorescencia

Las ratas fueron anestesiadas con una dosis subletal de pentobarbital sódico (100 mg/kg, i.p.) 60 min después de la administración de salino o naloxona para determinar la expresión y fosforilación de Hsp 27 en Ser 82. Así mismo se estudió la co-localización de Hsp27 con troponina T y troponina I. Tras la anestesia, las ratas fueron sometidas a perfusión a través de la aorta descendente con 300 ml de tampón fosfato salino (PBS, pH 7.4) seguido de 500 ml de paraformaldehído (4% en PBS, pH 7.4) a 4 °C. Después de la perfusión, se extrajeron los corazones y se post-fijaron en el mismo fijador (paraformaldehído) almacenándose a 4 °C durante toda la noche. Las muestras fueron lavadas con PBS y posteriormente incluidas en bloques de parafina. Se obtuvieron

secciones de 5 μm de espesor mediante microtomo (HM310, Microm, Barcelona, España) y fueron adheridas a portas con solución de poli-L-lisina. A continuación, las secciones se desparafinaron en xileno, se hidrataron en alcoholes decrecientes y se preincubaron durante 10 min en H_2O_2 para bloquear la actividad peroxidasa endógena. Seguidamente, se incubaron en una mezcla que contenía suero de caballo al 2%, Triton-X-100 al 0.3% y azida sódica en PBS, durante 1 h a temperatura ambiente. Los cortes fueron incubados durante toda la noche a 4 °C con los siguientes anticuerpos:

- ✓ Anticuerpo policlonal frente a Hsp27 total (sc-1048; 1:50; Santa Cruz Biothechnology Inc., Texas, EE.UU.).
- ✓ Anticuerpo policlonal frente a Hsp27 fosforilada en Ser82 (2401; 1:100; Cell Signalling Technology, Massachusetts, EE.UU.).
- ✓ Anticuerpo monoclonal frente a troponina T cardiaca (cTnT, ab10214; 1:400; Abcam, Cambridge, Reino Unido).
- ✓ Anticuerpo monoclonal frente a troponina I cardiaca (cTnI, ab19615; 1:500; Abcam).

Posteriormente, las muestras se incubaron con los correspondientes anticuerpos secundarios, durante 4 h:

- ✓ Alexa Fluor 594 anti-IgG de conejo (A-21207; 1:1000; Invitrogen, Life Technologies Corporation; Paisley, Reino Unido).
- ✓ Alexa Fluor 488 anti-IgG de cabra (A-11055; 1:300; Invitrogen).
- ✓ Alexa Fluor 594 anti- IgG de ratón (A-21203; 1:300; Invitrogen).

Las secciones fueron incubadas en 4, 6-diaminino-2-fenilindol (DAPI, 1:50.000 durante 15 min, y se montaron en el reactivo ProLong Gold antifade (Invitrogen).

Para su visualización, las láminas fueron escaneadas con un aumento 1200 X utilizando un escáner SCN400F Leica con BGR ET FILTERCUBE (Leica Microsystems

GmbH, Wetzlar, Alemania). El tiempo de ganancia y exposición utilizada se mantuvo constante para cada grupo experimental. Las imágenes se cargan y se archivan en el sistema habilitado para la web de gestión digital de diapositivas, Imagen Digital Hub de SlidePath (SlidePath, Dublin, Irlanda). Las imágenes fueron capturadas con un aumento de 40 X. Toda la determinación histológica se realizó a ciegas en las secciones del ventrículo izquierdo.

Otras imágenes se obtuvieron utilizando un microscopio confocal Nikon C1 (Nikon 90i, confocal D-Eclipse C1 Tokio, Japón) usando excitación de 408 nm para DAPI, excitación 543 nm para Alexa Fluor 594 y 488 de excitación para Alexa Fluor 488. La luz emitida se detectó en el rango de 450 nm para DAPI, 605 nm para Alexa Fluor 594 y 515/530 para Alexa Fluor 488. Cada canal fue capturado por separado para evitar cruces espectrales.

4.8. Western blot

Las muestras fueron introducidas en viales de polipropileno mantenidos en frío que contenían: PBS 1X, inhibidores de fosfatasa, dodecil sulfato sódico (SDS) (10%) e inhibidores proteolíticos, fueron homogeneizadas en homogenizador Polytron (Kinematica, Suiza; velocidad 3-4) y se introdujeron en un baño de ultrasonidos para ser sonicadas (Selecta, España) durante 30 s. Posteriormente, se centrifugaron (6000 g, 20 min, 4 °C) en centrífuga refrigerada (Beckman, Alemania). El sobrenadante se colocó en tubos Eppendorf y éstos se almacenaron a -80 °C para la posterior determinación de proteínas.

La determinación de la concentración de proteínas totales de cada muestra se realizó siguiendo el método del ácido bicinónico descrito por Wiechelman y cols., (1988) y medida en un espectrofotómetro.

El volumen máximo de muestra que se cargó en cada calle fue de 25 µl. Las

muestras diluidas empleadas en este trabajo, tuvieron una concentración de proteínas de 50 µg por calle. En cada uno de los geles se introdujeron dos controles de proteínas estándar BenchMark™ Prestained (Invitrogen) y Kaleidoscope Prestained Standards (Bio-Rad, USA), con proteínas de pesos moleculares conocidos para tener una referencia correcta a la hora de identificar a nuestra proteína problema. Una vez cargadas todas las muestras en sus respectivas calles, se llevó a cabo una electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE). Posteriormente se realizó la transferencia de proteínas a membranas de fluoruro de polivinildieno (PVDF) mediante una cubeta. Para evitar uniones inespecíficas en la inmunodetección, las membranas fueron bloqueadas durante 1 h con albúmina de suero bovino (BSA) al 1% en tampón tris buffer salino-Tween 20 (TBS-T). A continuación se incubaron las membranas con los siguientes anticuerpos primarios para detectar la proteína de interés:

- ✓ Anticuerpo policlonal frente a Hsp27 total (sc-1048; 1:500; Santa Cruz Biotechnology).
- ✓ Anticuerpo policlonal frente a Hsp27 fosforilada en Ser15 (ab39399; 1:400; Abcam).
- ✓ Anticuerpo policlonal frente a Hsp27 fosforilada en Ser82 (2401; 1:400; Cell Signalling Technology).
- ✓ Anticuerpo monoclonal frente a p-ERK1/2 (sc-7383; 1:1000; Santa Cruz Biotechnology).
- ✓ Anticuerpo monoclonal frente a COMT (AB5873; 1:5000; Chemicon International, USA).
- ✓ Anticuerpo monoclonal frente a cTnT (ab10214; 1:500; Abcam).
- ✓ Anticuerpo monoclonal frente a cTnI (ab19615; 1:500; Abcam).
- ✓ Anticuerpo frente a µ-calpaina (sc-271313; 1:5000; Santa Cruz Biotechnology).
- ✓ Anticuerpo policlonal frente a TH fosforilada en Ser31 (AB5423; 1:500; Millipore).
- ✓ Anticuerpo policlonal frente a TH fosforilada en Ser40 (AB5935; 1:500; Millipore).

Las membranas se dejaron incubando durante toda la noche a 4 °C, a excepción de las membranas incubadas con cTnI y cTnT, que se incubaron durante 5 h. A continuación se realizaron 3 lavados en TBS-T para incubar a continuación con el correspondiente anticuerpo secundario (1:5000), marcado con peroxidasa y contra la especie en la que se ha producido el primario. Se emplearon los siguientes anticuerpos secundarios:

- ✓ Anticuerpo anti-cabra (sc-2350; Santa Cruz Biotechnology).
- ✓ Anticuerpo anti-conejo (sc-2004; Santa Cruz Biotechnology).
- ✓ Anticuerpo anti-ratón (sc-2005; Santa Cruz Biotechnology).

La inmunorreactividad se detectó mediante un kit de quimioluminiscencia/quimiofluorescencia (ECL, Amersham Ibérica, Madrid, España) y se visualizó mediante un escáner de imagen Typhoon 9410.

Como control de carga se usó β -actina, α -tubulina, TH total o ERK total, previo desnudamiento de la membrana.

La cuantificación de las bandas de Hsp27 (27 kDa), Hsp27 fosforilada en Ser15 (27 kDa), Hsp27 fosforilada en Ser82 (27 kDa), p-ERK1/2 (44 y 42 kDa), MB-COMT y S-COMT (30 y 25 kDa), cTnT (36 kDa), cTnI (24 kDa), μ -calpaína (subunidad pequeña 30 kDa, subunidad grande 80 kDa), TH fosforilada en Ser31 (60 kDa), TH fosforilada en Ser40 (60kDa), β -actina (45 kDa), α -tubulina (50 kDa), ERK total (42 kDa) y TH total (60 kDa) se realizó por densitometría mediante un analizador de imagen Alpha Innotech. Los resultados se expresaron como % de cambio de densidad óptica respecto del valor control (definido como el 100% del valor).

4.9. Análisis estadístico

En cada uno de los grupos experimentales se calculó la media aritmética con su

correspondiente error estándar (MEDIA \pm SEM). Las comparaciones entre los diferentes grupos se realizó mediante análisis de varianza (ANOVA) de una, dos , tres vías y ANOVA de medidas repetidas seguido de un test de Newman-Keuls o de Bonferroni. Para comparaciones entre solo dos grupos experimentales, usamos el test de la t de Student no pareada. Se utilizaron los programas SPSS y Graph Prism. Las diferencias con un valor de $p < 0.05$ fueron consideradas significativas.



Resultados y Discusión

Aunque es conocido que la activación de los receptores opioides μ induce un efecto inotrópico negativo, un incremento en la duración del potencial de acción, una disminución de la velocidad de conducción y una disminución en la frecuencia de aparición de infarto de miocardio (Alarcón y cols., 1995; Llobel y Laorden, 1996; Gross y cols., 2007; Peart y cols., 2008), hay muy pocos estudios acerca de los efectos que produce la activación crónica de estos receptores. Se ha demostrado que la exposición crónica a morfina induce efectos cardioprotectores (Peart y Gross, 2006) y numerosos cambios neuroadaptativos en los sistemas noradrenérgicos cardiacos. Así, estudios previos han demostrado que la activación crónica del receptor opioide μ disminuye la actividad simpática (Kiernbaum y cols., 2001, 2002) y las concentraciones plasmáticas de NA en corazón (Kiernbaum y cols., 2002; Rabadán y cols., 1997). En consonancia con estos estudios, nuestros resultados demuestran que durante el tratamiento crónico con morfina se produce una disminución de los niveles basales de MAP y HR, posiblemente debido a la disminución de la actividad simpática descrita anteriormente. Sin embargo, el bloqueo del receptor opioide por naloxona en pacientes adictos a morfina o en animales dependientes de morfina desenmascara los efectos de la administración crónica de morfina produciendo un aumento de la actividad simpática, de las concentraciones plasmáticas de NA (Peart y Gross, 2006), del turnover de NA (Almela y cols., 2008) y de la expresión de TH (Almela y cols., 2009). Los resultados del presente estudio demuestran que durante el síndrome de abstinencia a morfina se produce un aumento de MAP y HR en paralelo con una disminución de NA en tejido cardíaco y un incremento de NMN. Este aumento del metabolito extraneuronal de NA se produce en paralelo con un incremento en las dos isoformas de COMT (MB-COMT y S-COMT) y del turnover de NA. Asimismo, se constata un aumento en la expresión de TH y en la fosforilación de la misma en los residuos de Ser 40 y Ser 31. Es conocido que la fosforilación de TH acelera su actividad y, por tanto, estimula la síntesis del neurotransmisor en las terminaciones noradrenérgicas (Kumer y Vrana, 1996; Dunkley y cols., 2004). Todos estos datos sugieren que la fosforilación de TH puede ser un importante modulador de su actividad y puede estar directamente implicada en la capacidad de las neuronas noradrenérgicas para sintetizar NA lo que contribuiría al aumento del turnover de NA y a los cambios hemodinámicos

observados tras el síndrome de abstinencia a morfina.

Numerosas áreas del SNC están involucradas en la integración entre los cambios de conducta y la respuesta cardiovascular asociada al síndrome de abstinencia a morfina. Así la precipitación del síndrome de abstinencia a morfina por naloxona produce una activación del eje HHA (Laorden y cols., 2002; Cleck y Blendy, 2008; Nuñez y cols., 2009) y cambios adaptativos en el corazón (Rabadán y cols., 1997; Peart y Gross, 2006; Almela y cols., 2008). En consonancia con los estudios anteriores, nuestros resultados demuestran un aumento de ACTH y corticosterona tras la administración de naloxona a ratas dependientes de morfina, esta activación depende de las vías noradrenérgicas procedentes del NTS que proyectan al PVN (Fuertes y cols., 2000; Laorden y cols., 2000; 2002), donde se han descrito la presencia de receptores α y β -adrenérgicos (Leibowitz y cols., 1982). Estos resultados sugieren que durante el síndrome de abstinencia se produce una situación de estrés evidenciada por la activación del eje HHA.

Para evaluar el papel de los receptores β -adrenérgicos en la hiperactividad del eje HHA observada en nuestro estudio utilizamos propranolol, antagonista de los receptores β -adrenérgicos. Este fármaco antagonizó el aumento de ACTH pero no el de corticosterona. Ya que los receptores β -adrenérgicos no parecen mediar el aumento de corticosterona plasmática, investigamos la posible relación entre las ERK y la hiperactividad del eje HHA. Elegimos esta vía de señalización intracelular porque es conocido que durante la dependencia de morfina se produce un aumento en la expresión y activación de ERK en SNC (Narita y cols., 2002; Cao y cols., 2005; Nuñez y cols., 2007, 2008) y en corazón (Almela y cols., 2007, 2008). De forma similar al propranolol, el inhibidor de la fosforilación de ERK (SL327) antagonizó el aumento de los niveles plasmáticos de ACTH pero no de corticosterona. Estos resultados demuestran la implicación de los receptores β -adrenérgicos y de las ERK en la liberación hipofisaria de ACTH y apuntan la posibilidad de que mecanismos independientes de ACTH podrían mediar la respuesta de las capsulas suprarrenales

para adaptarse a distintas situaciones de estrés.

Aunque la presencia de ACTH juega un importante papel en la síntesis y liberación de glucocorticoides numerosos estudios indican que diferentes neuropéptidos, neurotransmisores, opioides, factores de crecimiento celular, citoquinas, etc son capaces de modular la liberación de glucocorticoides con independencia de la ACTH (para revisión véase Bornstein y cols., 2008). Se ha postulado que el SNC es capaz de regular la respuesta de la hipófisis y de las suprarrenales de forma independiente. Por ejemplo lesiones provocadas en el núcleo de la estría terminal son capaces de disminuir la secreción de corticosterona sin provocar cambios en la secreción de ACTH (Choi y cols., 2007). Además, se ha observado que en las ratas que consumen sacarosa o sacarina se produce una disminución de la secreción de corticosterona, sin cambios en la ACTH, lo que sugiere que la secreción de corticosterona puede ser regulada directamente por las vías de recompensa mesocorticolímbicas (Ulrich-Lai y cols., 2007). En conjunto todos estos hallazgos indican que otros factores distintos a la ACTH pueden ser los responsables de la hiperactividad suprarrenal observada durante el síndrome de abstinencia lo que podría tener una relevancia clínica para el tratamiento de las modificaciones neuroendocrinas observadas durante las situaciones de estrés.

Ya que es conocido que el síndrome de abstinencia induce una situación de estrés que se pone de manifiesto por la activación simpática y del eje HHA, y basándonos en estudios previos que han demostrado un aumento de Hsp27 en diferentes regiones cerebrales durante la dependencia de morfina (Sharma y Ali, 2006), en este trabajo evaluamos la expresión y la fosforilación (Ser 15 y 82) de esta proteína en tejidos cardiacos. Estudiamos esta proteína por diferentes razones: 1) porque se expresa de forma constitutiva en tejido cardiaco, 2) porque su expresión se induce rápidamente ante diferentes situaciones de estrés, 3) por su efecto cardioprotector y 4) porque hasta el momento no se ha establecido el papel que desempeña esta proteína en tejido cardiaco tras el consumo de sustancias de abuso. Nuestros resultados demuestran que durante la administración crónica de morfina y durante el síndrome

de abstinencia precipitado por naloxona se produce un aumento de la expresión de Hsp27. Sin embargo, el tratamiento crónico con morfina no induce cambios en la fosforilación de Hsp27 en Ser 15 y 82, mientras que durante el síndrome de abstinencia a morfina se produce un aumento de la fosforilación en ambas serinas. Estos resultados sugieren que durante el síndrome de abstinencia se produce un profundo estrés que puede provocar importantes daños en corazón (Dettmeyer y cols., 2009). Es conocido que la forma no fosforilada de la Hsp27 tiene una función como chaperona, es decir acompaña a otras proteínas estabilizando las formas inestables, actuando por medio de uniones y desuniones controladas, facilitando el ensamblado, la correcta unión a oligómeros, su transporte a otro compartimento celular o la disposición para la degradación (Ammon-Treiber y cols., 2004; Peart y Gross, 2006). Por tanto, el aumento en la expresión de Hsp27 observado en nuestro estudio tendría como finalidad reparar las proteínas con una mala conformación y prevenir el estrés oxidativo (Rogalla y cols., 1999) que se generaría durante la situación de estrés inducida por las drogas. Por otra parte, la fosforilación de Hsp27 lleva a una mayor estabilidad del citoesqueleto, al inhibir la polimerización de la actina (Robinson y cols., 2010), y además tendría propiedades anti-apoptóticas previniendo la muerte celular (Mehelen y cols., 1997). La activación (fosforilación) de Hsp observada durante el síndrome de abstinencia potenciaría la función protectora iniciada por la Hsp durante la administración crónica de morfina.

Está bien establecido que las ERK son capaces de fosforilar diferentes sustratos, incluyendo enzimas, factores de transcripción y proteínas, entre otras, Hsp27 (Robitaille y cols., 2010). Hsp27 es fosforilada por ERK en sus residuos de Ser 15, 78 y 82 (Duverger y cols., 2004; O`shaughnessy y cols., 2007), mientras que la fosforilación en Ser 82 puede ser también inducida por PKC (Evans y cols., 2008). Nuestros resultados demuestran que la administración de SL-327 disminuye la fosforilación de Hsp27 en

Ser 15 y 82 inducida durante el síndrome de abstinencia a morfina, en paralelo

con una disminución de los niveles plasmáticos de ACTH. Además, la administración de propranolol, que reducía los niveles plasmáticos de ACTH, también inhibe la fosforilación de Hsp27 durante el síndrome de abstinencia a morfina, sugiriendo que el bloqueo de los receptores β -adrenérgicos cardiacos atenúa el papel cardioprotector que ejerce la Hsp27. En consonancia con estos resultados, se ha demostrado que la administración de alprenolol, bloqueante β -adrenérgico, atenúa la cardioprotección inducida durante la fase de acondicionamiento isquémico (Lochner y cols., 2009). Estos resultados sugieren que el bloqueo de los receptores β -adrenérgicos en situaciones de estrés puede abolir los mecanismos cardioprotectores endógenos que se ponen en funcionamiento cuando se alteran las condiciones fisiológicas basales. Los resultados del presente trabajo demuestran que el propranolol disminuye las concentraciones plasmáticas de ACTH observadas durante el síndrome de abstinencia. Conjuntamente con el aumento de las concentraciones plasmáticas de ACTH, durante el síndrome de abstinencia a morfina se produce un incremento de los niveles de NA circulantes (Peart y cols., 2007) y del turnover de NA en corazón lo que podría sustentar la hipótesis de que los niveles de catecolaminas periféricas serían un importante mecanismo a tener en cuenta en los efectos excitatorios que produce la precipitación del síndrome de abstinencia sobre el eje HHA. En paralelo con la reducción de ACTH observada tras la administración de propranolol, encontramos una disminución de la fosforilación de Hsp27, lo que sugiere que la activación (fosforilación) de Hsp27 podría estar aumentada al alza por ACTH. En este sentido, se ha demostrado en las cápsulas suprarrenales que el estrés induce un incremento en la expresión de Hsp70 (Blake y cols., 1993; Udelsman y cols., 1994) que fue abolido en ratas hipofisectomizadas (Blake y cols., 1991; 1993). Además, en tumores adrenocorticales con altos niveles de cortisol en plasma, que llevan a una inhibición de la ACTH, se ha observado una disminución de la expresión de Hsp27 y Hsp70 (Pignatelli y cols., 2003). Todos estos resultados sugieren un posible nexo de unión entre la ACTH y las Hsps.

Por otra parte, se ha demostrado que la Hsp27 estabiliza los filamentos de actina,

lo que favorece las propiedades protectoras de esta proteína. Además, se ha demostrado, en corazones de roedores, que algunos tipos de shock producen una translocación de Hsp27 a las bandas Z (Yoshida y cols., 1999; White y cols., 2006). Esta translocación parece ser crucial para la estabilización de los miofilamentos de actina, protegiéndola de su degradación (Lu y cols., 2008). Los resultados del presente trabajo demuestran que durante el síndrome de abstinencia a morfina se produce un incremento en la expresión de cTnT en paralelo con una disminución de la expresión de cTnI y una co-localización entre cTnT y Hsp27. Estos resultados indican que Hsp27 podría proteger a la cTnT de la degradación por proteasas y concretamente de la proteólisis por μ -calpaína, cuya expresión está aumentada durante el síndrome de abstinencia. Es conocido que la μ -calpaína produce una proteólisis de las troponinas con el fin de ajustar la contractilidad muscular a diferentes condiciones de estrés (Taneike y cols, 2011). Las troponinas son responsables de la interacción de la actina con la miosina y, por tanto, de la contracción cardíaca; si las troponinas son degradadas por el aumento de μ -calpaína observado en nuestro estudio, se producirá una alteración importante de los mecanismos de contracción-relajación. Es conocido que cTnT y cTnI son selectivamente degradadas por μ -calpaína pero la fosforilación previa de estas proteínas modifica su sensibilidad a la degradación por proteasas. Así, se ha descrito (Toyo-Oka, 1982) que la fosforilación de cTnI por PKC aumenta la sensibilidad de cTnI a la degradación por μ -calpaína. Estudios previos de nuestro laboratorio (Almela y cols., 2008) han demostrado un aumento en la expresión de PKC durante el síndrome de abstinencia a morfina, por tanto parece posible que el aumento de esta protein kinasa pueda contribuir a la fosforilación de cTnI, incrementando la sensibilidad de esta proteína a la degradación por μ -calpaína. Todos estos resultados llevan a la hipótesis de un nexo de unión entre Hsp27 y cTnT, es posible que Hsp27 evitara la degradación de cTnT por μ -calpaína. El mecanismo por el que se produce esta interacción es desconocido y se necesitan estudios complementarios para aclarar el significado de la misma.

Numerosos estudios han constatado que los sistemas de CRF juegan un

importante papel en la ansiedad y en los efectos aversivos que produce el síndrome de abstinencia (Zorrilla y Koob, 2004; Gallagher y cols., 2008) y que el bloqueo de esta vía atenúa estos efectos (Stinus y cols., 2005). Además, es conocido que CRF y sus análogos aumentan la liberación de NA de las terminales simpáticas y adrenalina de las terminaciones simpáticas y de la médula suprarrenal, respectivamente, jugando un importante papel como mediadores de la función cardiaca (Yang y cols., 2010).

En nuestro trabajo utilizamos CP-154,526, antagonista selectivo del receptor de CRF1 y ratones deficientes del receptor de CRF1 (KO), con el fin de investigar nuevas dianas que palien o prevengan los efectos nocivos de la abstinencia. CP-154,526 disminuyó algunos de los signos típicos del síndrome de abstinencia como la rinorrea, los saltos, la salivación y la diarrea; la pérdida de peso corporal observada durante el síndrome de abstinencia también fue disminuida en presencia del antagonista de los receptores de CRF1 y en ratones KO del receptor de CRF1. Estos resultados están en consonancia con estudios previos de nuestro laboratorio (Navarro-Zaragoza y cols., 2010; García-Carmona y cols., 2011) y otros laboratorios (Iredale y cols., 2000; Lu y cols., 2000). Sin embargo, estos resultados están en desacuerdo con los obtenidos por otros autores (Papaleo y cols., 2007) que describen un aumento de los signos de abstinencia en ratones KO para el receptor de CRF1. Estas discrepancias pueden ser debidas fundamentalmente a los diferentes protocolos utilizados. En estos estudios, el síndrome de abstinencia es espontáneo (cese de la administración de morfina), mientras que en nuestro protocolo el síndrome de abstinencia se precipita por la administración de naloxona, por lo que es difícil comparar ambos resultados.

De acuerdo con resultados previos (Koob y Kreek, 2007; Koob, 2008; Núñez y cols., 2008), durante el síndrome de abstinencia a morfina se produce un aumento de las concentraciones plasmáticas de ACTH y de corticosterona. En consonancia con datos previos de nuestro laboratorio (Navarro-Zaragoza y cols., 2010), CP-154,526 fue capaz de antagonizar el aumento de corticosterona pero no el incremento de ACTH observado tras la administración de naloxona. En ratones KO del receptor de CRF1 se

observó una disminución de los niveles plasmáticos de ACTH y corticosterona aumentados 1 h después de la administración de naloxona. Sin embargo, 24 h después de la precipitación del síndrome de abstinencia, los niveles de ACTH permanecieron aumentados en animales silvestres, mientras que la corticosterona disminuyó a niveles basales. Todos estos resultados apuntan la posibilidad de que mecanismos independientes de ACTH puedan regular la secreción de corticosterona. Como comentábamos anteriormente, numerosos estudios han evidenciado que varios neuropéptidos, neurotransmisores y factores de crecimiento son capaces de modular la liberación de glucocorticoides independientemente de la ACTH hipofisaria (Bornstein y cols., 2008). Además, se ha sugerido que diferentes vías y neurotransmisores implicados en el estrés son capaces de regular la actividad del eje HHA, actuando tanto a nivel de la hipófisis como de la corteza suprarrenal (Choi y cols., 2007). Estos datos corroboran los estudios realizados con propranolol y SL-327 y ahondan en la hipótesis de que diferentes mecanismos regulan la respuesta de la hipófisis y de las capsulas suprarrenales.

Se ha postulado un papel importante para el CRF y los receptores de CRF1 en las alteraciones somáticas, moleculares y endocrinas evidenciadas durante el síndrome de abstinencia a morfina (Papaleo y cols., 2007). Se sabe además que el receptor de CRF1 es necesario para el funcionamiento de las células cromafines de la médula suprarrenal, la destrucción de este receptor cursa con un aumento en la biosíntesis de adrenalina (Yoshida-Hiroi y cols., 2002). Además, la administración de antagonistas del receptor de CRF1 disminuye el incremento en las concentraciones plasmáticas de ACTH observadas en ratas con insuficiencia cardíaca (Kang y cols., 2011). Todos estos resultados junto con los obtenidos en este trabajo evidencian una implicación de los receptores de CRF1 en la regulación del eje HHA.

Recientemente se ha postulado que la enzima COMT tiene un importante papel en la inducción de recompensa (Tunbridge y cols., 2013) y la actividad de esta enzima se ha relacionado con la vulnerabilidad a desarrollar adicción (Li y cols., 2004; Beuten y

cols., 2005). Como comentábamos anteriormente, durante el síndrome de abstinencia a morfina se produce un aumento del turnover de NA, de las dos isoformas de COMT y de la expresión y fosforilación de TH en las serinas 40 y 31 en tejido cardíaco de ratas. Tras la administración del antagonista del receptor de CRF1 se bloquean estos aumentos, a excepción de la fosforilación de TH en serina 40. En los ratones, los efectos son muy similares, aumento del turnover de NA, de las dos isoformas de COMT, de la MAP y HR. En animales KO del receptor de CRF1 también observamos una abolición del aumento del turnover de NA, de la expresión de COMT y de la HR, sin cambios en la MAP. Respecto a este último resultado, es conocido que los efectos de las urocortinas sobre la presión arterial eran inhibidos por un antagonista selectivo del receptor de CRF2, la antisauvagina-30, sugiriendo un papel para los receptores de CRF2 en la regulación de la presión arterial (Mackay y cols., 2003). Todos los resultados comentados anteriormente sugieren que los receptores de CRF1 serían los responsables del aumento de la actividad simpática observado durante el síndrome de abstinencia a morfina precipitado por naloxona.

Es conocido que las ERK fosforilan la TH en serina 31, incrementando su actividad y la síntesis de catecolaminas (Haycock y cols., 1992; Dunkley y cols., 2004). Para estudiar la implicación de los receptores de CRF1 en el aumento de la expresión de ERK observada durante el síndrome de abstinencia a morfina, hemos utilizado CP-154,526. Los resultados de este estudio demuestran que este antagonista disminuye la fosforilación de ERK y por tanto la fosforilación de TH en la serina 31 y el turnover de NA. Estos resultados indican que la activación del receptor de CRF1 puede contribuir a las alteraciones cardíacas observadas durante el síndrome de abstinencia a morfina. En esta línea ha sido descrito que los agonistas del receptor de CRF1 inducen la secreción de catecolaminas y aumentan la actividad de TH, mientras que los agonistas del receptor de CRF2 suprimen la secreción de catecolaminas y la actividad de TH en las células cromafines humanas y de ratas (Dermitzaki y cols., 2007). La disminución de la actividad simpática junto con los efectos colinérgicos que produce el tratamiento con antagonistas del receptor de CRF1, contribuye a los efectos cardioprotectores

observados tras la administración NBI-30775, antagonista de los receptores de CRF1 (Nijsen y cols., 2000; Wood y cols., 2006).

Por último, nuestros resultados demuestran que la situación de estrés, evidenciada por el aumento en la expresión y fosforilación de Hsp27, que provoca el síndrome de abstinencia a morfina fue abolida en ratones KO del receptor de CRF1. En estos animales se antagoniza el aumento en la expresión de Hsp27 y su fosforilación en Ser 82 que estaba incrementada en ratones silvestres dependientes de morfina después de la administración de naloxona. Estos resultados apoyan la idea de que los receptores de CRF1 median los cambios adaptativos cardiacos inducidos por la situación de estrés que acompaña la abstinencia a morfina.

En resumen, los resultados del presente estudio demuestran que durante el síndrome de abstinencia a morfina se producen importantes alteraciones cardiacas que podrían ser responsables de la mayoría de las muertes que se producen en adictos a heroína. Los mecanismos implicados en estos cambios son complejos ya que como hemos comentado anteriormente intervienen distintos mensajeros celulares que interactúan con diferentes vías moleculares. Este trabajo aporta algunos datos que podrían ser de utilidad para establecer nuevas estrategias de prevención y tratamiento, que facilitarán a los pacientes el paso de la adicción a una vida normal, socialmente integrada y productiva.



Conclusiones

1. Durante el síndrome de abstinencia a morfina se produce un aumento de la expresión de las dos isoformas de COMT, que serían las responsables del aumento de NMN y, por tanto, del turnover de NA. Asimismo, observamos un aumento de la expresión y de la fosforilación de TH en Ser 40 y Ser 31. Estos últimos resultados indicarían la puesta en marcha de mecanismos post-transcripcionales que podrían ser los responsables de la activación simpática cardíaca y, por tanto, del aumento de la MAP y HR observadas durante el síndrome de abstinencia a morfina.

2. De acuerdo con resultados previos, nuestro estudio indica que el síndrome de abstinencia a morfina cursa con una hiperactivación del eje HHA, como indica los elevados niveles plasmáticos de ACTH y corticosterona. Propranolol y SL-327 fueron capaces de antagonizar el incremento de ACTH y no de corticosterona lo que demuestra que los receptores β -adrenérgicos y la vía de las ERK estarían implicadas en la actividad del eje HHA. Además, estos resultados claramente sugieren que mecanismos independientes de la ACTH hipofisaria mediarían la respuesta de las suprarrenales durante el síndrome de abstinencia a morfina.

3. La administración crónica de morfina y el síndrome de abstinencia inducen un aumento en la expresión de Hsp27, lo que corrobora que la adicción a opioides provoca un importante estrés celular. Además, durante el síndrome de abstinencia aparece un aumento de la fosforilación de Hsp27 que fue antagonizado por propranolol y SL-327, lo que demuestra que los receptores β -adrenérgicos y la vía de señalización ERK estaría implicada en la fosforilación de Hsp27 y, por tanto, en los efectos cardioprotectores que induce esta proteína.

4. Nuestros resultados demuestran que el síndrome de abstinencia a morfina produce un aumento en la expresión de cTnT y μ -calpaína, en paralelo con una disminución de cTnI. Además, se ha evidenciado una co-localización entre cTnT y Hsp27, lo que sugiere la existencia de algún tipo de interacción entre ambas proteínas.

5. Los resultados del presente estudio demuestran que el bloqueo selectivo de los receptores de CRF1 y la deleción genética de los receptores de CRF1 antagonizan los cambios adaptativos cardiacos, tales como el aumento del turnover de NA, el incremento de MAP y HR, así como el aumento de la expresión y fosforilación de Hsp27 que se produce durante el síndrome de abstinencia a morfina, lo que sugiere que los fármacos antagonistas que tengan como diana el receptor de CRF1 podrían mejorar el estrés y los efectos nocivos cardiacos inducidos durante el síndrome de abstinencia a morfina.



Bibliografía

Ahn SG, Yoon JH, Vaccratsis P (2005) Heat-shock cognate 70 is required for the activation of heat-shock factor 1 in mammalian cells. *Biochem J* 392: 145-152.

Alarcón S, Hernández J, Laorden ML (1995) Electrophysiological effects of opioid receptor selective agonists on guinea-pig papillary muscle. *Reg Pep* 5: 149-154.

Almela P, Milanés MV, Laorden ML (2007) Activation of the ERK signaling pathway contributes to the adaptive changes in rat hearts during naloxone-induced morphine withdrawal. *Br J Pharmacol* 151: 787-797.

Almela P, Milanés MV, Laorden ML (2008) The PKs PKA and ERK 1/2 are involved in phosphorylation of TH at serine 40 and 31 during morphine withdrawal in rat hearts. *Br J Pharmacol* 155: 73-83.

Almela P, Milanés MV, Laorden ML (2009) Tyrosine hydroxylase phosphorylation after naloxone-induced morphine withdrawal in the left ventricle. *Basic Res Cardiol* 104: 366-376.

Ammon-Treiber S, Grecksch G, Stumm R, Riechert U, Tischmeyer H, Reichenauer A, Höllt V (2004) Rapid, transient, and dose-dependent expression of hsp70 messenger RNA in the rat brain after morphine treatment. *Cell Stress Chaperones* 9:182-197.

Aquaro GD, Gabutti A, Meini M, Prontera C, Pasanisi E, Passino C Emdin M, Lombardi M (2011) Silent myocardial damage in cocaine addicts. *Heart* 97: 2056–2062.

Ardell JL (1994) Structure and function of mammalian intrinsic cardiac neurons, in *Neurocardiology* (Armour JA and Ardell JL eds) pp 95-114, Oxford University Press. New-York.

Armour JA (1996) Anatomy and function of peripheral autonomic neurons involved in cardiac regulation, in *Nervous control of the heart* (Shepherd JT and Stephen FV eds) pp 29-47, Harwood Academic Publishers, Massachusetts.

Armour JA (1997) Intrinsic cardiac neurons involved in cardiac regulation possess alpha 1-, alpha 2-, beta 1- and beta 2-adrenoceptors. *Can J Cardiol* 13: 277-284.

Armour JA (2008) Potential clinical relevance of the 'little brain' on the mammalian heart. *Exp Physiol* 93: 165-176.

Basso C, Perazzolo M, Thiene G (2011) Cocaine and the heart: more than just coronary disease. *Heart* 97: 1995–1996.

Berhow MT, Russel DS, Terwilliger RZ, Beitner-Johnson D, Self DW, Lindsay RM (1995) Influence of neurotrophic factors on morphine- and cocaine-induced biochemical changes in the mesolimbic dopamine system. *Neuroscience* 68: 969–979.

Beuten J, Payne TJ, Ma JZ, Li MD (2005) Significant association of catechol-O-methyltransferase (COMT) haplotypes with nicotine dependence in male and female smokers of two ethnic populations. *Neuropsychopharmacology* 31: 675–684.

Blake MJ, Buckley DJ, Buckley AR (1993) Dopaminergic regulation of heat shock protein-70 expression in adrenal gland and aorta. *Endocrinology* 132: 1063-1070.

Blake MJ, Udelsman R, Feulner GJ, Norton DD, Holbrook NJ (1991) Stress-induced heat shock protein 70 expression in adrenal cortex: an adrenocorticotrophic hormone-sensitive, age-dependent response. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 9873-9877.

Bolli R (1992) Myocardial 'stunning' in man. *Circulation* 86:1671-1691.

Bornstein SR, Engeland WC, Ehrhart-Bornstein ME, Herman JP (2008) Dissociation of ACTH and glucocorticoids. *Trends Endocrinol Metab* 19: 175–180.

Bruey JM, Ducasse C, Bonniaud P, Ravagnan I, Susin SA, Diaz L, Gurbuxani S, Arrigo AP, Kroemer G, Solary E, Garrion C (2000) Hsp 27 negatively regulates cell death by interacting with cytochrome c. *Nature Cell Biology*. 2: 645-652.

Calderón-Sánchez E, Delgado C, Ruiz-Hurtado G, Domínguez-Rodríguez A, Cachofeiro V, Rodríguez-Moyano M, Gomez AM, Ordóñez A, Smani T (2009) Urocortin induces positive inotropic effect in rat heart. *Cardiovascular Research* 83: 717–725.

Canteras NS, Simerly RB, Swanson LW (1995) Organization of projections from the medial nucleus of the amygdala: a PHAL study in the rat. *J Comp Neurol* 360: 213-245.

Cao, J.L., HE, JH, Ding, HL, Zeng, YM (2005) Activation of the spinal ERK signalling pathways contributes naloxone-precipitated withdrawal in morphine dependents rats. *Pain* 118: 336-349.

Cerretani D, Riezzo I, Fiaschi AI, Centini F, Giorgi G, D'Errico S, Fiore C, Karch SB, Neri M, Pomara C, Turillazzi E, Fineschi V (2008) Cardiac oxidative stress determination and myocardial morphology after a single ecstasy (MDMA) administration in a rat model. *Int J Legal Med* 122: 461-469.

Choi DC, Furai AR, Evanson NK, Ostrander MM, Ulrich-Lai YM, Herman JP (2007). Bed nucleus of the stria terminalis subregions differentially regulates hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity: implications for the integration of limbic inputs. *J Neurosci* 27: 2025-2034.

Cleck JN, Blendy JA (2008) Making a bad thing worse: adverse effects of stress on drug addiction. *J Clin Invest* 118: 454-461.

Communal C, Sumandea M, de Tombe P, Narula J, Solaro RJ, Hajjar RJ (2002) Functional consequences of caspase activation in cardiac myocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 6252–6256.

Cuerrier CM, Chen YX, Tremblay D, Rayner K, McNulty M, Zhao X, Kennedy CR, de BelleRoche J, Pelling AE, O'Brien ER. (2013) Chronic over-expression of heat shock protein 27 attenuates atherogenesis and enhances plaque remodeling: a combined histological and mechanical assessment of aortic lesions. *PLoS One*. 8:e55867.

Dermitzaki E, Tsatsanis C, Minas, V., Chatzaki E, Charalampopoulos I, Venihaki M, Androulidaki A, Lambropoulou M, Spiess J, Michalodimitrakis E, Gravanis A, Margioris AN (2007) Corticotropin-releasing factor (CRF) and the urocortins differentially regulate catecholamine secretion in human and rat adrenals, in a CRF receptor type-specific manner. *Endocrinology* 148: 1524-1538.

Dettmeyer R, Friedrich K, Schmidt P, Madea B (2009) Heroin-associated myocardial damages. *Conventional immunohistochemical investigations. For Sci Int* 187: 42-46.

Díez-Fernández C, Cascales M (1997) Proteínas del estrés y hepatotoxicidad, en *Bioquímica y fisiopatología del estrés oxidativo* (Cháscales M eds). Real Academia de Farmacia, monografía iv. 157-183.

Di Lisa F, De Tullio R, Salamino F, Barbato R, Melloni E, Siliprandi N, Schiaffino S, Pontremoli S (1995) Specific degradation of troponin T and I by mu-calpain and its modulation by substrate phosphorylation. *Biochem J.* 308: 57-61

Duverger O, Paslaru L, Morange M (2004) HSP25 is involved in two steps of the differentiation of PAM212 keratinocytes. *J Biol Chem.* 279: 10252-10260.

Dunkley P, Bobrovskaya L, Graham Me, von Nagy-Felsobuki EI, Dickson PW (2004) Tyrosine hydroxylase phosphorylation: Regulation and consequences. *J Neurochem* 91: 1025-1043.

Edwards S, Koob GF (2010) Neurobiology of dysregulated motivational systems in drug addiction. *Future Neurol* 5: 393-401.

Efthymiou CA, Mocanu MM, De Bellerocche J, Wells DJ, Latchmann DS, Yellon DM (2004) Heat shock protein 27 protects the heart against myocardial infarction. *Basic Res Cardiol* 99: 392-394.

Eitan S, Bryant CD, Saliminejad N, Yang YC, Vojdani E, Keith D Jr, Polakiewicz R, Evans CJ (2003) Brain region-specific mechanisms for acute morphine-induced mitogen-activated protein kinase modulation and distinct patterns of activation during analgesic tolerance and locomotor sensitization. *J Neurosci* 23: 8360-8369.

Emeto TI, Moxon JV, Rush C, Woodward L, Golledge J (2011) Relevance of urocortins to cardiovascular disease. *J Mol Cell Cardiol* 51: 299-307.

Enoch MA (2012) The influence of gene-environment interactions on the development of alcoholism and drug dependence. *Curr Psychiatry Rep* 14: 150-158.

Evans IM, Britton G, Zarchy IC (2008) Vascular endothelial growth factor induces heat shock protein (HSP)27 serine 82 phosphorylation and endothelial tubule-genesis via protein kinase D and independent of p38 kinase. *Cell Signal* 20: 1375-1384.

Frenois F, Cador M, Caille S, Stinus L, Moine C (2002) Neural correlation of the motivational and somatic components of naloxone-precipitated morphine withdrawal. *Eur J Neurosci* 16: 1377-1389.

Fuertes, G., Laorden, M.L., Milanés, M.V., (2000) Noradrenergic and dopaminergic activity in the hypothalamic paraventricular nucleus after naloxone-induced morphine withdrawal. *Neuroendocrinology* 71: 60–67.

Gallagher JP, Orozco-Cabal LF, Liu J, Shinnick-Gallagher P (2008) Synaptic physiology of central CRH system. *Eur J Pharmacol* 583:215-225.

Gammatopoulos DK (2012) Insights into mechanisms of corticotropin-releasing hormone receptor signal transduction. *Br J Pharmacol* 166: 85-97.

Garcia-Carmona JA, Almela P, Baroja-Mazo A, Milanés MV, Laorden ML (2011) Restricted role of CRF1 receptor for the activity of brainstem catecholaminergic neurons in the negative state of morphine withdrawal. *Psychopharmacology* 220: 379-393.

Gavrielatos G, Nerantzis CE (2011) Post mortem coronary angiographic visualization of a rare sinus node artery anatomical variant. *Hellenic J Cardiol* 52: 84-85.

George O, Le Moal M, Koob GF (2012) Allostasis and addiction: role of the dopamine and corticotropin-releasing factor systems. *Physiol Behav* 106: 58-64.

Gold LH, Stinus L, Inturrisi CE, Koob GF (1994) Prolonged tolerance, dependence, and abstinence following subcutaneous morphine pellet implantation in the rat. *Eur J Pharmacol* 253: 45-51.

González-Cuello A, Milanés MV, Castells MT, Laorden ML (2004) Morphine withdrawal-induced c-fos expression in the heart: a peripheral mechanism. *Eur J Pharmacol* 487: 117-124.

Greyson CR, Schwartz GG, Lu L, Ye S, Helmke S, Xu Y, Ahmad H (2008) Calpain inhibition attenuates right ventricular contractile dysfunction after acute pressure overload. *J Mol Cell Cardiol* 44: 59-68.

Gross ER, Hsu AK, Gross GJ (2007) GS β inhibition and KATP channel opening mediate acute opioid-induced cardioprotection at reperfusion. *Basic Res Cardiol* 102: 341–349.

Guettouche T, Boellmann F, Lane WS, Voellmy R (2005) Analysis of phosphorylation of human heat shock factor 1 in cells experiencing a stress. *BMC Biochem* 11: 6-14.

Guillemin G (2005) Hypothalamic hormones a.k.a. hypothalamic releasing factors. *J Endocrinol* 184: 11-28.

Guo Z, Cooper LF (2000) An N-terminal 33-amino-acid-deletion variante of hsp25 retains oligomerization and functional properties. *Biochem Biophys Res Commun* 270: 183-189.

Haslbeck M (2002) Hsps and their role in the chaperone network. *Cell Moll Life Sci* 59: 1649-1657.

Haycock JW, Ahn NG, Cobbe MH, Krebs EG (1992) ERK1 and ERK2 two microtubule-associated protein 2 kinases, mediate the phosphorylation of tyrosine hydroxylase at serine31-in situ. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 2365-2369.

Hollander JM, Martin JL, Belke DD, Scott BT, Swanson E, Krishnamoorthy V (2004) Overexpression of wild-type heat shock protein 27 and nonphosphorylatable heat shock protein 27 mutant protects against ischemia/reperfusion injury in a transgenic mouse model. *Circulation* 110: 3544-3552.

Horváth I, Multhoff G, Sonnleitner A, Vígth L (2008) Membrane associated stress proteins: more than simply chaperones. *Biochem Biophys Acta* 1778: 1653-1564.

Huang MH, Smith F M, Armour JA (1993) Amino acids modify the activity of canine intrinsic cardiac neurons involved in cardiac regulation. *Am J Physiol* 264: H1257-H1282.

Ikeda K, Fujioka K, Manome Y, Tojo K (2012) Clinical perspectives of urocortin and related agents for the treatment of cardiovascular disease. *Int J Endocrinol* doi 10.1155/2012/198628.

Iredale PA, Alvaro JD, Lee Y, Terwilliger R, Chen YL, Duman RS (2000) Role of corticotropin-releasing factor receptor-1 in opiate withdrawal. *J Neurochem* 74: 199-208.

Kalivas PW, Volkow ND (2011) New medications for drug addiction hiding in glutamatergic neuroplasticity. *Mol Psychiatry* 16: 974-986.

Kang YM, Zhang AQ, Zhao XF, Cardinale JP, Elks C, Cao XM, Zhang ZW, Francis J (2011) Paraventricular nucleus corticotrophin releasing hormone contributes to sympathoexcitation via interaction with neurotransmitters in heart failure. *Basic Res Cardiol* 106: 473-483.

Kato K, Shinohara H, Goto S, Inaguma Y, Morishita R, Asano T (1992) Copurification of small heat shock protein alpha B crystallin from human skeletal muscle. *J Biol Chem* 267: 7718–7725.

Kayser J, Haslbeck M, Dempfle L, Krause M, Grashoff C, Buchner J, Herrmann H, Bausch AR (2013) The Small Heat Shock Protein Hsp27 Affects Assembly Dynamics and Structure of Keratin Intermediate Filament Networks. *Biophys J* 105: 1778-1785.

Kienbaum P, Heuter T, Michel MC, Scherbaum N, Gastpar M, Peters J (2001) Chronic μ -opioid receptor stimulation in humans decreases muscle sympathetic nerve activity. *Circulation* 103: 850-855.

Kienbaum P, Heuter T, Scherbaum N, Gastpar M, Peters J (2002) Chronic μ -opioid receptor stimulation alters cardiovascular regulation in humans: differential effects on muscle sympathetic and heart rate responses to arterial hypotension. *J Cardiovasc Pharmacol* 40: 363-369.

Kishimoto T, Pearse RV II, Lin CR, Rosenfeld MG (1995) A sauvagine/corticotropin-releasing factor receptor expressed in heart and skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 1108-1112.

Kobayashi M, Debold EP, Turner MA, Kobayashi T. (2013) Cardiac muscle activation blunted by a mutation to the regulatory component, troponin T. *Biol Chem.* 288:26335-26349.

Koob GF (2008) A role for brain stress systems in addiction. *Neuron* 59: 11-34.

Koob GF (2009) Brain stress systems in the amygdale and addiction. *Brain Res* 1293: 61-75.

Koob GF (2010) The role of CRF and CRF-related peptides in the dark side of addiction. *Brain Res* 1314: 3-14

Koob GF (2013) Addiction is a reward deficit and stress surfeit disorder. *Front Psychiatry* 4: 1-18.

Koob GF, Kreek MJ (2007) Stress, dysregulation of drug reward pathways, and the transition to drug dependence. *Am J Psychiatry* 164: 1149-1159.

Koob GF, Le Moal M (1997) Drug abuse: hedonic homeostatic dysregulation. *Science* 278: 52-58.

Koob GF, Le Moal M (2008) Neurobiological mechanisms for opponent motivational processes in addiction. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 363: 3113-3123.

Koob GF, Volkow ND (2010) Neurocircuitry of addiction. *Neuropsychopharmacology* 35: 217-238.

Koob GF, Zorrilla EP (2010) Neurobiological mechanisms of addiction: focus on corticotropin-releasing factor. *Curr Opin Investig Drugs* 11: 63-71.

Kosten TA, Miserendino MJD, Kehoe P (2000) Enhanced acquisition of cocaine self-administration in adult rats with neonatal isolation stress experience. *Brain Res* 875: 44-50.

Kumer SC, Vrana KE (1996) Intricate regulation of tyrosine hydroxylase activity and gene expression. *J Neurochem* 67: 443-462.

Laorden ML, Fuertes G, González-CUello A, Milanés MV (2000) Changes in catecholaminergic pathways innervating paraventricular nucleus and pituitary-adrenal axis response during

morphine dependence : implication of alpha (1) and alpha (2) adrenoceptors. *J.Pharmacol Exp Ther* 293:578-584

Laorden ML, Núñez C, Almela P, Milanés MV (2002) Morphine withdrawal induced c-fos expression in the hypothalamic paraventricular nucleus is dependent on the activation of catecholaminergic neurones. *J Neurochem* 83: 132-140.

Latchman DS (2004) Protective effect of heat shock proteins in the nervous system. *Curr Neurovasc Res* 1: 21-27.

Leger J, Croll RP, Smith FM (1999) Regional distribution and extrinsic innervation of intrinsic cardiac neurons in the guinea pig. *J Comp Neur* 407: 303-317.

Leibowitz SF, Jhanwar-Uniyal M, Dvorkin, Makman MH (1982) Distribution of α -adrenergic, β -adrenergic and dopaminergic receptors in discrete hypothalamic areas of rat. *Brain Res* 233: 97-101.

Leite-Morris KA, Kobrin KL, Guy MD, Young AJ, Heinrichs SC, Kaplan GB (2014) Extinction of opiate reward reduces dendritic arborization and c-Fos expression in the nucleus accumbens core. *Behav Brain Res* 4328: 790-800.

Li T, Chen CK, Hu X, Ball D, Lin SK, Chen W (2004) Association analysis of the DRD4 and COMT genes in methamphetamine abuse. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 129: 120-124.

Lindquist S, Craig EA (1988) The heat-shock proteins. *Annu Rev Genet* 22: 631-677.

Lippi G, Plebani M, Cervellin G (2010) Cocaine in acute myocardial infarction. *Adv Clin Chem* 51: 53-70.

Lis J, Wu C (1993) Protein traffic on the heat shock promoter: parking, stalling, and trucking along. *Cell* 74: 1-4.

Llobel F, Laorden ML (1996) Effects of morphine on atrial preparations obtained from nonfailing and failing human hearts. *Br J Anaesth* 76: 106-110.

Lochner A, Marais E, Genade S, Huisamen B, Dutoit EF, Moolman JA (2009) Protection of the ischaemic heart: investigations into the phenomenon of ischaemic preconditioning. *Cardiovasc J Afr* 20: 43-51.

Lu XY, Chen L, Cai XL, Yang HT (2008) Overexpression of heat shock protein 27 protects against ischaemia/reperfusion-induced cardiac dysfunction via stabilization of troponin I and T. *Cardiovasc Res* 79: 500-508.

Lu L, Liu D, Geng X, Ma L (2000) Differential roles of corticotropin-releasing factor receptor subtypes 1 and 2 in opiate withdrawal and in relapse to opiate dependence. *Eur J Neurosci* 12: 4398-4404.

Mackay KB, Stiefel TH, Ling N, Foster AC (2003) Effects of a selective agonist of CRF(2) receptors on cardiovascular function in the rat. *Eur J Pharmacol* 469: 111-115.

Mani SK, Shiraishi H, Balasubramanian S, Yamane K, Chellaiah M, Cooper G, Banik N, Zile MR, Kuppuswamy D (2008) In vivo administration of calpeptin attenuates calpain activation and cardiomyocyte loss in pressure-overloaded feline myocardium. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 295: 314-326.

McDonough JL, Arrell DK, Van Eyk JE (1999) Troponin I degradation and covalent complex formation accompanies myocardial ischemia/reperfusion injury. *Cir Res* 84: 9-20.

Mehelen P, Hickey E, Weber IA, Arrigo AP. (1997) Large unphosphorylated aggregates as the active form of hsp27 which controls intracellular reactive oxygen species and glutathione levels and generates a protection against TNFalpha in NIH-3T3-ras cells. *Biochem Biophys Res Commun* 241: 187-192.

Michel MC, Li Y, Heusch G (2001) Mitogen-activated protein kinases in the heart. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 363: 245-266.

Milanés MV, Martínez MD, González-Cuello A, Laorden ML. (2001) Evidence for a peripheral mechanism in cardiac opioid withdrawal. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 364: 193-198.

Miller SA, Dykes DD, Polesky HF (1988) A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 16: 1215-1220.

Narita, M., Ioka, M., Suzuki, M., Narita, M., Suzuki T. (2002) Effect of repeated administration of morphine on the activity of extracellular signal regulated kinase in the mouse brain. *Neurosci Lett.* 324: 97-100.

Navarro-Zaragoza J, Núñez C, Laorden ML, Milanés MV (2010) Effects of corticotropin-releasing factor receptor-1 antagonists on the brain stress system responses to morphine withdrawal. *Mol Pharmacol* 77: 864-873.

Nerantzis CE, Koulouris SN, Marianou SK, Pastromas SC, Koutsaftis PN, Agapitos EB (2011) Histologic findings of the sinus node and the perinodal area in street heroin addicts, victims of sudden unexpected death. *J Forensic Sci* 56: 645-648.

Nijssen MJ, Croiset G, Stam R, Bruinjnzeel A, Diamant M, de Wied D (2000) The role of the CRH type 1 receptor in autonomic responses to corticotropin-releasing hormone in the rat. *Neuropsychopharmacology* 22: 388-399.

Núñez, C, Foldes, A, Laorden ML, Milanés MV, Kovács KJ (2007) Activation of stress-related hypothalamic neuropeptide gene expression during morphine withdrawal. *J Neurochem* 101: 1060-1071.

Núñez C, Castells, MT., Laorden, ML, Milanés, MV (2008) Regulation of extracellular signal-regulated kinases (ERKs) by naloxone-induced morphine withdrawal in the brain stress system. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 378: 407-420.

Núñez C, Földes A, Pérez-Flores D, García-Borrón JC, Laorden ML, Kovács KJ, Milanés MV (2009) Elevated glucocorticoid levels are responsible for induction of tyrosine hydroxylase mRNA expression, phosphorylation, and enzyme activity in the nucleus of the solitary tract during morphine withdrawal. *Endocrinology* 150: 3118-3127.

Oliviera MT, Rego AC, Morgadinho MT, Macedo TR, Oliveira CR (2002) Toxic effects of opioide and stimulant drugs on undifferentiated PC12 cells. *Ann NY Acad Sci* 965: 487-496.

Ongur D, Price JL (1998) Prefrontal cortical projections to the hypothalamus in macaque monkeys. *J Comp Neurol* 401: 480-505.

O'Shaughnessy RF, Welti JC, Cooke JC, Avilion AA, Monks B, Birnbaum MJ, Byrne C (2007) AKT-dependent HspB1 (Hsp27) activity in epidermal differentiation. *J Biol Chem* 282: 17297-17305.

Osterlund CD, Jarvis E, Chadayammuri A, Unnithan R, Weiser MJ, Spencer RL (2011) Tonic, but not phasic corticosterone constrains stress activated extracellular-regulated-kinase 1/2 immunoreactivity within the hypothalamic paraventricular nucleus. *J Neuroendocrinol* 23: 1241-1251.

Papaleo, F, Kitchener, P, Contarino, A (2007) Disruption of the CRF/CRF1 receptor stress system exacerbates the somatic signs of opiate withdrawal. *Neuron* 53: 577-589.

Pardini BJ, Patel KP, Schimid PG, Lund DD (1987) Localization, distribution and projections of intracardiac ganglion cells in the rat. *J Auton Nerv Syst* 20: 91-101.

Peart JN, Gross GJ (2006) Cardioprotective effects of acute and chronic opioid treatment is mediated via different signalling pathways. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 291: H1746-H1753.

Peart JN, Gross ER, Headrick JP, Gross GJ (2007) Impaired p38 MAPK/HSP27 signaling underlies aging-related failure in opioid-mediated cardioprotection. *J Mol Cell Cardiol* 42: 972-980.

Peart JN, Gross ER, Reichelt ME, Hsu A, Headrick JP, Gross GJ (2008) Activation of kappaopioid receptors at reperfusion affords cardioprotection in both rat and mouse hearts. *Basic Res Cardiol* 103: 454-63.

Pignatelli D, Ferreira J, Soares P, Costa MJ, Magalhaes MC (2003) Immunohistochemical study of heat shock protein 27, 60 and 70 in the normal human adrenal and in adrenal tumors with suppressed ACTH production. *Microsc Res Tech* 61: 315-323.

Rabadán JV, Milanés MV, Laorden ML (1997) Effects of chronic morphine treatment on catecholamines content and mechanical response in the rat heart. *J Pharmacol Exp Ther* 280: 32-37.

Risold PY, Swanson LW (1997) Connections of the rat lateral septal complex. *Brain Res Brain Res Rev* 24: 115-195.

Ritossa F (1962) A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in drosophila. *Experientia* 17: 571-573

Robitaille H, Simard-Blisson C, Larouche D, Tanguay RM, Blouin R., Germain, L (2010) The small heat-shock protein Hsp27 undergoes ERK-dependent phosphorylation and redistribution to the cytoskeleton in response to dual leucine zipper-bearing kinase expression. *J Invest Dermatol* 130: 74-85.

Robinson AA, Dunn MJ, McCormack A, dos Remedios C, Rose ML (2010) Protective effect of phosphorylated Hsp27 in coronary arteries through actin stabilization. *J Mol Cell Cardiol* 49:370-379.

Rogalla T, Ehrnsperger M, Preville X, Kotlyarov A, Lutsch G, Ducasse C, Paul C, Wieske M, Arrigo AP, Buchner J, Gaestel M (1999) Regulation of Hsp27 oligomerization, chaperone function, and protective activity against oxidative stress/tumor necrosis factor alpha by phosphorylation. *J Biol Chem* 274: 18947-18956.

Rosen SD (2012) From heart to brain: The genesis and processing of cardiac pain. *Can J Cardiol* 28: S7-S19.

Schwartz BG, Rezkalla S, Kloner R (2010) Cardiovascular effect of cocaine. *Circulation* 122: 2558-2569.

Sharma HS, Ali SF (2006) Alterations in blood-brain barrier function by morphine and methamphetamine. *Ann NY Acad Sci* 1074: 198-224.

Sharp FR, Massa, SM, y Swanson RA (1999) Heat-shock protein protection. *Trends Neurosci* 22: 97-99.

Shave PhD, Aaron Baggish MD , Keith George, PhD; Malissa Wood MD; Jurgen Scharhag MD Gregory Whyte, PhD[†]; David Gaze, PhD Paul D. Thompson, MD (2010) Exercise-Induced Cardiac Troponin Elevation Evidence, Mechanisms, and Implications *J Am Coll Cardiol* 56:169-176

Shin JK, Jeong YT, Jo HCH, Kang MY, Chang IS, Baek JCH, Park JK, Lee SA, Lee JH, Choi WS, Paik WY (2009) Increased interaction between heat shock protein 27 and mitogen-activated protein kinase (p38 and extracellular signal-regulated kinase) in pre-eclamptic placentas. *J Obstet Gynaecol Res* 35: 888-894.

Slinthone S, Tyagim, Gerthoffer WT (2008) Small heat shock proteins in smooth muscle. *Pharmacol Ther* 119: 44-54.

Stetler RA, Gao Y, Signore AP, Cao G, Chen J (2009) HSP27: mechanisms of cellular protection against neuronal injury. *Curr Mol Med* 9: 863-872.

Stinus L, Cador M, Zorrilla EP, Koob GF. (2005) Buprenorphine and a CRF1 antagonist block the acquisition of opiate withdrawal-induced conditioned place aversion in rats. *Neuropsychopharmacology* 30: 90-98.

Swendsen J, Le Moal M (2011) Flaws of drug instrumentalization. *Behav Brain Sci* 34: 323-324.

Takahashi K (2012) Distribution of urocortins and corticotropin-releasing factor receptors in the cardiovascular system. *Int J Endocrinol* 2012: 1-10.

Taneike M, Mizote I, Morita T, Watanabe T, Hikoso S, Yamaguchi O, Takeda T, Oka T, Tamai T, Oyabu J, Murakawa T, Nakayama H, Nishida K, Takeda J, Mochizuki N (2011) Calpain protects the heart from hemodynamic stress. *J Biol Chem* 286: 32170-32177.

Thompson GW, Ardell JL, Murphy DA, Sangalang VE, Stevenson R, MaCraty R, Armour JA (1999) Neural control of the autotransplanted heart. *FASEB J* 13: A446-A-450.

Tonkiss J, Calderwood SK (2005) Regulation of heat shock gene transcription in neuronal cells. *Int J Hyperthermia* 21: 433-44.

Toyo-Oka T (1982) Phosphorylation with cyclic adenosine 3':5' monophosphate-dependent protein kinase renders bovine cardiac troponin sensitive to the degradation by calcium-activated neutral protease. *Biochem Biophys Res Commun* 107: 44-50.

Tunbridge EM, Huber A, Farrell SM, Stumpenhorst K, Harrison PJ, Walton ME (2013) The role of catecho-o-methyltransferase in reward processing and addiction. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 11: 306-323.

Udelsman R, Holbrook NJ (1994) Endocrine and molecular responses to surgical stress. *Curr Probl Surg* 31: 653-720.

Ulrich-Lai YM, Ostrander MM, Thomas IM, Packard BA, Furay AR, Dolgas CM, Van Hooren DC, Figueiredo HF, Mueller NK, Choi DC, Herman, JP (2007) Daily limited access to sweetened drink attenuates hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis stress responses. *Endocrinology* 148: 1823-1834.

Valentim LM, Rodnight R, Geyer AB, Horn AP, Tavares, A, Cimarosti H, Netto CA, Salbego CG (2003) Changes in heat shock protein 27 phosphorylation and immunoccontent in response to preconditioning to oxygen and glucose deprivation in organotypic hippocampal cultures. *Neuroscience* 118: 379-386.

Vander Heide RS (2002) Increased expression of HSP27 protects canine myocytes from simulated ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 282: H935-H941.

Wegele H, Müller L, Buchner J (2004) Hsp70 and Hsp90 a relay team for protein folding. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 151: 1-44.

Weinshenker D, Schroeder JP (2007) There and back again: a tale of norepinephrine and drug addiction. *Neuropsychopharmacology* 32: 1433-1451.

White MY, Hambly BD, Jeremy RW, Cordwell SJ (2006) Ischemia-specific phosphorylation and myofilament translocation of heat shock protein 27 precede alpha Bcrystallin and occurs independently of reactive oxygen species in rabbit myocardium. *J Mol Cell Cardiol* 40: 761-774.

Wiechelman KJ, Braund RD, Fitzpatrick JD (1988) Investigation of the bicinchoninic acid protein assay: Identification of the groups responsible for colour formation. *Anal Biochem* 175: 231-237.

Wise RA (2004) Dopamine, learning and motivation. *Nat Rev Neurosci* 5: 483-49.

Wood SK, Verhoeven RE, Savit AZ, Rice KC, Fischbach PS, Woods JH (2006) Facilitation of cardiac vagal activity by CRF-R1 antagonists during swim stress in rats. *Neuropsychopharmacology* 3: 12580-12590.

Wood SK, McFadden KV, Grigoriadis DG, Bhatnagar S, Valentino RJ (2012) Depressive and cardiovascular disease comorbidity in a rat model of social stress: a putative role for corticotropin-releasing factor. *Psychopharmacology* 222: 325-336.

Yang LZ, Tovote P, Rayner M, Kockskämper J, Pieske B, Spiess J (2010) Corticotropin-releasing factor receptors and urocortins, links between the brain and the heart. *Eur J Pharmacol* 632: 1-6.

Yoshida-Hiroi M, Bradbury MJ, Eisenhofer G, Hiroi N, Vale WW, Novotny GE, Hartwig HG, Scherbaum WA, Bornstein SR (2002) Chromaffin cell function and structure is impaired in corticotropin-releasing hormone receptor type 1-null mice. *Mol Psychiatry* 7: 967-974.

Yoshida K, Aki T, Harada K, Shama KM, Kamoda Y, Suzuki A, Ohno S (1999) Translocation of HSP27 and MKBP in ischemic heart. *Cell Struct Funct* 24: 181-185.

Xu J, Tian W, Ma X, Guo J, Shi Q, Jin Y (2011) The molecular mechanism underlying morphine-induced Akt activation: roles of protein phosphatases and reactive oxygen species. *Cell Biochem Biophys* 61: 303-311.

Zhang Z, Biesiadecki BJ, Jin J (2006) Selective deletion of the NH₂-terminal variable region of cardiac troponin T in ischemia reperfusion by myofibril-associated mu-calpain cleavage. *Biochemistry* 45: 11681-11694.

Zorrilla, E.P., Koob, G.F (2004) The therapeutic potential of CRF1 antagonists for anxiety. *Expert Opin Investig Drugs* 13: 799-828.