



UNIVERSIDAD DE MURCIA

FACULTAD DE MEDICINA

Mecanismos neurobiológicos implicados en la preferencia de plaza a morfina y en la aversión a naloxona. Papel de los receptores de CRF1

Juan Antonio García Carmona

2015

UNIVERSIDAD DE
MURCIA



Mecanismos neurobiológicos implicados en la preferencia de plaza a morfina y en la aversión a naloxona. Papel de los receptores de CRF1

Neurobiological mechanisms implicated in place preference to morphine and aversion to naloxone. Role of de CRF1 receptor

**Memoria presentada para el Grado de Doctor
Mención Doctor Internacional**
Memory for the degree of philosophæ doctor (PhD)
International Doctor Honours

2015

JUAN ANTONIO GARCÍA-CARMONA

AGRADECIMIENTOS

A mi directora, Luisi, por su paciencia y dedicación en estos cinco años. Su apoyo y cariño fueron fundamentales para la realización de esta tesis. Como bien me ha dicho siempre, *“Olivica comía, huesecico al suelo”*, es decir, las cosas poco a poco y dejándolas acabadas.

Agradezco especialmente los buenos momentos con Juani, Elena y Carmen y el apoyo del resto del equipo, Javi, Pilar, Marivi y Cristina.

My sincere thanks to Alexis Bailey for accepting me in his laboratory and his friendship, as well as, to Polymnia and Panos for their friendship. I had a really nice experience in Guildford.

Agradezco la ayuda y colaboración en los distintos trabajos y experiencias a Noemí A, Paola R, Alberto BM, Daymi C, Ana J y especialmente a Paca Sevilla.

La tesis la dedico especialmente a mi familia, mis padres y mi abuelo, porque me lo ha dado todo sin tener nada.

Al meu primer mestre, gràcies per haver-me ensenyat a llegir i escriure, va ser un primer pas per arribar al present. Gràcies Fabià y Jose Luis per la vostra amistat.

A mis primeros maestros en ciencia, Ángela S, Fernando F y mi amigo Javi Céspedes, aún recuerdo aquellos meses haciendo química.

A mis amigos Roberto, Carlos G, Carlos P, Jesús A, Alberto y Jaime porque 25 años de amistad merecen su reconocimiento. Soy afortunado al contar con vosotros.

A Paola porque esta tesis también es suya al acompañarme al lab festivos, domingos y algunos experimentos hasta la madrugada. Nada sería igual sin ti, 2328. Gracias por su ánimo y apoyo a Juan Antonio, Rosa, Sofía, Rubén y a las abuelas Isabel y Rosa.

La tesis doctoral titulada “Mecanismos neurobiológicos implicados en la preferencia de plaza a morfina y en la aversión a naloxona. Papel de los receptores de CRF1” es un compendio de trabajos previamente publicados. Los artículos que constituyen el cuerpo de esta tesis doctoral son:

- 1- Brain stress system response after morphine-conditioned place preference. **García-Carmona JA**, Milanés MV, Laorden ML. Int J Neuropsychopharmacology 2013, 10: 1-13. doi: 10.1017/S1461145713000588
Factor de impacto: 5,27
<http://ijnp.oxfordjournals.org/content/16/9/1999.long>
- 2- CP-154526 modifies CREB phosphorylation and Thioredoxin-1 expression in dentate gyrus following morphine-induced conditioned place preference. **García-Carmona JA**, Camejo D, Almela P, Jimenez A, Milanés MV, Sevilla F, Laorden ML. Plos One, 2015, 10(8):e0136164. doi: 10.1371/journal.pone.0136164
Factor de impacto: 3,58.
<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0136164>
- 3- Role of brainstem catecholaminergic neurons in the negative state of morphine withdrawal in CRF1R-deficient mice. **García-Carmona JA**, Almela P, Baroja-Mazo A, Milanés MV, Laorden ML. Psychopharmacology 2012, 220: 379-393. doi: 10.1007/s00213-011-2478-y
Factor de impacto: 4,08
<http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00213-011-2478-y>
- 4- Sex differences between CRF1 receptor deficient mice following naloxone-precipitated morphine withdrawal in a conditioned place aversion paradigm: Implication of HPA axis. **García-Carmona JA**, Baroja-Mazo A, Milanés MV, Laorden ML. Plos One 2015, 10(4):e0121125. doi: 10.1371/journal.pone.0121125
Factor de impacto: 3,58.
<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0121125>
- 5- Sympathetic activity induced by naloxone-precipitated morphine withdrawal is blocked in genetically engineered mice lacking functional CRF1 receptor. **García-Carmona JA**, Martínez-Laorden E, Milanés MV, Laorden ML. Toxicol Appl Pharmacol 2015, 283: 42-49. doi: 10.1016/j.taap
Factor de impacto: 3,98.
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0041008X15000058>

ARTÍCULOS RELACIONADOS CON LA TESIS DOCTORAL:

Accumbal dopamine, noradrenaline and serotonin activity after naloxone-conditioned place aversion in morphine-dependent mice.

Gómez-Milanés I, Almela P, **García-Carmona JA**, García-Gutiérrez MS, Aracil-Fernández A, Manzanares J, Milanés MV, Laorden ML
Neurochem Int 2012, 61: 433-440; doi: 10.1016/j.neuint

Role of CRFR1 on the catecholaminergic response to morphine withdrawal in the nucleus accumbens (NAc).

Almela P, Navarro-Zaragoza J, **García-Carmona JA**, Mora L, Hidalgo JM, Milanés MV, Laorden ML
Plos One 2012, 7(10):e47089, doi: 10.1371/journal.pone

Crosstalk between G protein coupled receptors (GPCRs) and tyrosine kinase receptor (TXR) in the heart after morphine withdrawal.

Almela P, **García-Carmona JA**, Martínez-Laorden E, Milanés MV, Laorden ML
Front Neurosci 2013, 4: 164; doi: 10.3389/fphar.2013.00164

Corticotropin-releasing factor (CRF) receptor-1 is involved in cardiac noradrenergic activity observed during naloxone-precipitated morphine withdrawal.

Martínez-Laorden ML, **García-Carmona JA**, Baroja-Mazo A, Romecín P, Atucha NM, Milanés MV, Laorden ML
Br J Pharm 2014, 171: 688-700; doi: 10.1111/bph.12511

Role of CRF1 receptor in post-incisional plasma extravasation and nociceptive responses in mice.

Romero A, **García-Carmona JA**, Laorden ML, Puig MM
Br J Pharmacol 2015 (En revisión)

Methamphetamine withdrawal induces an anxiogenic-like phenotype and brain region-specific alterations on the oxytocin, μ -opioid receptors and corticotropin releasing factor in mice.

Georgiou P, Zanos P, **García-Carmona JA**, Hourani S, Kitchen I, Laorden ML, Bailey A
Psychoneuroendocrinology 2015 (En revision)

The oxytocin analogue carbetocin prevents priming-induced reinstatement of morphine-seeking: involvement of dopaminergic, noradrenergic and MOPr systems.

Georgiou P, Zanos P, **García-Carmona JA**, Laorden ML, Bailey A
European Neuropsychopharmacology 2015 (Revisión final)

COMUNICACIONES A CONGRESOS:

7th Forum of European Neuroscience (FENS) 2010

Amsterdam, The Netherlands, July, 3-7th, 2010

Genetic disruption of CRF1 receptor pathways partially reverses the acquisition of opioid withdrawal-induced in conditioned place aversion in mice.

Laorden ML, **García-Carmona JA**, Baroja-Mazo A, Almela P, Meca N, González-Cuello A, Milanes MV

XIV Congress of the Spanish Neuroscience Society (SENC) 2011

Salamanca, Spain, September, 28-30th, 2011

Implication of CRFR1 in the activation of catecholaminergic neurons from the brain stress system during morphine withdrawal.

García-Carmona JA, Almela P, Baroja-Mazo A, Milanes MV, Laorden ML

European Opioid Conference (EOC) 2011

Cracow, Poland, April, 13-14th, 2011

Role of CRFR1 and catecholaminergic neurons from ventrolateral medulla in naloxone-induced morphine withdrawal. *Pharmacological Reports*, 2011; 63: 255

Laorden ML, **García-Carmona JA**, Almela P, Baroja-Mazo A, Milanes MV

XXXIII Congress of the Spanish Pharmacology Society (SEF) 2011

Málaga, Spain, October, 3-5th, 2011

Environmental cues enhance CREB phosphorylation and CRF systems in the central amygdale. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 2011; 109: 43

Laorden ML, **García-Carmona JA**, Milanes MV, Almela P

XXXIV European Pharmacology Congress (EPHAR) 2012

Granada, Spain, July, 17-20th, 2012

Activation of CRF neurons by phosphorylation of the cAMP response element binding protein in the hypothalamic paraventricular nucleus during a morphine-conditioned place preference paradigm.

Laorden ML, **García-Carmona JA**, Baroja-Mazo A, Hidalgo JM, Milanes MV, Almela P

8th Forum of European Neuroscience (FENS) 2012

Barcelona, Spain, July, 14-18th, 2012

Involvement of thioredoxin in neuroprotection and effects of environment in dentate gyrus. Role of CREB phosphorylation.

García-Carmona JA, Almela P, Camejo D, Jimenez A, Sevilla F, Milanes MV, Laorden ML

II Congreso Nacional Estudiantes de Farmacia 2012

Valencia, Spain, March, 13-15th, 2012

Implicación del CRFR1 en la activación cerebral del estrés (NTS) y en los signos de abstinencia a morfina en ratones knockout.

González-Lozano E, Madrid-García MJ, Castejon M, Fernández-Lopez L, García-Cerezuela MD, Díaz-Añcazar M, Carvajal MA, Imbernón A, Manzano JG, **García-Carmona JA**, Navarro-Zaragoza J

Papel del receptor glucocorticoide (GR) en la hiperactividad noradrenérgica del NTS-A2 durante el síndrome de abstinencia a morfina.

Castejon M, Fernández-Lopez L, González-Lozano E, Madrid-García MJ, García-Cerezuela MD, Díaz-Añcazar M, Carvajal MA, Imbernón A, Manzano JG, **García-Carmona JA**, Navarro-Zaragoza J

European Opioid Conference (EOC) 2013

Guildford, United Kingdom, April, 10-12th, 2013

CP-154526 blocks CREB phosphorylation in PVN but not in the DG after morphine CPP schedule. Involvement of Trx in CREB phosphorylation.

García-Carmona JA, Almela P, Milanes MV, Laorden ML

Corticotropin-releasing factor receptor-1 is involved in the alteration of hemodynamic variables in the hearth after morphine withdrawal.

García-Carmona JA, Martínez-Laorden E, Milanes MV, Laorden ML

Corticotropin-releasing factor receptor-1 mediates catecholaminergic activation in the heart left ventricle after morphine withdrawal.

García-Carmona JA, Martínez-Laorden E, Baroja-Mazo A, Milanes MV, Laorden ML

Corticotropin-releasing factor receptor-1 is involved in the enhancement of heat shock proteins after morphine withdrawal in mice hearth.

Martínez-Laorden E, **García-Carmona JA**, Baroja-Mazo A, Milanes MV, Laorden ML

12th FELASA Congress 2013: Animal Research: Better Science from Fewer Animals

Barcelona, Spain, June, 10-13th, 2013

Involvement of corticotropin-releasing factor type 1 receptor (CRF-1) in nociceptive behavioral responses in mice.

Romero A, **García-Carmona JA**, Puig MM, Laorden ML

XXV Congreso Nacional Sociedad Española Farmacología (SEF 2013)

San Pedro del Pinatar-Murcia, Spain, September, 16-19th, 2013

Role of CRF1-receptor in the enhancement of tyrosine-hydroxylase phosphorylation at serine 40 (THpSer40) after morphine withdrawal in the right ventricle.

Martínez-Laorden E, García-Carmona JA, Hidalgo JM, Mora L, Baroja-Mazo A, Almela P, Milanes MV, Laorden ML

Assessing students' knowledge and understanding of pharmacology by a re-evaluation with different types of exams.

García-Carmona JA, García-Pérez D, Martínez-Laorden E, Milanes MV, Laorden ML

Reunión Científica Red Trastornos Adictivos 2013 (RTA 2013)

Oviedo, Spain, September, 25-28th, 2013

Cardiac adaptative changes observed after-naloxone precipitated withdrawal: role of CRF1 receptor.

Laorden E, García-Carmona JA, Milanes MV, Laorden ML

IX Congreso Nacional Estudiantes de Farmacia de Alicante (CEFA 2013)

San Juan de Alicante, Spain, October, 23-25th, 2013

Aversive behaviour and glucocorticoids receptor levels are enhanced in Nucleus accumbens after morphine withdrawal and blocked in corticotropin-releasing factor receptor type one knockout mice.

Sánchez-Marcos MM, García-Carmona JA, Laorden ML

DOCENCIA UNIVERSITARIA

Año académico: 2011/2012

Asignatura Troncal: Farmacología General (12 ECTS)

3^º Grado en Farmacia en la Universidad de Murcia

Créditos impartidos: 4 ECTS

Año académico: 2012/2013

Asignatura Troncal: Farmacología General (12 ECTS)

3^º Grado en Farmacia en la Universidad de Murcia

Créditos impartidos: 5 ECTS

Año académico: 2013/2014

Asignatura Troncal: Farmacología General (12 ECTS)

3^º Grado en Farmacia en la Universidad de Murcia

Créditos impartidos: 6 ECTS

BECAS Y AYUDAS:

Beca pre-doctoral FPI

Fundación Séneca de la Región de Murcia; ref. 15519/FPI/10

Universidad de Murcia. Feb 2011 – Feb 2015

Ayudas para estancias cortas en centros distintos al de aplicación de los becarios-contratados FPI

Fundación Séneca de la Región de Murcia; ref. 18764/EFPI/13

University of Surrey, United Kingdom. Jul 2013 – Oct 2013

PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN QUE HAN FINANCIADO ESTA TESIS DOCTORAL

Implicación del CRF extrahipotalámico en la tolerancia/dependencia de morfina. IP: Prof ML Laorden de la Univ. De Murcia. Ministerio de Educación y Ciencia (SAF2007-62758).

Mecanismos neurobiológicos implicados en la preferencia de plaza a morfina y en la aversión a naloxona. Papel de los receptores de CRF1. IP: Prof ML Laorden de la Univ. De Murcia. Ministerio de Ciencia e Innovación (SAF/FEDER-2010-17907).

Relación entre estrés y adicción a opioides: papel de las orexinas y sus interacciones con los sistemas de CRF y NA. IP: Prof. MV Milanés de la Univ. Murcia. Fundación Séneca Región de Murcia 2011-2014 (16958/FSP/11)

Estrés y memoria: implicación en los estados aversivos de la adicción y en las recaídas, mecanismos moleculares. IP: Prof ML Laorden de la Univ. de Murcia. Ministerio de Economía y Competitividad (SAF2013-49076P).

- AC:** adenilato-ciclasa
- ACTH:** hormona adrenocorticotropa
- AMPC:** adenosín monofostato cíclico
- AMPA:** ácido alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico
- AMY:** amígdala
- AP-1:** complejo proteína activadora-1
- BDNF:** factor neurotrófico derivado del cerebro
- BGF:** factor de crecimiento nervioso
- BNST:** bed nucleus of the stria terminalis
- CaMK:** kinasas dependientes de calcio
- CeA:** amígdala central
- CPA:** aversión de plaza condicionada
- CPF:** corteza prefrontal
- CPP:** preferencia de plaza condicionada
- CREB:** elemento de unión de respuesta al AMPc
- CRF:** factor liberador de corticotropina
- CRF-1, CRFR-1:** receptor tipo 1 del factor liberador de corticotropina
- CRF-2, CRFR-2:** receptor tipo 2 del factor liberador de corticotropina
- CRF-3, CRFR-3:** receptor tipo 3 del factor liberador de corticotropina
- DA:** dopamina
- DG:** giro dentado
- DNA:** ácido desoxinucleico
- DOR:** receptor opioide δ
- DYN:** dinorfina
- ERKs:** kinasa reguladora de la señal extracelular
- GABA:** ácido- γ -aminobutírico
- GC:** glucocorticoides

GRK's: kinasas reguladoras del acoplamiento a proteínas G

HPA: eje hipotálamo-hipófisis-adrenal

HSP: proteína de choque térmico

ICSS: auto-estimulación intracraneal

IEG: genes de expresión inmediata

KO: knockout o carente de gen que codifica para una proteína o receptor

KOR: receptor opioide k

LC-A6: locus coeruleus

LH: hipotálamo lateral

MAPK: kinasas activadas por mitógenos

MOR: receptor opioide μ

MSNs: neuronas medianas espinosas

NA: noradrenalina

NAc: núcleo accumbens

NIH: National Institute of Health

NMDA: N-metil-D-aspartato

NTS-A2: núcleo del tracto solitario

PKA: protein-kinasa A

PKC: protein-kinasa C

PV: pálido ventral

PVN: núcleo paraventricular del hipotálamo

RGS: proteínas reguladoras del acoplamiento a proteínas G

RNA_m: ácido ribonucleico mensajero

Ser: residuo de Serina

SNC: sistema nervioso central

TH: tirosina hidroxilasa

Trx-1: tiorredoxina 1

VLM-A1: área ventrolateral de la médula

VTA: área tegmental ventral

WT: ratón silvestre o sin modificaciones genéticas

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN

1. LA ADICCIÓN

- 1.1 LA ADICCIÓN COMO PROBLEMA DE SALUD PÚBLICA
- 1.2 LA ADICCIÓN COMO ENFERMEDAD PSQUIÁTRICA
- 1.3 LA ADICCIÓN COMO ENFERMEDAD CRÓNICA

2. ETAPAS DE LA ADICCIÓN

- 2.1 USO AGUDO: RECOMPENSA Y REFUERZO POSITIVO
- 2.2 ABUSO SUSTANCIAS Y TRANSICIÓN
- 2.3 USO CRÓNICO: TOLERANCIA Y SENSIBILIZACIÓN
- 2.4 ABSTINENCIA Y RECAIDA

3. MODELOS DE COMPORTAMIENTO PARA EVALUAR LA ADICCIÓN A DROGAS EN ROEDORES

- 3.1 PREFERENCIA Y AVERSIÓN CONDICIONADA DE PLAZA
- 3.2 ESTIMULACIÓN INTRACRANEAL
- 3.3 AUTOADMINISTRACIÓN OPERANTE

4. SISTEMAS IMPLICADOS EN LAS PROPIEDADES ADICTIVAS DE LA MORFINA

- 4.1 SISTEMAS DOPAMINÉRGICOS
- 4.2 SISTEMAS NORADRENÉRGICOS
- 4.3 SISTEMAS DE CRF
 - 4.3.1 VIAS NEURONALES CRF
 - 4.3.2 CRF Y SUS RECEPTORES
 - 4.3.3 IMPLICACIÓN DEL CRF Y SUS RECEPTORES EN LA ADICCIÓN
- 4.4 IMPLICACIÓN DE LOS GLUCOCORTICOIDES
- 4.5 ALTERACIONES EN LOS PATRONES DE EXPRESIÓN GÉNICA
- 4.6 PAPEL DE LAS PROTEINAS ANTIOXIDANTES EN LA ADICCIÓN

5. ALTERACIONES CARDIACAS DURANTE LA ADICCIÓN: IMPLICACIÓN DEL CRF

OBJETIVOS

COMPENDIO DE ARTÍCULOS

CONCLUSIONES

ENGLISH SUMMARY

REFERENCIAS



INTRODUCCIÓN

1. LA ADICCIÓN

La adicción a sustancias de abuso es una enfermedad crónica del sistema nervioso central (SNC), debida a una disfunción neurobiológica de estructuras cerebrales mesencefálicas, límbicas, corticales y de circuitos cerebrales implicados en la motivación y la conducta (Kalivas y Volkow, 2005). El uso continuado de estas sustancias induce cambios adaptativos en el SNC, lo que conduce a fenómenos como la dependencia física, la sensibilización, el “*craving*” o deseo irresistible de consumo y la recaída. Finalmente, se instaura un patrón de autoadministración repetida que a menudo lleva a la tolerancia, la abstinencia y a una administración compulsiva de la sustancia.

1.1 LA ADICCIÓN COMO PROBLEMA DE SALUD PÚBLICA

El consumo de drogas conlleva un elevado coste en asistencia sanitaria, así como en recursos sociales, jurídicos, familiares y laborales. Los problemas de salud relacionados con el consumo de drogas constituyen un motivo de consulta frecuente en la práctica clínica, de hecho, el 15-20 % de las consultas de atención primaria son atribuibles a los problemas relacionados con el consumo de drogas. El consumo de una u otra droga y los problemas médicos derivados de su uso va a depender de la región del mundo considerada, por ejemplo, en África y Oceanía los problemas médicos son debidos fundamentalmente al consumo de cannabis (62% y 44%, respectivamente), mientras que la cocaína es la droga más prominente en América del Norte y del Sur (29% y 49%, respectivamente). En cambio, en Asia y Europa las consultas médicas están más relacionadas con el consumo de los opiáceos (61% y 63%, respectivamente) (UNODC, 2014).

En España, el perfil de consumidores de drogas ha experimentado cambios notables a lo largo de los años. Desde la década de los 70 hasta principios de los años noventa, la sustancia que más alarma social causaba era la heroína; a mediados de los noventa, aumenta el número de consumidores de cannabis y cocaína y aparece el fenómeno conocido como “consumo recreativo” de drogas, es decir, el consumo, en ocasiones simultáneo, de sustancias como el alcohol, el cannabis, la cocaína, el éxtasis y derivados anfetamínicos o drogas de síntesis. Actualmente, después de muchos años de descenso continuado del consumo de heroína, algunos estudios apuntan a un incremento en el consumo de heroína fumada (Tabla 1). Otras drogas que causan gran morbi-mortalidad en España son la cocaína y el alcohol. En el año 2009, en nuestro país, las admisiones a tratamiento por cocaína supusieron un 17% del total de admisiones a tratamiento de desintoxicación/deshabitación. Más complicado es medir la magnitud del etilismo, pues es una enfermedad sistémica que se asocia a graves problemas de

salud, aumentando el riesgo de padecer múltiples patologías entre las que destaca la enfermedad hepática, cáncer y encefalopatías.

Tabla 1. Prevalencia de consumo de drogas alguna vez en la vida en la población de 15-64 años. (%). España, 1995-2010. Modificado de la memoria 2012 del Plan Nacional sobre Drogas.

	1995	1997	1999	2001	2003	2005	2008	2010
Tabaco	-	69,7	64,9	68,4	68,9	69,5	68,5	68,3
Alcohol	-	90,6	87,3	89,0	88,6	93,7	88,0	87,4
Cannabis	14,5	22,9	19,6	23,8	29,0	28,6	27,3	27,9
Éxtasis	2,0	2,5	2,4	4,0	4,6	4,4	4,3	4,1
Anfetaminas	2,1	2,7	2,2	2,9	3,2	3,4	3,8	3,9
Cocaína	3,7	3,8	3,5	5,3	6,4	7,6	9,8	10,1
Heroína	0,8	0,6	0,5	0,6	0,9	0,7	0,8	0,9

1.2 LA ADICCIÓN COMO ENFERMEDAD PSIQUIÁTRICA

El consumo de drogas induce la aparición de dependencia, que se caracteriza por la aparición de un conjunto de síntomas cognoscitivos, conductuales y fisiológicos que indican que el individuo continúa consumiendo la sustancia a pesar de la aparición de problemas significativos relacionados con ella. Aunque no está incluida específicamente en los criterios diagnósticos, la necesidad irresistible de consumo o “*craving*” se observa en la mayoría de los pacientes con dependencia de sustancias de abuso.

La dependencia se define como un grupo de tres o más de los síntomas enumerados a continuación, que aparecen en cualquier momento dentro de un mismo período de 12 meses:

- La droga es tomada con frecuencia en cantidades mayores o durante un período más largo de lo que inicialmente se pretendía.
- Existe un deseo persistente o esfuerzos infructuosos de controlar o interrumpir su consumo.
- Se emplea mucho tiempo en actividades relacionadas con la obtención de la droga, su consumo o en la recuperación de los efectos de misma.
- Reducción de importantes actividades sociales, laborales o recreativas debido a su consumo.
- Se continúa consumiendo la droga a pesar de tener conciencia de problemas psicológicos o físicos recidivantes o persistentes, que parecen causados o exacerbados por el consumo de la sustancia de abuso.

- **Tolerancia:** necesidad de recurrir a cantidades crecientes de la droga para alcanzar la intoxicación o el efecto deseado, o bien una notable disminución de los efectos de la misma con su uso continuado a las mismas dosis.
- **Abstinencia:** es un cambio de comportamiento desadaptativo, con implicaciones cognoscitivas y fisiológicas, que tiene lugar cuando la concentración en sangre o en tejidos de una droga disminuye en un individuo que ha mantenido un consumo prolongado de grandes cantidades de la misma. Tras la aparición de los desagradables síntomas de abstinencia, el sujeto toma la droga para eliminar o aliviar dichos síntomas, sin embargo, ni la tolerancia ni la abstinencia son condiciones necesarias ni suficientes para diagnosticar dependencia de sustancias de abuso.

1.3 LA ADICCIÓN COMO ENFERMEDAD CRÓNICA

La adicción forma parte de un proceso de deterioro de la conducta autodirigida, con aparición de conductas automáticas, disparadas por estímulos condicionados que algunos autores han llamado síndrome de deterioro en la inhibición de la respuesta y excesiva atribución de relevancia a los estímulos condicionados (Goldstein y Volkow, 2002). Hoy en día disponemos de abundantes evidencias científicas que confirman que la adicción a opiáceos y otras drogas constituye una enfermedad crónica del SNC que se caracteriza no sólo por el aumento de los aspectos motivacionales e incentivos de dichas sustancias de abuso y de los estímulos asociados, sino también por el deterioro en la capacidad de inhibir respuestas inapropiadas (Kalivas y Volkow, 2005). Por todo ello, podemos definir la adicción como un desorden neurológico crónico, con tendencia a la recaída, caracterizado por la búsqueda y consumo compulsivo de la droga; pérdida de control sobre su consumo; y aparición de un estado emocional negativo cuando no se tiene acceso a la misma.

La dependencia de sustancias de abuso, al igual que la mayoría de trastornos psiquiátricos, está relacionada con factores genéticos, incluyéndose entre las enfermedades genéticamente complejas crónicas (Lander y Schork, 1994). Dichas enfermedades se ajustan a un modelo de herencia poligénico-multifactorial, con influencia de unos genes de efecto menor y del ambiente, condición necesaria aunque no suficiente. Dicho de otro modo, para que un individuo acabe siendo dependiente a la heroína, es necesario un contacto con la droga, no obstante, no todas las personas que consumen alguna vez la sustancia acaban siendo adictas a ella. La vulnerabilidad genética compartida entre distintas sustancias podría explicarse por la

potenciación del circuito de recompensa cerebral tras la administración de la droga, pero también podría estar relacionada con genes asociados al control de la impulsividad o con otros relacionados con vulnerabilidad hacia trastornos psiquiátricos que pueden asociarse al consumo de drogas con mayor frecuencia, como por ejemplo la esquizofrenia o el trastorno bipolar (Mayfield y Schuckit, 2008), englobándose en un trastorno psiquiátrico conocido como patología dual.

Por tanto, las drogas son sustancias químicas que modifican el funcionamiento de determinados sistemas de neurotransmisión y circuitos cerebrales, produciendo cambios cognitivos, emocionales, motivacionales y conductuales. Su administración aguda produce cambios transitorios, que revierten cuando finaliza su efecto farmacológico. Sin embargo, su consumo crónico puede dejar importantes huellas en la memoria emocional remodelando las conexiones y vías neuronales, produciendo cambios de larga duración en la función cerebral que reportan una mayor vulnerabilidad para reiniciar el consumo. De esta manera, todas las drogas producen cambios moleculares y celulares que se manifiestan somáticamente en distintas etapas o fases de la enfermedad adictiva.

2. ETAPAS DE LA ADICCIÓN

La enfermedad adictiva puede tener su inicio en cualquier momento de la vida y debutar con cualquier droga, juego patológico o incluso el trabajo o el deporte. La dependencia se inicia con el consumo puntual de la droga motivado por un conglomerado de factores personales, psicológicos, sociales y ambientales que da lugar a la primera y sucesivas etapas de la adicción. La adicción se ha conceptualizado en un ciclo de tres etapas: consumo agudo/intoxicación, abstinencia/estado negativo y preocupación/anticipación; con dos fuentes primarias de refuerzo: refuerzo positivo y refuerzo negativo. El refuerzo positivo es definido como el proceso mediante el cual, la presentación de un estímulo aumenta la probabilidad de producir una determinada respuesta, mientras que refuerzo negativo es definido como el proceso mediante el cual la carencia de un estímulo aversivo (un estado aversivo en el caso de la adicción) incrementa la probabilidad de respuesta.

De esta manera, el consumo puntual de la droga produce efectos placenteros que actúan como reforzadores positivos de la conducta, siendo esta impulsiva y perpetuándose en el tiempo hasta hacerse crónica (Kalivas y O'Brien, 2008). Una vez se ha establecido el uso crónico de la droga, si este es interrumpido se producen una serie de efectos aversivos, tanto somáticos como psiquiátricos, que actúan como reforzadores negativos y dirigen el consumo crónico de la droga para evitar la aparición de este síndrome de abstinencia. Los reforzadores

negativos producen una mayor alteración de la conducta, la cual se vuelve compulsiva con pérdida de control sobre el uso de la droga (Koob y Le Moal, 2001; Cami y Farre, 2003) y con un grave compromiso de las actividades sociales, laborales y recreativas previas del individuo.

Las fuentes secundarias de refuerzo de la conducta adictiva incluyen diferentes condicionantes que actúan como reforzadores positivos o negativos como, aspectos psicológicos, sociales y sociolabores y aspectos neurobiológicos y genéticos relacionados con la vulnerabilidad y sensibilidad individual. (Koob y cols., 2014). Todos estos condicionantes pueden ser superpuestos en las distintas etapas del ciclo de la adicción.

La espiral de ansiedad que causa el inicio del consumo de la sustancia adictiva describe, como el primer fallo en la auto-regulación del consumo puede causar ansiedad o angustia emocional, estableciendo un ciclo de fallos repetidos de la auto-regulación, cada uno de los cuales producen un estado negativo adicional. La ansiedad también ha sido descrita como la causante de la desregulación progresiva que sufre el sistema de recompensa cerebral en el contexto de los sucesivos ciclos adictivos (Figura 1). Diversos modelos animales han sido validados para establecer los síntomas o constructos asociados con elementos del ciclo de la adicción, criterios de adicción y fuentes de refuerzos asociados con la adicción (Koob, 1995; Koob y cols., 1998).

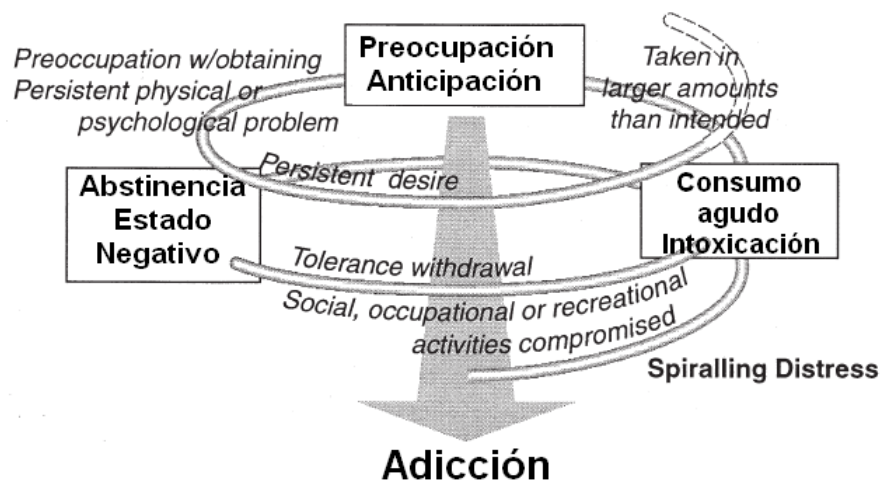


Figura 1. Diagrama que describe la espiral del ciclo adictivo desde una perspectiva psiquiátrica con diversos factores o criterios que afectan al desarrollo de la dependencia de sustancias. Modificado de Koob y Le Moal, 2001.

2.1 CONSUMO AGUDO: RECOMPENSA Y REFUERZO POSITIVO

Para entender cómo el sistema cerebral de recompensa es alterado durante el desarrollo de la adicción, es preciso entender las bases de los mecanismos de recompensa biológicos. Uno de los principios en los que se ha centrado la investigación en la neurobiología de los efectos reforzantes positivos de las drogas son las proyecciones y terminales neuronales del sistema dopaminérgico mesocorticolímbico (Le Moal y Simon, 1991). Los principales componentes de este circuito de recompensa son el área tegmental ventral (VTA), donde se encuentran las somas de las neuronas dopaminérgicas; el prosencéfalo [incluye el núcleo accumbens (NAc), el tubérculo olfatorio, la amígdala (AMY) y la corteza prefrontal (CPF)]; y las conexiones dopaminérgicas entre el VTA y el prosencéfalo. Otros componentes son las múltiples interacciones de las estructuras de este sistema con otros neurotransmisores como son el ácido γ -aminobutírico (GABA), el glutamato o la serotonina (Koob, 1992; Koob y Le Moal, 2008).

Las proyecciones dopaminérgicas que modulan el prosencefalo y las regiones corticales habilitan, en condiciones fisiológicas, la integración del funcionamiento de estas estructuras. En el centro de estas interrelaciones se consideran vitales dos grupos de estructuras: el circuito mesolímbico-amigdalario, con énfasis en la amígdala extendida y el shell del NAc (Heimer y cols., 1991; Koob, 1999); y el cortico-frontal-cingulado anterior, relacionado con el circuito talámico pálido-estriatal (Figura 2).

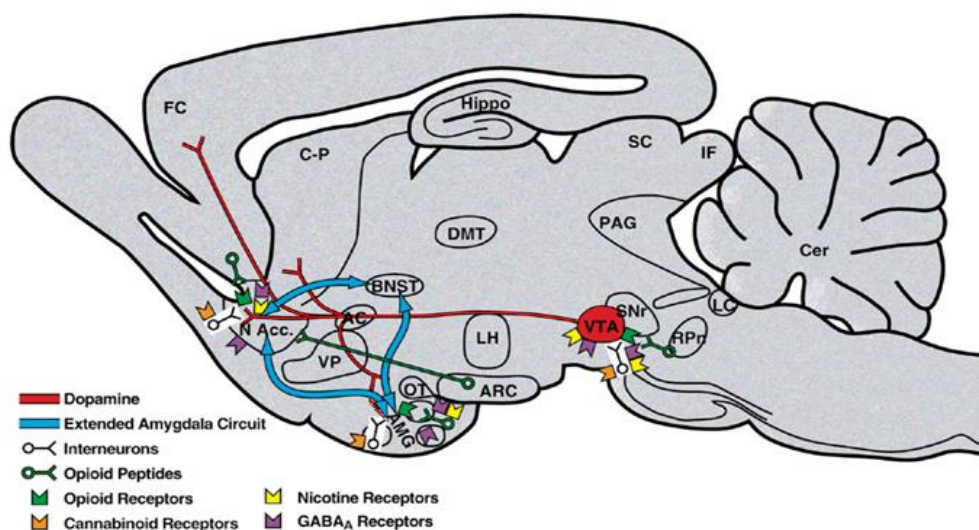


Figura 2. Vías neuronales, neurotransmisoras y receptores implicados en el efecto agudo reforzante de las drogas de abuso. Los opioides activan los receptores opioides endógenos en el VTA, NAc y AMY. Además, los opioides facilitan la liberación de dopamina en el NAc o bien indirectamente tras inhibir las interneuronas GABAérgicas del VTA. Modificado de Edwards y Koob, 2010.

Las proyecciones dopaminérgicas desde el VTA hacia las estructuras límbicas, como el NAc, están funcionalmente involucradas en los efectos reforzantes agudos de los psicoestimulantes, mientras que los cambios asociados con aspectos motivacionales de la abstinencia a drogas podrían incluir procesos neuroadaptativos de la amígdala extendida (Koob, 1999; Di Chiara, 1999). El sistema denominado de la amígdala extendida establece conexiones entre áreas cerebrales decisivas, como la corteza del NAc, la amígdala central (CeA) y el núcleo de la estría terminal (BNST) (Alheid y cols., 1998).

Es importante destacar que ambos circuitos están conectados y modulados por la dopamina (DA) (Le Moal, 1995). Además, está bien establecido que las neuronas dopaminérgicas mesocorticales y mesolímbicas tienen distinta regulación fisiológica, estando la utilización de DA en el NAc bajo el control de la vía excitatoria cortical-accumbens (Le Moal y Simon, 1991). Por tanto, las distintas drogas pueden activar este circuito neuronal en distintos núcleos y mediante diferentes mecanismos moleculares y celulares (Tabla 2).

Tabla 2. Sustratos neurobiológicos de los efectos reforzantes agudos de las drogas de abuso. Modificado de Koob y Le Moal, 2008.

Droga de abuso	Neurotransmisor	Lugar de acción
Cocaína	DA/Serotonina	Nac, AMY
Opioides	DA, péptidos opioides	VTA, NAc
Nicotina	DA, péptidos opioides	VTA, NAc
Alcohol	DA, péptidos opioides, GABA, serotonina, glutamato	VTA, NAc, AMY

El consumo agudo de drogas produce cambios neurobiológicos en el VTA, el NAc y otras regiones cerebrales, dando lugar a cambios motivacionales, emocionales y cognitivos, como consecuencia de respuestas biológicas compensatorias en un intento celular de alcanzar de nuevo la homeostasis.

Los opioides producen activación del sistema dopaminérgico, inhibiendo las interneuronas GABA que mantienen cierta inhibición de las neuronas dopaminérgicas del VTA, por tanto su efecto resultante es la desinhibición de las neuronas dopaminérgicas del VTA y una mayor liberación de DA en las sinapsis del NAc (Di Chiara e Imperato, 1988). Esta desinhibición requiere la activación de receptores de glutamato, N-metil-D-aspartato (NMDA) y ácido alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico (AMPA). Por tanto, los efectos de los opioides en la función del VTA precisan de una estrecha interacción de los receptores opioides μ (MOR) y la transmisión glutamatérgica.

Los opioides tanto exógenos (morfina, heroína) como endógenos (encefalinas y endorfinas), son ligandos de los receptores opioides presentes en el SNC, principalmente en el NAc, la AMY y el VTA. Los opioides se unen de forma específica y reversible a estos receptores celulares, y producen de este modo sus acciones biológicas. Han sido identificados, al menos, tres tipos de receptores opioides: MOR = μ OR = Mu; DOR = δ OR = Delta; y KOR = κ OR = Kappa. Todos ellos presentan una similitud estructural de un 60% (Chen y cols., 1993) y son receptores de membrana de tipo metabotrópico acoplados a proteínas G ($G_{\alpha i}/G_{\alpha o}$). Los efectos fisiológicos de la morfina y los efectos reforzadores positivos de esta, están ausentes en ratones knockout de MOR (Matthes y cols., 1996; Le Merrer y cols., 2009). Una vez activado MOR mediante la unión de su ligando endógeno o exógeno, las subunidades G_{α} y $G_{\beta\gamma}$ interactúan con sistemas efectores intracelulares para inhibir la adenilato-ciclasa (AC) y los canales de voltaje dependiente de Ca^{2+} , estimulando los canales de K^+ e inhibiendo las interneuronas gabaérgicas y, por tanto, aumentando la liberación de DA en el NAc (Waldhoer y cols., 2004; Williams y cols., 2013).

2.2 USO CRÓNICO Y TRANSICIÓN DE LA ADICCIÓN

El uso crónico de drogas comienza con la alteración intensa del estado motivacional que puede ser disparada por estímulos condicionados, por el consumo de pequeñas cantidades de opioides u otras drogas y también por los estados de estrés. Esta alteración de la motivación o el deseo es conocida como craving, el cual tiene un sustrato neurobiológico relacionado con el circuito de recompensa. La conexión dopaminérgico-glutamatérgica juega un papel importante en el craving, pues las neuronas dopaminérgicas del VTA tienen receptores AMPA y NMDA, cuya activación por el glutamato actúa como moduladora de las neuronas dopaminérgicas mesolímbicas. La administración de fármacos antagonistas de los receptores NMDA puede facilitar los efectos reforzadores e inducir a la recaída, mientras que la facilitación de la actividad glutamatérgica endógena sobre receptores AMPA reduce la búsqueda de drogas (Self, 2005). Los pacientes pueden presentar estados de deseo imperioso, necesidad de consumir o craving, que suelen dar lugar a conductas de búsqueda y consumo de droga. Muchos pacientes describen con bastante precisión sus episodios de craving, cada vez más frecuentes e impulsivos hasta llegar a la pérdida de control y compulsión sobre el consumo de la droga cuando se exponen a determinados estímulos.

La búsqueda compulsiva de droga podría depender del circuito de la amígdala extendida e incluir proyecciones corticales basolaterales hacia el NAc, el cual está anatómicamente relacionado con el circuito pálido-estriatal (Everitt y cols., 1999). Es preciso destacar que, la

CeA está conectada con regiones del rombencéfalo y la protuberancia, como el núcleo del tracto solitario (NTS-A2) o el área ventrolateral de la médula (VLM-A1), incluidas en respuestas autonómicas; mientras que el circuito talámico corticoestriatal está formado por regiones implicadas en el aprendizaje motor, evaluación del refuerzo (NAc), mecanismos de inhibición central, integración de las asociaciones estímulo-respuesta y el comportamiento compulsivo repetitivo (Jentsch y Taylor, 1999).

La transición hacia un uso crónico de la sustancia de abuso (Figura 3) es explicada mediante un modelo conocido como alostasis hedónica (Koob y Le Moal, 1997, Koob y cols., 2004). La alostasis produce la integración de procesos adaptativos manteniendo la estabilidad a través de cambios que no se realizan en el rango normal de homeostasis. Esto implica que muchas funciones fisiológicas son movilizadas o suprimidas. Controlando todos los mecanismos simultáneamente, el cerebro dirige la experiencia, la memoria, la anticipación y la re-evaluación de las necesidades de anticipación para los requerimientos fisiológicos. Cuando las demandas se hacen crónicas, el sistema cerebro-organismo, se adapta tónicamente en todos los niveles, entrando en una condición relajada que podría crear un estado no placentero de abstinencia a partir de la propia regulación fisiológica, lejos del equilibrio homeostático. Sin embargo, cuando se instaura la agitación, el estrés repetido y un estado afectivo negativo, se prolongan las regulaciones lejos de la normalidad, desapareciendo la capacidad para responder a retos adicionales, la capacidad de relajación y de respuesta. En la adicción, la estabilidad consiste en el mantenimiento en la función de recompensa, sin embargo, la DA y los péptidos opioides endógenos tienen una capacidad limitada para mantener, en un rango homeostático, esta función.

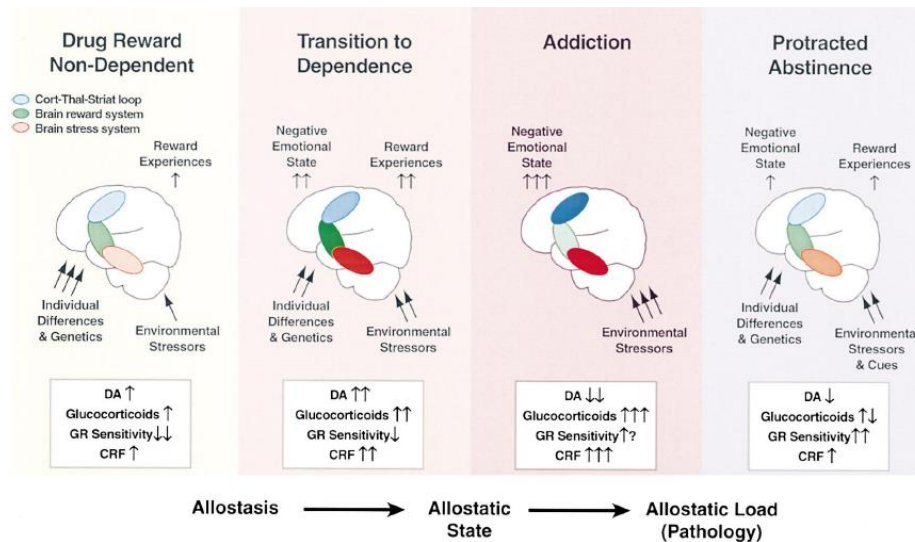


Figura 3. Diagrama que representa la relación entre el continuo proceso desde la alostasis hasta la patología y la transición desde el consumo de droga hasta la abstinencia. Tres circuitos cerebrales cambian y contribuyen al estado alostático del sistema de recompensa: el propio sistema de recompensa (verde), el sistema cerebral de estrés (rojo) y la vía cortico-talámica-estriada (azul). La activación del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal media la contribución del eje del estrés cerebral al estado alostático. Tomado de Koob y Le Moal, 2001.

2.3 TOLERANCIA Y SENSIBILIZACIÓN

La mayoría de individuos que son dependientes de sustancias de abuso no son completamente conscientes de serlo. Consumiendo más droga continúan en un estado de euforia, y los síntomas leves de abstinencia son inadvertidos y manejables. La valoración cognitiva del sujeto es: “puedo dejarlo cuando quiera”, así buscando una mayor sensación de euforia, el individuo puede cambiar la vía de administración a otra que produzca efectos más intensos y rápidos, como por ejemplo, una vía intranasal o una parenteral, o bien intentar una mezcla más potente, en el caso de los opiáceos, administrando heroína junto analgésicos, hipnóticos o sedantes, produciéndose el abuso de drogas.

Durante el uso crónico de la sustancia de abuso, se producen adaptaciones neuronales en el sistema mesolímbico en un intento de restablecer la homeostasis en el sistema de recompensa. Así, la función basal dopaminérgica se reduce progresivamente y la droga es menos efectiva para producir el típico incremento en la transmisión dopaminérgica, siendo este fenómeno conocido como tolerancia. Por tanto, la administración repetida de drogas puede producir un proceso de tolerancia a los efectos de la misma. El grado en el que se desarrolla tolerancia varía ampliamente según la sustancia. Los sujetos que consumen grandes dosis de opiáceos y estimulantes pueden presentar niveles de tolerancia considerables, hasta llegar a dosis que serían letales para una persona que no consumiera la sustancia. El hecho de que la tolerancia se produzca con todos los opiáceos, nos hace pensar que el mecanismo que subyace en la

tolerancia es de tipo farmacodinámico, modificando algunos de los eventos entre el receptor ocupado, la cadena de transducción y la respuesta final.

Estudios recientes acerca de los mecanismos de tolerancia a opioides, incluyen la activación simultánea de más de un tipo de receptor opioide (principalmente MOR y DOR) o de diferentes cascadas de señalización intracelular mediadas por una activación diferencial de subtipos de proteínas G α (Piñeyro y Archer-Lahlou, 2007). Hasta hace unos años se pensaba que los mecanismos de endocitosis de los receptores, la regulación a la baja en el acoplamiento entre los receptores opioides y las proteínas G (proceso de desensibilización), la aparición de péptidos antiopioides o la instauración de mecanismos de transducción alternativos (Nestler y Aghajanian, 1997), tenían gran relevancia en la tolerancia. Actualmente, diversos estudios confirman que los cambios en las proteínas G pueden ser el mecanismo fundamental para la instauración de la tolerancia (Christie, 2008; Koch y Höllt, 2008; Berger y Whistler, 2010; von Zastrow, 2010). En esta línea se ha comprobado que la exposición crónica a morfina puede producir una acelerada desensibilización en la que intervienen diferentes mecanismos entre otros: fosforilación del MOR, aumento de las ERK-1/2, quinasas reguladoras del acoplamiento a proteínas G (GRK's) o arrestinas, regulación al alza de proteínas reguladoras del acoplamiento a proteínas G (RGS) o fosfolipasa D2 (Gold y cols., 2003; Koch y cols 2006; Fan y cols., 2003). Así, múltiples proteínas se unen al dominio intracelular de MOR y actúan impidiendo estéricamente la interacción con las proteínas G. Por otra parte, se ha evidenciado que la tolerancia a los efectos de la morfina, puede ser reducida mediante la administración de inhibidores de protein kinase C (PKC) (Hua y cols., 2002) o en ratones knockout para la PKC (Newton y cols., 2007) (Figura 4).

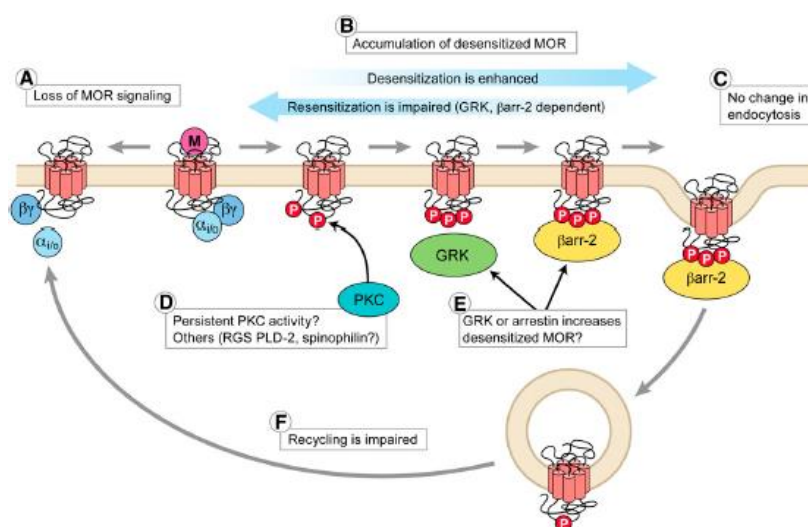


Figura 4. Esquema ilustrativo de las adaptaciones que pueden contribuir a la tolerancia de MOR tras la exposición crónica a morfina. (A) Los estudios revelan que es necesaria la pérdida de más del 80% de MOR funcionales para la aparición de tolerancia. Tomado de Williams y cols., 2013.

Otros estudios farmacológicos, han evidenciado la implicación de otras proteínas: receptor NMDA, el óxido nítrico sintetasa y la protein kinasa A (PKA) (Garzón y cols., 2012).

En el proceso de sensibilización se distinguen dos fases desde el punto de vista neurobiológico: la *fase de iniciación*, durante la administración repetida de la droga y la *fase de expresión*, cuando se re-administra la droga tras un periodo de abstinencia.

La capacidad de una droga para reinstaurar una conducta asociada al consumo se encuentra directamente relacionada con su capacidad para provocar sensibilización neuroquímica y conductual, tal como postula *la teoría de la sensibilización del incentivo* propuesta por Robinson y Berridge (Robinson y Berridge, 2001). En este sentido, la sensibilización ha sido relacionada directamente con la búsqueda compulsiva de la droga y con los fenómenos de recaída. El incentivo del estímulo asociado a la droga aumenta progresivamente mediante un aprendizaje asociativo, llegando a un estado de “*craving*” o de búsqueda y consumo compulsivo de la droga. La continua sensibilización de este sistema favorece el fenómeno de recaída.

La exposición a reforzadores naturales, como por ejemplo el chocolate, aumentan la transmisión de DA en el shell y core del NAc y en la CPF. En el shell del NAc, esta respuesta produce una regulación adaptativa tras una sola exposición al mismo sabor/comida, lo cual no ocurre con las drogas de abuso (De Luca y cols., 2012). Esta respuesta se reduce tras la estimulación repetida y es conocida como el fenómeno de habituación (Rankin y cols., 2009). En cambio, en ambos casos (reforzadores naturales y drogas), la habituación puede ser modificada por el entorno y estímulos asociados al consumo (Bassareo y Di Chiara, 1999). Estudios recientes han demostrado que la DA en el shell del NAc es activada por estímulos no conocidos previamente, mientras que la DA en la CPF codifica el valor genérico motivacional que asigna el sujeto independientemente del estímulo (De Luca, 2014). De esta manera, el fenómeno de habituación está presente en el shell del NAc pero no en el core del NAc ni en la CPF. La DA en el shell del NAc durante este proceso de sensibilización puede ser considerada *per se* como un marcador de dependencia a drogas (De Luca, 2014).

4.1 ABSTINENCIA Y RECAIDA

El síndrome de abstinencia se define como el conjunto de manifestaciones somáticas que aparecen al suspender el consumo de una droga que previamente ha generado un cuadro de dependencia. Las diferentes drogas de abuso presentan síndromes de abstinencia con signos característicos y diferentes. El síndrome de abstinencia de los opiáceos y del alcohol es el más

llamativo, mientras que el de los cannabinoides y nicotina presenta unas manifestaciones físicas más leves, aunque no por ello dejan de ser evidentes.

Según el DMS-IV-TR define abstinencia a opiáceos como:

A- interrupción o disminución de un consumo abundante de opiáceos y prolongado de varias semanas o la administración de un antagonista opioide tras el consumo de la droga.

B- tres o más de los siguientes signos y síntomas que aparecen en pocas horas o días tras el cese del consumo: disforia, náuseas, vómitos, dolor muscular, lagrimeo, rinorrea, sudoración, piloerección, midriasis, diarrea, fiebre, insomnio.

C- los síntomas del criterio b provocan malestar significativo o deterioro social, laboral y del autocuidado.

El síndrome de abstinencia que produce el cese crónico de opioides, esencialmente desenmascara todas las adaptaciones neuronales que se han producido en el cerebro en intentos de equilibrar la presencia de droga. Una primera causa de los signos físicos de abstinencia es la reducción dramática de la descarga dopaminérgica eferente en los circuitos implicados en los efectos reforzadores agudos de las drogas (Diana y cols., 1995). La hipótesis más aceptada es que los sistemas de DA están comprometidos en fases cruciales del ciclo de la adicción, como la abstinencia, y llevan a una disminución de la motivación por los estímulos no relacionados con la droga y a un aumento en la sensibilidad al abuso de droga (Melis y cols., 2005). Igualmente, hay una disminución de la neurotransmisión de serotonina en el NAc durante la abstinencia de drogas (Rossetti y cols., 1992). Sin embargo, hay una sensibilidad aumentada de los mecanismos de transducción de los receptores opioides en el NAc (Stinus y cols., 1990), unos niveles disminuidos de GABA y una transmisión glutamatérgica NMDA aumentada durante la abstinencia de alcohol y opiáceos (Weiss y cols., 1996).

Un segundo componente del estado de abstinencia, son las adaptaciones neuronales que ocurren en el sistema cerebral de estrés, en un intento de contrarrestar la presencia crónica de la droga y restaurar la función normal del cerebro. Tanto el eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (HPA) como el sistema cerebral de estrés extrahipotalámico son activados por el CRF durante la abstinencia a drogas, con una respuesta común de todas las drogas, aumentando la hormona adrenocorticotropa (ACTH), cortisol y el factor liberador de corticotropina (CRF) en la AMY (Contarino y Papaleo, 2005; Koob y Kreek, 2007).

Una de las estructuras más importantes del sistema cerebral de estrés, es el eje HPA o sistema de CRF hipotalámico integrado por el núcleo paraventricular del hipotálamo (PVN), la hipófisis

y la corteza suprarrenal. La otra estructura cerebral implicada en el sistema cerebral de estrés, es conocida como amígdala extendida y ha sido identificada como el sustrato de los efectos reforzadores positivos de las drogas de abuso y el refuerzo negativo asociado con el estado alostático de la adicción. El término amígdala extendida fue acuñado por Johnston (1923) y representa una macroestructura compuesta por varias áreas del prosencéfalo: el BNST, la CeA, el área sublenticular innominada y el Shell del NAc (Heimer y Alheid, 1991). Todas estas estructuras reciben conexiones aferentes del córtex, hipocampo, amígdala basolateral, VTA, hipotálamo lateral (LH) y, a su vez, emiten conexiones eferentes hacia el núcleo pálido ventral (PV), el VTA, el NTS-A2, el VLM-A1 y el LH (Figura 5).

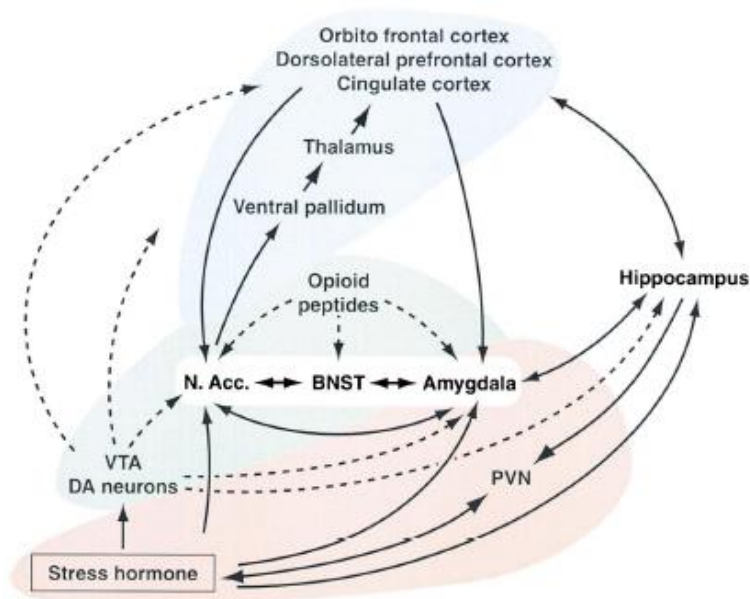


Figura 5. Diagrama que ilustra el circuito de la amígdala extendida como mediador de la alostasis en la adicción a drogas. El eje HPA y el sistema cerebral de estrés promueven la disregulación del circuito de recompensa; y expresando y perpetuando la búsqueda compulsiva de la droga se haya el circuito cortico-talámico-estriado. Tomado de Koob y Le Moal, 2001.

La amígdala extendida es un sistema de CRF extrahipotálamico cuyos somas se localizan en la CeA y el BNST, áreas relacionadas con las emociones, la memoria emocional y sensibles a estados afectivos negativos y de estrés. Durante el consumo crónico y especialmente durante la abstinencia a drogas se produce un aumento en la liberación de CRF en el Shell del NAc que regula la transmisión DA.

Otros sistemas neuronales, además del mesocorticolímbico y del CRF, juegan un papel crucial en el síndrome de abstinencia tanto físico como psicológico. Estos incluyen la noradrenalina (NA) (Weinshenker y Schroeder, 2007), las orexinas (Mahler y cols., 2012) o la dinorfina (DYN) (Yuferov y cols., 2004; Schlosburg y cols., 2013) (Figura 6).

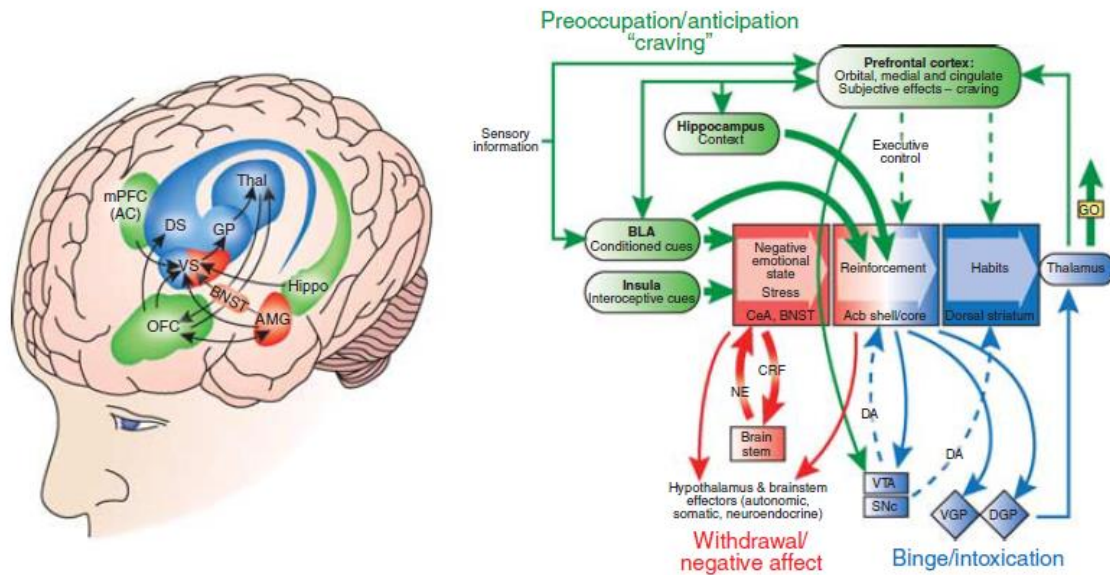


Figura 6. Esquema ilustrativo de las combinaciones de neuro-adaptaciones en los distintos circuitos cerebrales para las tres etapas del ciclo de la adicción que promueven el comportamiento de búsqueda de droga en los adictos. La activación del estriado ventral/dorsal y la amígdala extendida es conducida por el hipocampo mientras que la amígdala basolateral y la ínsula conducen la aparición de un estado emocional negativo y estrés. El córtex prefrontal está comprometido, produciendo déficits en funciones ejecutivas, contribuyendo así con el prominente incentivo que producen las drogas comparado con los reforzadores positivos naturales. Los sistemas de DA están comprometidos y el sistema cerebral de estrés, como el CRF, activado para restablecer la importancia de las drogas en el contexto del estado disfórico de la abstinencia. Tomado de Koob y Volkow, 2010.

La recaída en la adicción a drogas, es el estado en el que los adictos vuelven a consumir compulsivamente la droga tras un periodo corto o incluso prolongado de abstinencia. La fase de preocupación/anticipación consiste en dos procesos: abstinencia prolongada y recaída post-estrés. El CRF contribuye al estado emocional negativo residual que puede ser la base para la búsqueda de droga en las recaídas desencadenadas por la exposición a estímulos o situaciones estresantes (Valdez y cols., 2002; Valdez y Koob, 2004). Así, el sistema de CRF en el BNST es activado cuando los agentes estresantes inducen recaída (Shaham y cols., 2003), los antagonistas de CRF impide la recaída post-estrés a cocaína, alcohol y opiáceos en modelos animales de autoadministración (Erb y cols., 1998, Liu y Weiss, 2002, Zisli y cols., 2007). Otros sistemas cerebrales implicados en la recaída post-estrés incluyen NA, oxitocina y vasopresina (Zanos y cols., 2014).

3. MODELOS DE COMPORTAMIENTO PARA EVALUAR LA ADICCIÓN A DROGAS EN ROEDORES

La investigación clínica en humanos adictos ha sido útil para conocer la magnitud, la demografía y la fases de la enfermedad adictiva, sin embargo, la mayor parte del progreso realizado en el estudio de la adicción y sus bases neurobiológicas, proviene de trabajos desarrollados en modelos animales. A pesar de que no existe ningún modelo animal que pueda explicar y desarrollar completamente el proceso adictivo tal y como se desarrolla en humanos, estos nos permiten investigar elementos específicos que forman parte de dicho proceso (Koob y Le Moal, 2008). Algunos ejemplos de modelos para el estudio de los procesos adictivos son los paradigmas de la estimulación intracraneal eléctrica, los métodos de condicionamiento de plaza y las técnicas de auto-estimulación, entre otros (Sanchis-Segura y Spanagel, 2006).

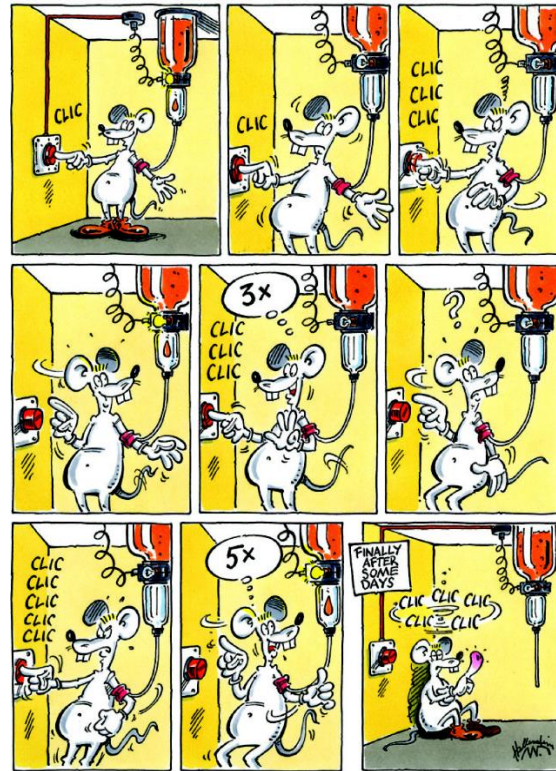


Figura 7. Paradigma auto-estimulación intracraneal. Tomado Sanchis-Segura y Spanagel, 2006.

3.1 ESTIMULACIÓN INTRACRANEAL

Los estudios iniciales que utilizaban el paradigma de la estimulación intracraneal (ICSS) fueron fundamentales para la identificación del circuito de recompensa cerebral (Olds y Milner, 1954). En el modelo ICSS, a los animales se les implantan unos electrodos intracraneales en las estructuras cerebrales relacionadas con la recompensa y son entrenados para mantener un comportamiento operante y obtener un pulso eléctrico a través de los electrodos (Figura 7). Durante estas sesiones se estima el nivel de estimulación eléctrica necesario para inducir la ICSS. Típicamente, los estímulos reforzadores, como las drogas, disminuyen el nivel basal de auto-estimulación, mientras que los estímulos aversivos, como la abstinencia a drogas, lo elevan (Markou y cols., 1993).

3.2 PREFERENCIA Y AVERSIÓN CONDICIONADA DE PLAZA

El modelo de condicionamiento espacial es un procedimiento basado en el condicionamiento clásico que sirve para investigar el efecto de recompensa que producen las drogas de abuso (Katz y Gormezano, 1979). Brevemente, los animales exploran dos compartimentos neutros, pero diferentes entre sí. Uno de ellos estará asociado a los efectos de la droga. Tras el condicionamiento, al animal se le ofrece la oportunidad de elegir entre los dos compartimentos (Figura 8). El tiempo que el animal pasa en el compartimento asociado a la droga es un índice indirecto del valor reforzador de dicha droga. El animal expresará preferencia por aquel contexto donde ha experimentado un refuerzo positivo (preferencia de plaza condicionada o CPP) y evitará aquel contexto que le induzca un estado aversivo (aversión de plaza condicionada o CPA).

El modelo de condicionamiento espacial es una manera sencilla, rápida y económica de evaluar las propiedades placenteras de las drogas. Así, este modelo nos proporciona una herramienta única para comprobar el condicionamiento que puede ejercer una droga y nos da información indirecta sobre sus posibles efectos placenteros o disfóricos (Carboni y Vacca, 2003).

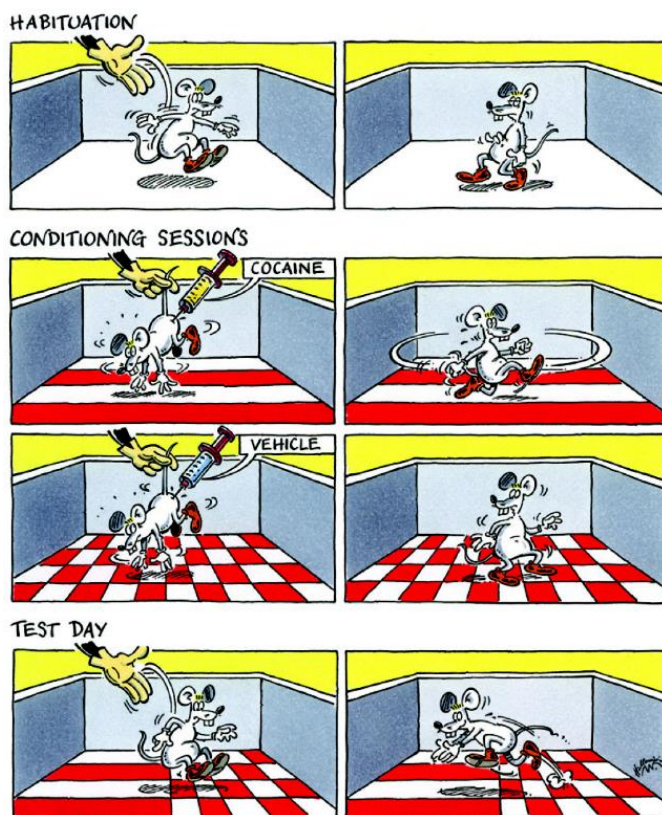


Figura 8. Paradigma preferencia plaza condicionada. Tomado Sanchis-Segura y Spanagel, 2006.

3.3 AUTOADMINISTRACION OPERANTE

El condicionamiento operante nace de la teoría psicológica del aprendizaje desarrollada por Skinner. La base fundamental de este paradigma es la noción de contingencia entre la respuesta que se solicita al animal y el refuerzo que recibe como consecuencia de la misma. De este modo, cuando una situación reforzadora (los efectos de la droga) es contingente con una respuesta (accionar una palanca, introducir el hocico en un agujero), la probabilidad de que aparezca dicha conducta aumenta (Skinner, 1938). El condicionamiento operante es, sin duda, uno de los modelos más utilizados y de mayor capacidad predictiva para el estudio de los procesos neurobiológicos implicados en la adicción. El método de autoadministración más utilizado es por vía intravenosa, pero también se utilizan otras rutas de autoadministración, como la oral y la intracerebral (Figura 9).

El condicionamiento operante ha permitido explicar de una manera fundamental la conducta de autoadministración de las drogas de abuso. Self y Nestler (1995) señalaban que las drogas son clasificadas como reforzadoras si la probabilidad de una respuesta de búsqueda se incrementa cuando es asociada con la exposición de la droga. Así, la autoadministración intravenosa de una droga es el modelo animal por excelencia que predice el potencial de abuso (Collins y cols., 1984).

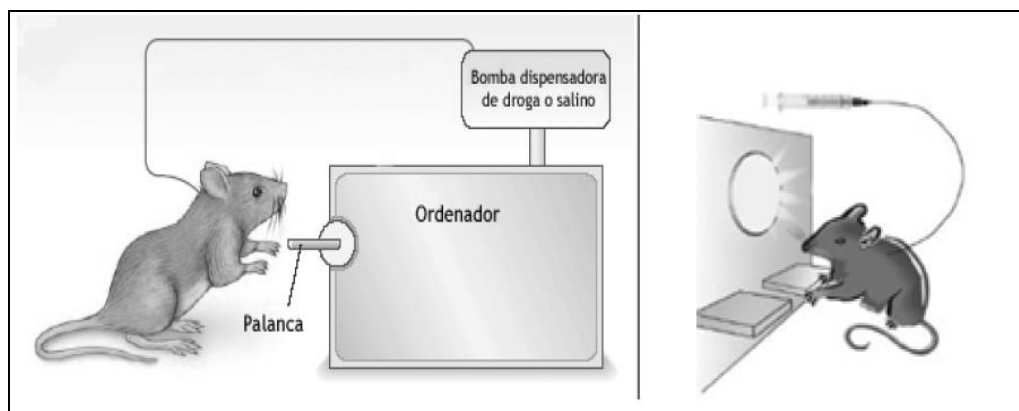


Figura 9. Modelo del condicionamiento operante reforzado por la autoadministración intravenosa de una droga. (Modificado de Cami y Farre, 2003).

Este modelo es una variación de la original “caja de Skinner” donde hay dos manipulandos (p.e.: palanca), la respuesta en el manipulando activo conduce directamente a la liberación de una infusión intravenosa (refuerzo), y la respuesta en el manipulando inactivo no tiene ninguna consecuencia. Con frecuencia, se usan protocolos de tipo “razón fija” en los que el número de respuestas requeridas para obtener el refuerzo es fijo durante cada sesión.

Existen otros protocolos como el de razón variable, intervalo fijo, intervalo variable, patrones de segundo orden, etc. En los programas de intervalo, el refuerzo ocurre tras un periodo de

tiempo fijo o variable, a partir de la última respuesta reforzada. Los protocolos de segundo orden son más complejos, ya que incluyen a la vez dos programas diferentes: uno de los protocolos es intervalo fijo y el otro razón fija.

El paradigma de autoadministración nos permite evaluar de forma directa la eficacia reforzadora de la droga, así como diferentes procesos implicados en la conducta.

4. SISTEMAS IMPLICADOS EN LAS PROPIEDADES ADICTIVAS DE LA MORFINA

4.1 SISTEMAS DOPAMINÉRGICOS

El sistema dopaminérgico es uno de los elementos cruciales en el trastorno adictivo, cuya implicación e importancia han confirmado repetidamente los estudios realizados en este campo. Las dos áreas cerebrales dopaminérgicas más importantes implicadas en el proceso adictivo son, el VTA y el NAc.

EL VTA está formado por un 60-65% de neuronas dopaminérgicas, un 25% de interneuronas GABAérgicas y el resto por interneuronas glutamatérgicas. Las interneuronas GABA expresan MOR (Swanson, 1982; Nair-Roberts y cols., 2008). La administración de morfina excita, indirectamente, las neuronas dopaminérgicas a través de la inhibición de las neuronas GABA que sinaptan en las dendritas dopaminérgicas del VTA. Esta desinhibición de las neuronas dopaminérgicas requiere la activación de los receptores NMDA y AMPA (Jalabert y cols., 2011). En este sentido, estudios previos en animales han evidenciado que la activación aguda de los MOR en animales naïve inhibe las neuronas glutamatérgicas a través del ácido araquidónico que potencia los canales de voltaje dependientes de K^+ . Las neuronas GABA son inhibidas a través de las proteínas G que median la inhibición del Ca^{2+} y la activación de la conductancia de K^+ , y la liberación de GABA es disminuida por la inhibición de la adenosina-monofosfato-cíclico (AMPC), el cual facilita la liberación del neurotransmisor.

Durante el consumo crónico se produce una situación bifásica en la liberación de DA. Por una parte, en el momento de la ingesta existe una elevación de los niveles de DA extracelular, y por otra, al cesar el consumo, se manifiesta una disminución de la liberación endógena de DA, lo que induce a consumir nuevamente. La tolerancia a los efectos inhibitorios de la morfina a través de la activación de MOR localizados en las neuronas GABAérgicas se desarrolla a través de una regulación al alza compensatoria del sistema del AMPC, pero los canales de K^+ en las neuronas dopaminérgicas se regulan a la baja, estableciendo una descarga basal elevada de DA y una actividad explosiva en estas neuronas.

Finalmente, en la abstinencia, la hipofuncionalidad dopaminérgica se asocia a cambios neuroadaptativos que afectan, principalmente, a los circuitos de la recompensa donde la actividad de las neuronas GABAérgicas está aumentada por la mayor actividad de los canales de Ca^{2+} y la menor actividad de los canales de K^+ (Figura 10).

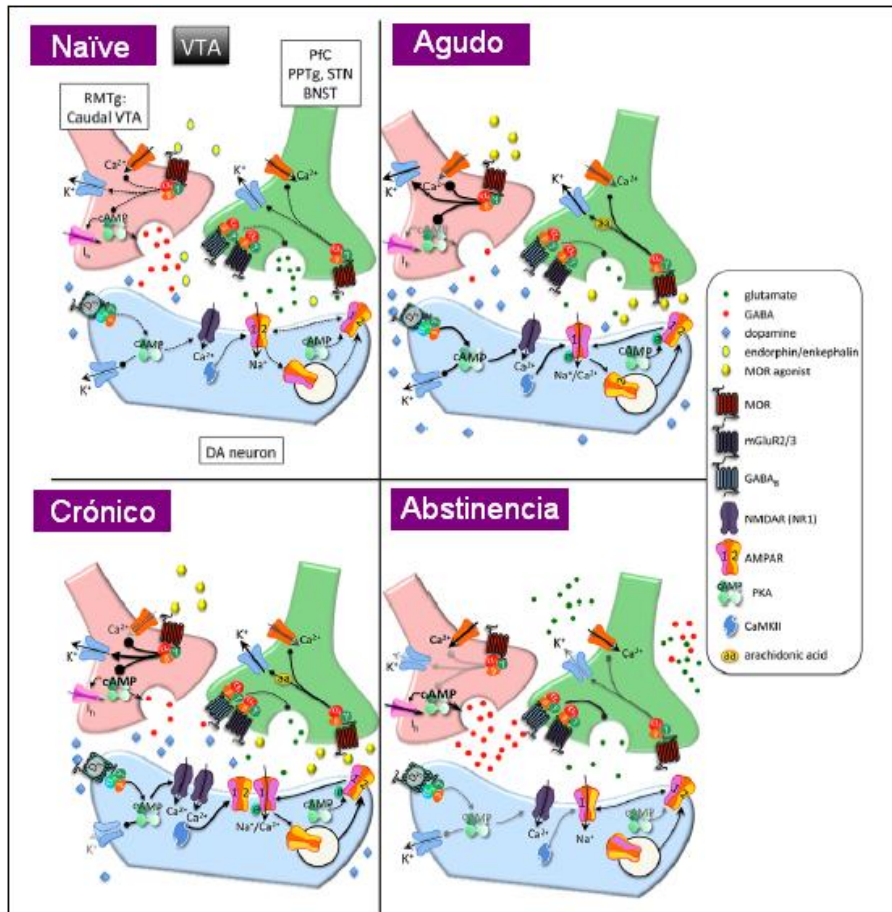


Figura 10. Interacciones entre MOR y las aferencias glutamatérgicas en el VTA. Modificado de Chartoff y Connery, 2014.

El NAc es un núcleo formado por una amplia mayoría de neuronas medianas espinosas (MSNs) (90-95%), siendo las restantes células interneuronas colinérgicas o GABAérgicas (Kawaguchi y cols., 1995). Estas MSNs del NAc pueden ser divididas en dos grupos, las que expresan receptores de la familia D_1 (incluye D_1 y D_5) o de la familia del receptor D_2 (incluye D_2 , D_3 , D_4). En concreto, el receptor MOR está acoplado a proteínas G inhibitorias (G_{ai}) y se localizan en las terminales glutamatérgicas y GABAérgicas y en las MSNs que expresan la familia de receptores D_1 . Por una parte la activación aguda de MOR en animales naïve suprime la liberación de GABA y glutamato a través de la inhibición de los canales de Ca^{2+} y la activación de la conductancia de K^+ , así como, la inhibición de de otros cationes mediada por el AMPc. (Figura 11).

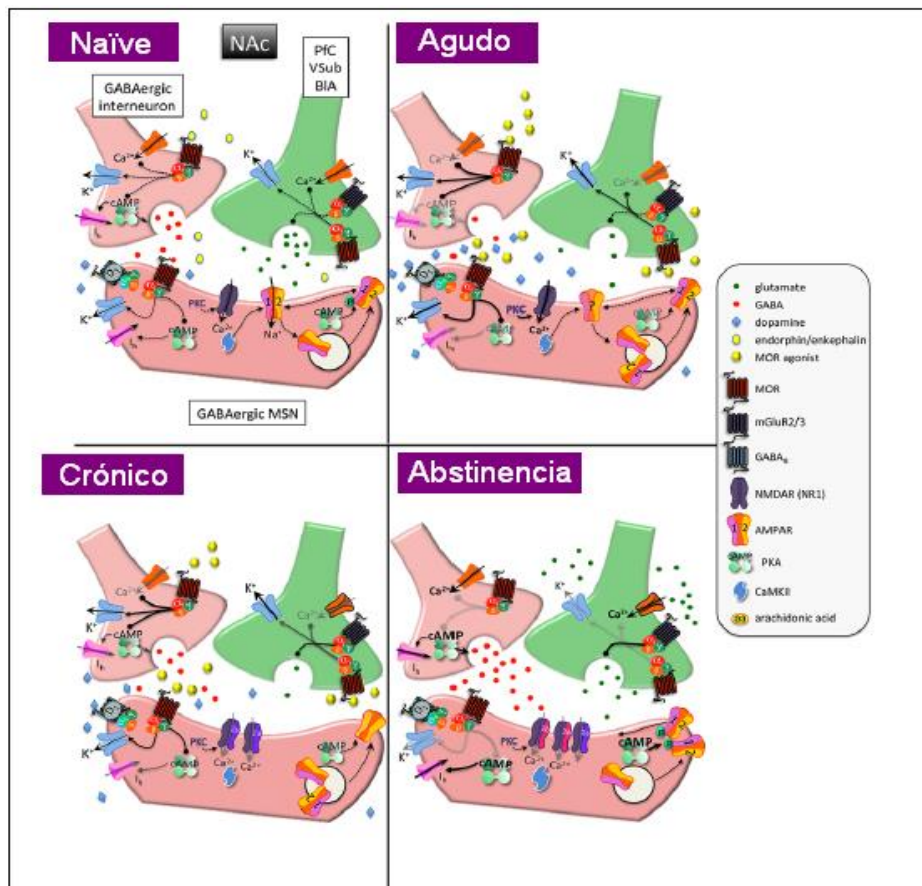


Figura 11. Interacciones entre MOR y las aferencias del NAc. Modificado de Chartoff y Connery, 2014.

Estructuralmente, las fibras aferentes glutamatérgicas hacia las MSNs del NAc hacen sinapsis en las espinas dendríticas modulando la sinapsis de fibras dopaminérgicas mediante conexiones extra-sinápticas. Esta triada de espinas dendríticas, sinapsis glutamatérgica y sinapsis dopaminérgica permite a la DA modular la excitabilidad de las neuronas del NAc (Sesack y Grace, 2010). La excitación cortical que realizan las MSNs en presencia de DA se realiza mediante la activación post-sináptica de los receptores D₁. Los receptores D₁ están acoplados a proteínas Gs, activando así la ruta intracelular del AMPc/ PKA/ elemento de unión de respuesta al AMPc (CREB) o bien de otros factores de transcripción (AP-1, GATA, STAT3, FOS, FOSB, JUN, ATF3, CEPBD, NFKBI y NFKBIZ) y, por tanto, la expresión de genes implicados en la adicción, como C-Fos, pro-DYN, AVP, AVPR1A, CRF-1, CRF-2, FKBP5, GAL, GLRA1, NPY1R y NR3C2. (Levrán y cols., 2014; Bannon y cols., 2014).

4.2 SISTEMAS NORADRENÉRGICOS

Otras estructuras del sistema cerebral de estrés son los núcleos y vías noradrenérgicas, como el NTS-A2, el VLM-A1 y el locus coeruleus (LC-A-6). Por su parte, las neuronas noradrenérgicas del LC-A6 regulan la actividad del VTA y de la CPF, estimulando la liberación de DA durante la administración aguda de drogas (Goodman, 2008). Además, las proyecciones noradrenérgicas

del LC-A6 inervan el BNST y la CeA modulando la alostasis de la amígdala extendida mediante la liberación de CRF en este sistema. El NTS-A2 y el VLM-A1, y en menor medida el LC-A6, envían proyecciones noradrenérgicas al PVN, (Cunningham y Sawchenko, 1988, Cummings y Sewybold, 1988). Además, existen evidencias de que las neuronas de CRF del PVN, la CeA y el BNST, inervan los núcleos noradrenérgicos bulbares comentados (Daftary y cols., 2000), estableciendo un bucle NA-CRF (Koob y Kreek, 2007) regulando, de esta manera, la activación del sistema cerebral de estrés (Figura 12).

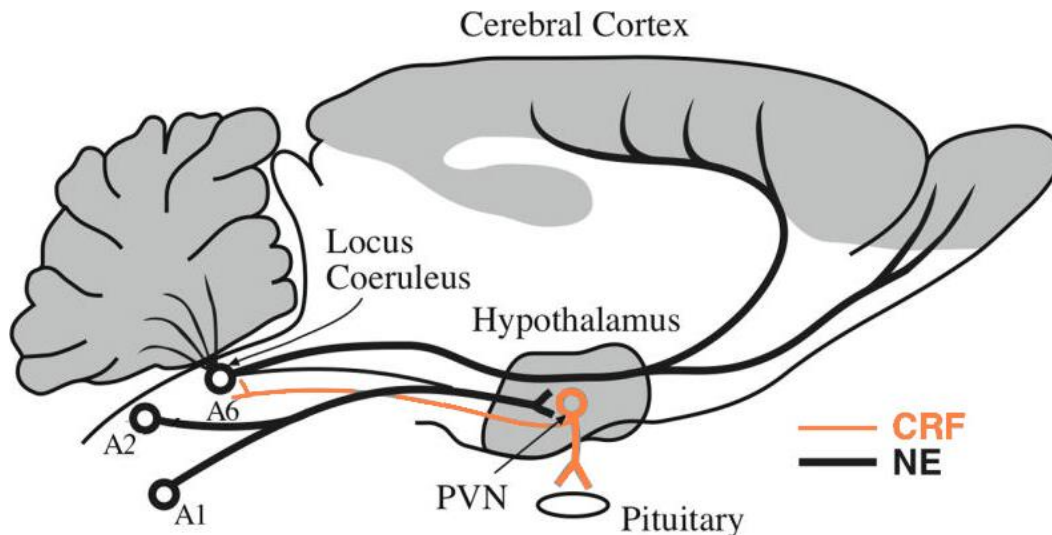


Figura 12. Diagrama que ilustra las dos principales proyecciones del sistema noradrenérgico, el locus coeruleus (LC-A6) y el VLM-A1/NTS-A2 y sus interacciones con el núcleo paraventricular del hipotálamo (PVN) que contiene neuronas del factor liberador de corticotropina (CRF). El loop entre el PVN y el LC-A6 constituye una mutual excitación positiva modulando la respuesta del organismo frente a estrés. Modificado de Dunn y Swiergiel, 2008.

4.3 SISTEMAS DE CRF

En la década de los cincuenta ya se demostró la presencia de un factor hipotalámico que estimulaba la secreción de la ACTH en la adenohipófisis (Guillemin y Rosenberg, 1955; Saffran y Schally, 1955) y que se denominó CRF. El CRF es un neuropéptido de 41 aminoácidos aislado originalmente del hipotálamo ovino (Vale y cols., 1981) que desempeña un papel crucial en la regulación del eje HPA, tanto en situación basal como en respuesta a estrés (Suda y cols., 2004). Su estructura primaria fue determinada en ovinos por Spiess y cols., en 1981 y desde entonces en distintas especies incluyendo humanos, ratas, ratones, cerdos, cabras o ranas. El CRF de ratones y humanos es idéntico aunque ambos difieren ligeramente del ovino (Figura 13). El descubrimiento de otros péptidos con una semejanza estructural significativa con el CRF, especialmente la familia de las urocortinas (urocortinas-1, -2, -3) sugiere un amplio papel de la transmisión nerviosa del CRF no solo en las respuestas conductuales frente al estrés sino también autónomas y periféricas (Bale y Vale, 2004).

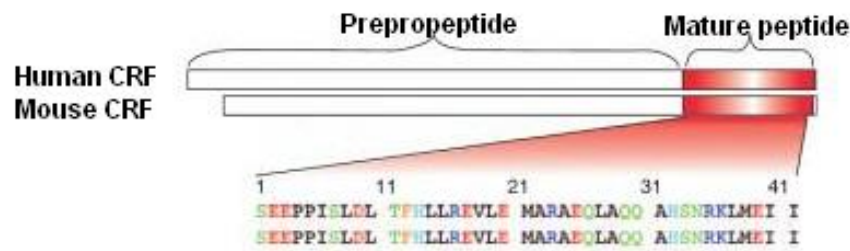


Figura 13. Estructura de aminoácidos del factor liberador de corticotropina (CRF) en humanos y en ratones. Existe gran similitud en el prepropéptido y la misma estructura del péptido maduro en ambas especies animales. Modificado de Huisling y Vale, 2010.

En los últimos años, se ha podido constatar que durante la dependencia a diferentes sustancias de abuso, se produce una estimulación de los sistemas de CRF hipotalámico y extrahipotalámico, lo que se ha postulado como un factor importante en el mantenimiento de la adicción, así como en las recaídas durante el síndrome de abstinencia (Koob y Zorrilla, 2010; Koob y cols., 2014; Wise y Koob, 2014; Zorrilla y cols., 2014).

El CRF se libera en diversos tipos de poblaciones neuronales que participan en procesos de cognición, emoción y en la regulación de funciones autonómicas y endocrinas (Figura 14). La mayoría de neuronas y fibras de CRF aparecen en áreas que regulan la hipófisis, el bulbo olfatorio, el hipocampo y el sistema nervioso autónomo junto con interneuronas corticales (De Souza y Grigoriadis, 2002). Así, la mayor concentración de neuronas de CRF se encuentra en el PVN, en concreto, en la región parvocelular desde donde envían axones terminales a los capilares de la eminencia media. También hay un pequeño grupo de neuronas de CRF que proyectan al tronco encefálico y la médula espinal, con el fin de regular respuestas autonómicas y de estrés, siendo importantes las fibras de CRF en el NTS-A2 y el VLM-A1 y el LC-A6. Otros núcleos hipotalámicos que contienen neuronas de CRF incluyen el área preóptica medial, el núcleo dorsomedial, el núcleo arcuato, el hipotálamo posterior y el núcleo mamilar.

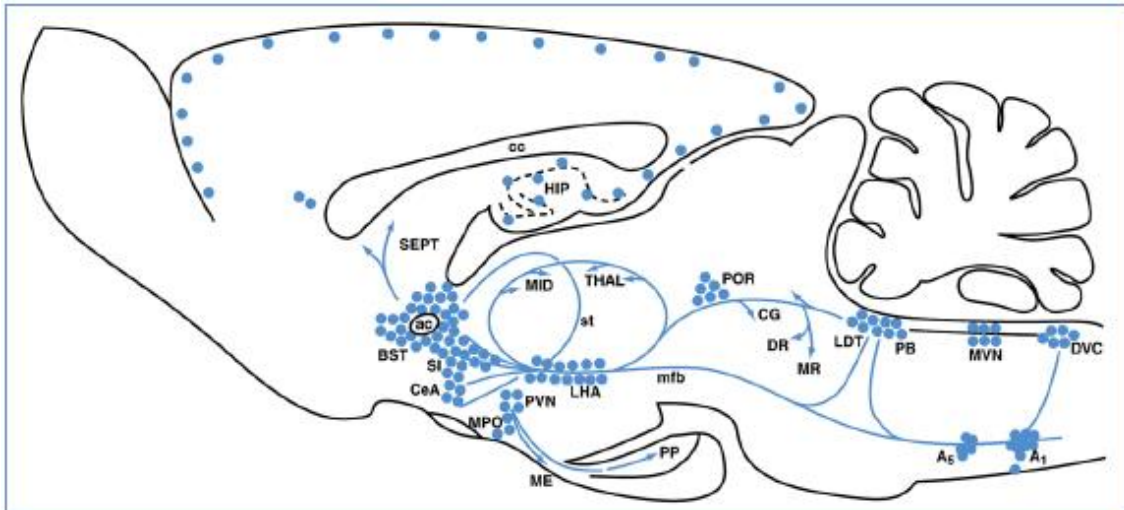


Figura 14. Esquema cerebral sagital que ilustra la localización anatómica de las neuronas (círculos) y fibras (flechas) de CRF que median las respuestas conductuales, autonómicas y endocrinas al estrés. Tomado de Zorrilla y cols., 2014.

Diversas neuronas de CRF se encuentran en las estructuras de la amígdala extendida. En concreto, las neuronas de CRF de la CeA proyectan a la región parvocelular del PVN, el núcleo parabraquial y el tronco encefálico, regulando el comportamiento, la actividad neuroendocrina y la función autonómica. Las neuronas de CRF del BNST envían terminales al tronco encefálico, como el núcleo parabraquial y el complejo vagal dorsal, coordinando la actividad autónoma. Además, las fibras de CRF interconectan la AMY con el BNST y el hipotálamo y llegan al shell del NAc, regulando procesos relacionados con la emoción. Hacia las áreas mesencefálicas, como el VTA, se dirigen gran cantidad de fibras de CRF desde la amígdala extendida. Finalmente, un grupo disperso de neuronas de CRF presentes en la AMY envían unas pocas proyecciones hacia el hipocampo, y el giro dentado (DG).

A nivel de la médula espinal, las neuronas de CRF se localizan en las láminas V-VIII y X y en la columna intermediolateral a nivel torácico y lumbar. Estas fibras ascendentes de CRF juegan un papel relevante en la modulación de la sensibilidad aferente y de la actividad simpática a través de las neuronas pre-ganglionares de CRF.

4.3.1 VIAS NEURONALES DE CRF

Conceptualmente se han dividido las poblaciones neuronales de CRF en dos sistemas cerebrales, uno que regula funciones neuroendocrinas desde el hipotálamo, y otro, extrahipotalámico, que regula funciones nerviosas relacionadas con las emociones, el comportamiento y el control autónomo frente a estrés.

El sistema de CRF hipotalámico constituye el eje neuroendocrino HPA de estrés. Este eje neuroendocrino está formado por el PVN, que se subdivide en la región magnocelular, cuyas

neuronas sintetizan vasopresina y oxitocina; y la región parvocelular, donde se encuentran las neuronas de CRF. La zona medial parvocelular envía proyecciones de CRF a la eminencia media induciendo la liberación endocrina por la adenohipófisis de la ACTH, la que induce, finalmente, la liberación de glucocorticoides (GC) por las glándulas suprarrenales (Figura 15). Los GC liberados ejercen una retroalimentación negativa sobre la liberación de CRF y ACTH. Diversos estudios concluyen que los altos niveles de GC en plasma durante el estrés crónico aumentan la sensibilidad del sistema mesocorticolímbico a los efectos reforzadores de las drogas, debido a la presencia de receptores de GC en el VTA, los cuales facilitarían la liberación de DA (Polter y Kauer, 2014).

El sistema de CRF extrahipotalámico tiene como componente fundamental la amígdala extendida, cuya neuroanatomía fue comentada anteriormente. Numerosos estudios han demostrado la importancia de este sistema en la regulación de las respuestas asociadas con el miedo y el estrés. Sus componentes intervienen, principalmente, en los efectos reforzadores negativos que tienen lugar durante el síndrome de abstinencia, tales como ansiedad, depresión, disforia etc. (Koob y Zorrilla, 2010; Breese y cols., 2011; Logrip y cols., 2011).

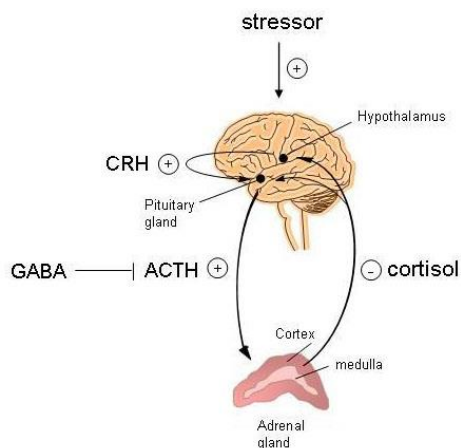


Figura 15: Eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (HPA). En respuesta a estrés o agresión física o psíquica, el hipotálamo libera el factor liberador de corticotropina (CRF), el cual estimula en la hipófisis anterior la liberación de hormona adrenocorticotropa (ACTH). La ACTH estimula en las glándulas suprarrenales la secreción de cortisol. El exceso de cortisol actúa inhibiendo la liberación de CRF y ACTH mediante un feedback negativo. Tomado de Ross y cols., 2013.

4.3.2 CRF Y SUS RECEPTORES

Diversos estudios moleculares han demostrado la existencia de tres tipos de receptores de CRF, siendo nombrados como receptores de CRF-1, -2 y -3 (CRF-1, CRF-2 y CRF-3). Los tres receptores pertenecen a la subfamilia Secretina/B de receptores acoplados a proteínas G y todos tienen un dominio extracelular de unión a hormonas (Langerstrom y Schioth, 2008). Los receptores de CRF-1 y CRF-2 han sido identificados en humanos, roedores y otros mamíferos; mientras que el receptor CRF-3 tan solo ha sido identificado en el pez gato o *Silurus glanis* (Arai y cols., 2001).

La estructura general de los receptores de CRF (Figura 16) comprende un dominio extracelular N-terminal (ECM 1), tres hélices en el dominio extracelular (EC 2-4), siete dominios transmembrana (TMD 1-7), un dominio intracelular formado por tres hélices (ICD 1-3) y un C-terminal (Hoare, 2005).

Estos receptores tienen como ligando principal el CRF pero se han identificado unos péptidos análogos con gran afinidad por los mismos, llamados urocortinas.

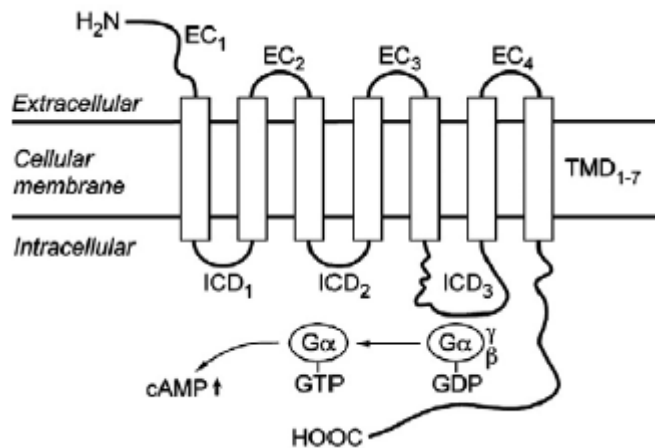


Figura 16. Estructura general de los receptores de CRF. El dominio extracelular N-terminal (EC1) presenta el mayor sitio de unión del ligando, mientras que los dominios extracelulares (EC2-4), y los 7 dominios transmembrana (TMD1-7) participan parcialmente en la unión del ligando. Tomado de Yang y cols., 2010.

El ligando activa el receptor acoplado a la proteína G_s mediante la unión al extremo N-terminal y a los segmentos transmembrana (Grace y cols., 2004), transduciendo sus señales a las células mediante la vía de la AC e incrementando la producción de AMPc. No obstante, recientemente se ha podido constatar su capacidad para interactuar con otras proteínas G, como G_q y G_{i/o}. De esta forma, los receptores de CRF pueden modular distintas rutas de señalización intracelular, como las PKA, PKC y la concentración intracelular de Ca²⁺, tanto en la exposición aguda como crónica a drogas y durante el síndrome de abstinencia (Figura 17).

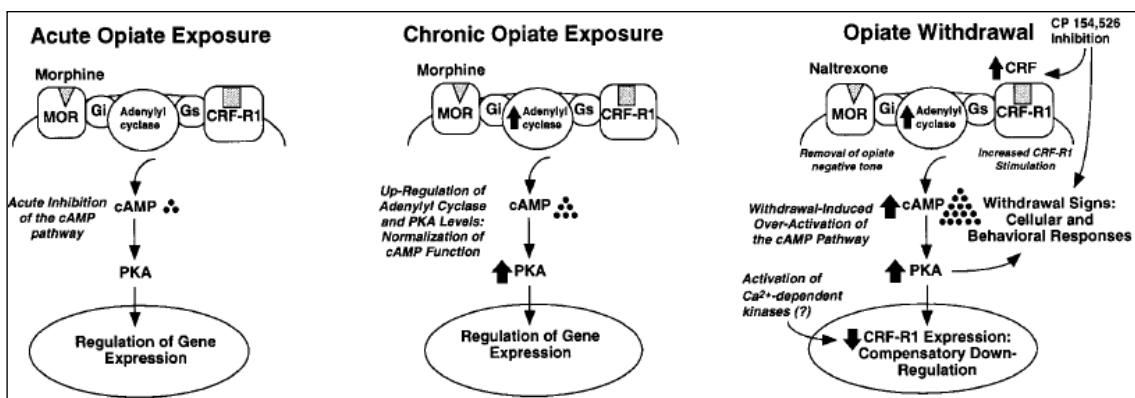


Figura 17. Vías de señalización del receptor de CRF-1 durante la exposición aguda, crónica y la abstinencia a opiáceos. Mientras en la exposición aguda se produce una inhibición del AMPc, a medida que el consumo se hace crónico, se restablece su activación y durante la abstinencia hay un aumento desmesurado de este segundo mensajero y de la PKA. Tomado de Grace y cols., 2004.

Por una parte, entre las diferentes especies animales se han identificado ocho variantes alélicas (a, b, c, d, e, f, g y h) del receptor de CRF-1, formadas de 415 a 420 aminoácidos (Perrin y cols., 1993). Sin embargo, el receptor CRF-1(a) parece ser la única forma activa de las ocho variantes (Grammatopoulos y Chrousos, 2002). Por su parte, del receptor de CRF-2 existen tres variantes: CRF-2(a) de 411-413 aminoácidos, CRF-2(b) de 431-438 aminoácidos, y CRF-2(c) de 397 aminoácidos (Spiess y cols., 1998).

En cuanto a su distribución en el organismo, es distinta para cada uno de los dos tipos (Figura 18). El receptor de CRF-1 es abundante en el SNC, preferentemente en la adenohipófisis (Bale y Vale, 2004), el hipocampo, córtex, cerebelo, AMY y bulbo olfatorio (Palchadhuri y cols., 1998). Estudios recientes señalan la presencia moderada en la aurícula izquierda y ambos ventrículos cardíacos, de este receptor en humanos y roedores (Kimura y cols., 2002).

En cuanto al receptor de CRF-2 y sus variantes, muestran una distinta distribución entre humanos y roedores. En ratas y ratones, el receptor de CRF-2(a) se localiza preferentemente en el SNC, principalmente en el septum lateral, el hipotálamo ventromedial y el plexo coroideo, pero en cambio, su presencia en la hipófisis es testimonial (Hauger y cols., 2003). El receptor de CRF-2(b) se detecta principalmente en las arteriolas cerebrales y en tejidos periféricos, como el corazón, la vasculatura lisa, los pulmones, el músculo esquelético, el tracto gastrointestinal, los ovarios y los testículos (Hauger y cols., 2003; Spiess y cols., 1998). En contraste, en humanos el receptor de CRF-2(a) se expresa tanto en el SNC como en tejidos periféricos y en las cuatro cámaras cardíacas, mientras que el receptor de CRF-2(b) se encuentra principalmente en el cerebro y en la aurícula izquierda (Kimura y cols., 2002; Perrin y Vale., 1999). Actualmente, el receptor de CRF-2(c) tan solo ha sido localizado en algunas regiones como el hipocampo y en menores cantidades en la AMY (Kostich y cols., 1998).

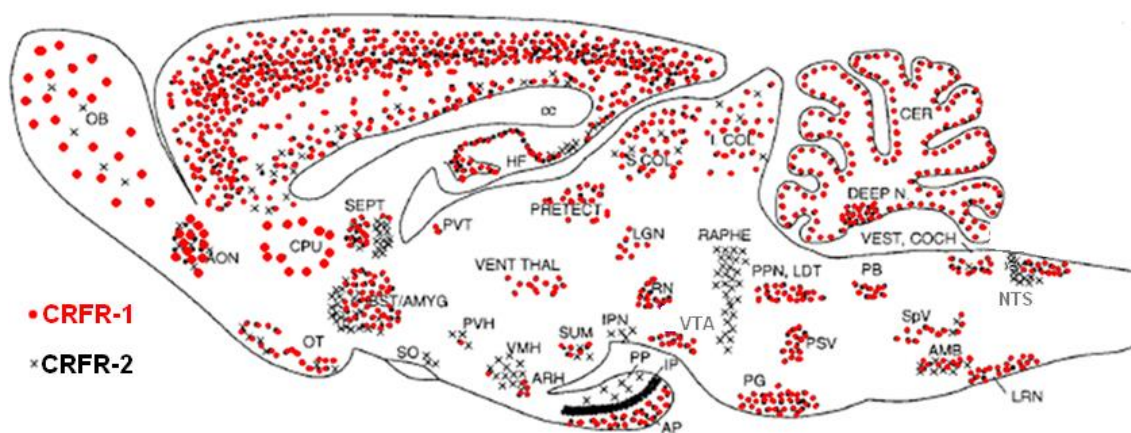


Figura 18. Distribución de los receptores de CRF tipo 1 y 2 en el cerebro de ratón. Modificado de Van Pett y cols., 2000)

Los receptores de CRF tienen diversos ligandos de unión que modulan su actividad. Se ha demostrado que los dominios extracelulares del receptor de CRF-1, en concreto, el dominio EC-1 (N-terminal), es determinante para la unión al receptor de agonistas y antagonistas (Perrin y cols., 2006), mientras que los dominios EC-2, EC-4 y EC-3-TMD5 contribuyen a dicha unión. La región N-terminal del CRF, aunque se une a la región TMD-5 con una débil afinidad, es la responsable de la activación del receptor. Además, las hélices TMD-3 y TMD-5 son responsables de la unión de los ligandos no peptídicos (Spiess y cols., 1998). El hecho de que las regiones EC-1-4 de ambas variantes del receptor de CRF-2 tengan una menor homología con las mismas regiones del receptor de CRF-1, tal vez, explique por qué el receptor de CRF-2 se une preferentemente a los análogos de CRF sauvagina y urocortina 2, y no tanto al propio CRF (Palchaudhuri y cols., 1998).

En cuanto a sus funciones, numerosos estudios han evidenciado el importante papel que desempeñan los receptores de CRF en la etiología de diversos procesos patológicos. En concreto, se ha propuesto su implicación en diversos desórdenes asociados con el estrés, como la ansiedad y la depresión. Además diversos estudios, han constatado que la activación del sistema neuronal de CRF está involucrada en la sintomatología del síndrome de abstinencia a diferentes sustancias de abuso, como cocaína, anfetaminas, alcohol y morfina. Se ha propuesto que el receptor de CRF-1 es el que media la secreción de ACTH, así como los efectos ansiogénicos que aparecen durante el síndrome de abstinencia. Estos datos son avalados por estudios en los que la administración de antagonistas del receptor de CRF-1 (Tabla 3) atenúa la activación del eje HPA y los signos de abstinencia a opioides (Lu y cols., 2000; Stinus y cols., 2005; Contarino y Papaleo, 2005; Navarro-Zaragoza y cols., 2010). Respecto a las funciones del receptor de CRF-2, estudios recientes apuntan a su implicación en el síndrome de abstinencia a morfina (Papaleo y cols., 2008; Ingallinesi y cols., 2012) y la recaída a drogas como la cocaína (Williams y cols., 2013), aunque su función ha sido más estudiada como posible diana terapéutica en el infarto de miocardio, pues se ha demostrado que las urocortinas, mediante la activación del receptor de CRF-2, producen un efecto vasodilatador e inotrópico (Bale y cols., 2004; Yang y cols., 2010).

Tabla 3. Efectos de los antagonistas de receptores de CRF-1 en diversos procesos de la adicción a drogas de abuso como cocaína, opioides, alcohol, nicotina o cannabis. Modificado de Koob, 2009.

Drug	CRF Antagonist Effects				
	Withdrawal-induced changes in extracellular CRF in CeA	Withdrawal-induced anxiety-like or aversive responses	Baseline self-administration or place preference	Dependence-induced increases in self-administration	Stress-induced reinstatement
Cocaine	↑	↓	—	↓	↓
Opioids	↑	↓	—	↓	↓
Ethanol	↑	↓	—	↓	↓
Nicotine	↑	↓	—	↓	↓
Δ^9 -THC	↑	↓			

—, no effect; blank entries indicate not tested. CeA, central nucleus of the amygdala.

4.3.3 IMPLICACIÓN DEL CRF Y SUS RECEPTORES EN LA ADICCIÓN

Los sistemas de CRF juegan un papel relevante en las tres etapas del ciclo de la adicción pero, en particular, en la última etapa o del estado afectivo negativo/abstinencia. Tras los efectos reforzadores positivos, regulados por la DA en el VTA, se produce un proceso de contra-regulación para mantener la homeostasis, produciendo distimia y un estado de tensión/vigilia a través de la regulación a la baja del sistema de recompensa y una regulación al alza del sistema cerebral de estrés, incluyendo CRF y NA en la amígdala extendida (Koob y Zorrilla, 2010; Breese y cols., 2011; Logrip y cols., 2011). Con la repetición del ciclo intoxicación/abstinencia, el proceso de alostasis predomina sobre el proceso de recompensa y, en consecuencia, el sujeto necesita consumir más droga para mantener la eutimia, aumentando progresivamente el CRF en las distintas áreas cerebrales (Figura 19). Este proceso es mediado por el receptor de CRF-1 en la amígdala extendida aumentando los niveles de CRF en la CeA y el BNST durante la abstinencia a alcohol (Roberto y cols., 2010; Olive y cols., 2002), nicotina (George y cols., 2007), cocaína (Richter y Weiss, 1999), opioides (Weiss y cols., 2001) y cannabis (Rodríguez de Fonseca y cols., 1997).

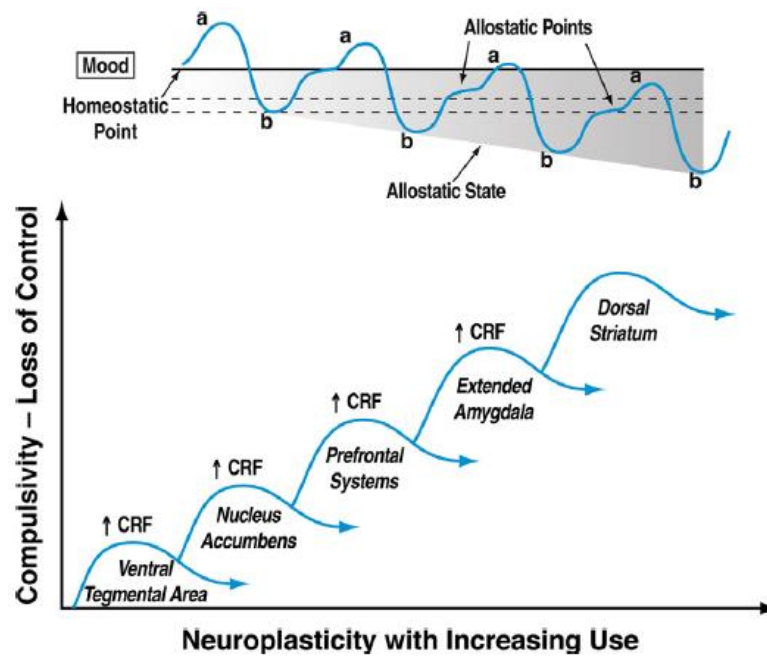


Figura 19. La progresión del uso compulsivo de la droga altera la homeostasis a través de una regulación al alza de la actividad de CRF en múltiples áreas cerebrales, como el VTA, el NAc, la CPF y la amígdala extendida. Tomado de Zorrilla y cols., 2014.

El proceso de contra-regulación también aumenta la activación del eje HPA, a través de los receptores de CRF-1, elevando los niveles de ACTH y GC durante la abstinencia de todas las drogas de abuso. Los GC, pueden activar y sensibilizar los sistemas de CRF de la amígdala extendida, interaccionando así, los sistemas de CRF neuroendocrinos y extra-hipotalámicos.

En este sentido, diversos estudios han descrito niveles elevados de CRF y CRF-1 tras semanas de abstinencia a etanol o morfina en modelos animales (Zorrilla y cols., 2001; Sommer y cols., 2008) y la disminución de la ansiedad tras la administración de antagonistas de receptor de CRF-1 (Overstreet y cols., 2002; Zhao y cols., 2007).

Así mismo, se ha establecido un papel del CRF/CRF-1 en la recaída a drogas de abuso. Por ejemplo, antalarmin y MTIP, dos antagonistas del receptor de CRF-1, atenuaron la recaída inducida por estímulos estresantes como el estímulo eléctrico en ratas dependientes de alcohol, cocaína, opiáceos, nicotina y metanfetamina (Lu y cols., 2005; Bruijnzeel y cols., 2009; Nawata y cols., 2012; Roberto y cols., 2010). En todos los casos hubo un aumento en la neurotransmisión de los sistemas de CRF en la amígdala extendida inhibido con los antagonistas del receptor de CRF-1 (Hansson y cols., 2006; Francesconi y cols., 2009).

Por otra parte, estudios recientes apuntan a un papel importante del receptor de CRF-2 en el síndrome de abstinencia a opiáceos, pues sus antagonistas inhiben la aparición de los signos de abstinencia (Papaleo y cols., 2008). Además, ratones knockout del receptor de CRF-2 no

sufrieron disforia durante la abstinencia a opioides y mostraron niveles basales de ACTH y corticosterona. En conjunto, el receptor de CRF-2 podría mediar la respuesta del CRF extra-hipotalámico que subyace a la abstinencia a opiáceos a través de una regulación pre-sináptica positiva de la síntesis y liberación de CRF (Ingallinesi y cols., 2012).

En cuanto a estudios en humanos, hasta la fecha se han realizado unos pocos ensayos clínicos utilizando antagonistas del receptor de CRF-1 para tratar la ansiedad y la depresión mayor (Pexacerfont y CP-316,311 respectivamente) con resultados mixtos pero menos eficaces que los tratamientos médicos aprobados actualmente, como benzodiazepinas o antidepresivos inhibidores de la recaptación de serotonina (Coric y cols., 2010; Binneman y cols., 2008). Actualmente, se están desarrollando algunos ensayos clínicos con antagonistas del receptor CRF-1 (Figura 20) para tratar los problemas relacionados con la adicción. El laboratorio farmacéutico GlaxoSmithKline y el National Institutes of Health (NIH) están evaluando si la molécula verucerfont puede reducir el estrés y ansiedad producidos durante el craving en mujeres adictas a alcohol (NCT01187511). Además, el laboratorio Bristol Myers Squibb y el NIH están probando si pexacerfont puede prevenir el estrés inducido por el craving en pacientes a dieta de comida palatable (NCT01656577), el craving y la abstinencia en fumadores (NCT01557556), y el estrés inducido por el craving en mujeres alcohólicas que sufren de ansiedad (NCT01227980) (Bailey y cols., 2011; Zorrilla y cols., 2013).

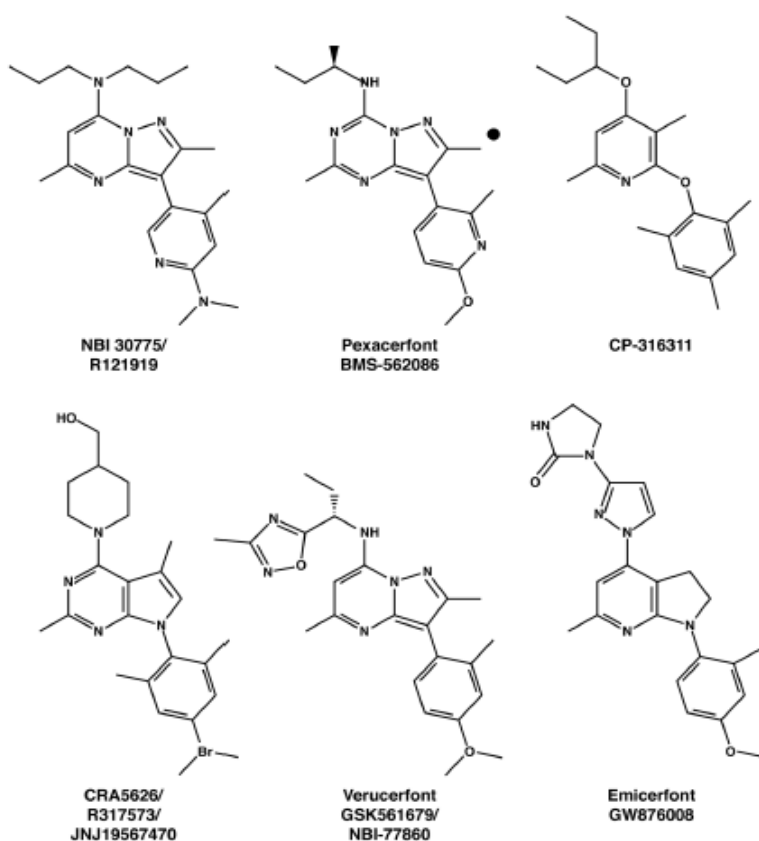


Figura 20. Estructura química de los diferentes prototipos de antagonistas del receptor de CRF-1 en estudio. Tomado de Zorrilla y cols., 2013.

4.4 IMPLICACIÓN DE LOS GLUCOCORTICOIDES

Los GC secretados como consecuencia de la activación del eje HPA juegan un papel importante en los procesos que permiten al organismo adaptarse a los agentes estresantes (McEwen, 1998). La administración aguda de sustancias de abuso en animales activa el eje HPA y podría, en primer lugar, facilitar la actividad en los circuitos de recompensa y como resultado facilitar la adquisición de la búsqueda de droga (Piazza y Le Moal, 1997). En relación con el CRF, estos cambios agudos son desregulados con la administración repetida de cocaína, opioides, nicotina y alcohol (Koob y Kreek, 2007). Actualmente, se cree que una respuesta atípica al estrés podría contribuir a la persistencia y recaída en el ciclo de la adicción (Kreek y Koob, 1998).

Todas las drogas de abuso activan el eje HPA durante la administración de droga y también en la abstinencia aguda a las mismas. Sin embargo, a medida que el ciclo de consumo y abstinencia continua, las respuestas del eje HPA muestran tolerancia, pero la exposición del cerebro a niveles elevados de glucocorticoides continua causando profundos efectos en los sistemas cerebrales de estrés extra-hipotalámicos. Por tanto, a pesar de que la elevación transitoria de los GC es beneficiosa para el organismo, las elevaciones repetidas o prolongadas, como resultado de estrés crónico, producen una serie de condiciones patológicas que contribuyen a la adicción. A nivel celular, median efectos genómicos a través de regulaciones transcripcionales (de Kloet y cols., 2008) y efectos rápidos no genómicos mediante una gran variedad de mecanismos que incluyen receptores acoplados a proteínas G, que regulan la producción de cannabinoides endógenos (Tasker y cols., 2006) y la inhibición de la monoamina transportadora 3 sensible a GC (Gasser y cols., 2006).

Los receptores de GC se expresan en los circuitos neuronales implicados en el estrés, incluyendo neuronas de CRF del BNST (Cintra y cols., 1987), neuronas DA en el VTA (Harfstrand y cols., 1986), interneuronas de la CPF (Ostrander y cols., 2003) y en diversos tipos neuronales del NAc (Zoli y cols., 1990). En estas regiones, se ha demostrado la implicación de los GC en diversos procesos de adaptación neuronal a estrés incluyendo, expresión de mRNA de CRF en el BNST (Schulkin y cols., 1998), aumento de glutamato en el VTA (Saal y cols., 2003), cambios en la morfología dendrítica, en la neurotransmisión dopaminérgica en la CPF (Butts y cols., 2011) y glutamatérgica en el NAc (Campioni y cols., 2009).

Por tanto, los GC están asociados a una alta respuesta a la novedad, facilitando la recompensa durante el uso inicial de la droga y también podrían potenciar las adaptaciones neuronales en el cerebro, en concreto, en los sistemas que conforman la amígdala extendida donde

contribuyen a la alteración de la homeostasis que desencadena la patología asociada con el abuso de sustancias.

4.5 ALTERACIONES EN LOS PATRONES DE EXPRESIÓN GÉNICA

La adicción es el resultado de cambios en los patrones de expresión génica que llevan a modificaciones en el funcionamiento y la homeostasis neuronal y a su vez, el funcionamiento de los circuitos neuronales que conforman, desarrollando la conducta típica adictiva (Nestler y Aghajanian, 1997). Existen numerosos mecanismos descritos mediante los cuales la exposición repetida a drogas altera la expresión génica de las neuronas en las áreas cerebrales, como cambios en la velocidad de transcripción de genes, modificaciones del proceso de síntesis del ácido ribonucleico mensajero (RNAm), alteración del proceso de maduración de proteínas y del tráfico de las mismas a sus lugares intracelulares (Nestler, 2004).

CREB, es el factor de transcripción que regula los efectos de la ruta del AC/AMPC/PKA sobre la expresión génica. La PKA actúa fosforilando el residuo de Serina (Ser) 133 de CREB, lo cual provoca la dimerización de este factor de transcripción y la consiguiente unión de estos a la secuencia promotora CRE de la cadena de ácidos desoxinucleicos (DNA), regulando así la expresión de diversos genes (Figura 21). Además, CREB puede ser fosforilado de la misma manera mediante otras protein kinasas como las kinasas dependientes de calcio (CaMK), PKC, kinasa reguladora de la señal extracelular (ERKs) o las MAPK (Mayr y Montminy, 2001).

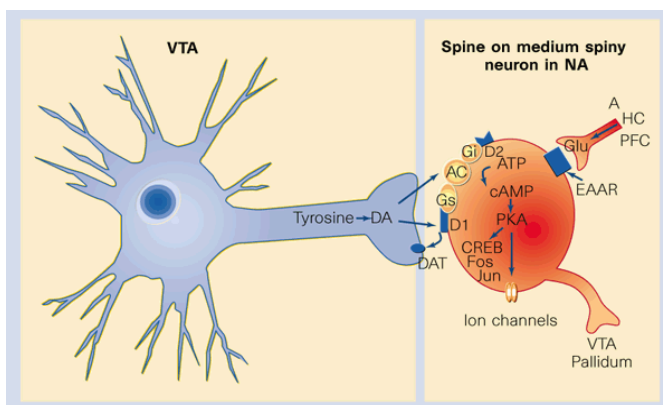


Figura 21. Esquema ilustrativo de cómo las drogas fosforilan CREB y heterodimerizan Fos o Jun modificando la expresión génica de las neuronas. Tomado de Maze y cols., 2010.

CREB fue descrito por primera vez en 1987 como un factor de transcripción de respuesta al cAMP, regulador del gen de somatostatina (Montminy y Bilezikjian, 1987) y, desde entonces se ha descubierto que regula la transcripción de diversos genes implicados en la adicción, entre los que se encuentran, C-Fos, el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), Tirosina hidroxilasa (TH), y múltiples neuropéptidos, encefalina, el factor de crecimiento nervioso (BGF) y el CRF (Carlezon y cols., 2005). A su vez, CREB interviene en los procesos de aprendizaje

condicionado mediados por la AMY (Nonaka y cols., 2014), en procesos de memoria a largo plazo mediados por el estriado y el hipocampo (Shu y cols., 2014; Bambah-Mukku y cols., 2014) y plasticidad neuronal (Madsen y cols., 2012). Finalmente, ratones knockout para CREB muestran menor dependencia y síndrome de abstinencia (Maldonado y cols., 1996).

Entre los genes cuya regulación es regulada por CREB, se encuentran los genes de expresión inmediata (IEG), cuya expresión es inducida rápidamente tras la exposición a determinados estímulos. Estos genes son de gran importancia en el desarrollo de la adicción, en concreto las familias de IEG Fos y jun que codifican diversos factores de transcripción. La familia Fos incluye c-Fos, FosB, Fra-1 y 2 y Δ FosB (Nestler, 2012). Los miembros de la familia Fos heterodimerizan con factores de transcripción de la familia Jun (c-Jun, JunB) formando el complejo proteína activadora-1 (AP-1) que actúa sobre la transcripción génica uniéndose al DNA.

La administración aguda de diversas drogas de abuso induce la expresión de varias proteínas de las familias comentadas anteriormente, de una forma rápida y transitoria, que dura entre 8 y 12 h, regresando a niveles basales previos. En cambio, otras proteínas como Δ FosB, son muy estables por lo que va acumulándose con la administración repetida de droga, llegando a ser una proteína predominante en el NAc. Además, estas proteínas permanecen elevadas, meses después, aun cuando el sujeto cesa el consumo de la sustancia adictiva (Chen y cols., 1997). Son este tipo de proteínas las que producen cambios permanentes en los sujetos adictos (Chao y Nestler, 2004).

4.6 PAPEL DE LAS PROTEINAS ANTIOXIDANTES EN LA ADICCIÓN

Actualmente está siendo investigada la relación entre proteínas antioxidantes y numerosos factores de transcripción, no solo en la adicción sino también en enfermedad de Parkinson o Alzheimer, en las cuales se han encontrado niveles disminuidos de proteínas redox, como la tioredoxina-1 (Trx-1) (Liu y cols., 2013; Gil-Bea y cols., 2012). La Trx-1 se encuentra en casi todos los organismos y es esencial para la vida. Es una enzima oxidorreductasa de 12 kD que contiene un sitio activo ditiol-disulfuro. Es ubicua y se encuentra en muchos organismos desde plantas y bacterias a mamíferos. Se han identificado múltiples sustratos *in vitro* para la Trx-1, incluyendo ribonucleasas, coriogonadotropinas, factores de coagulación, receptores de GC e insulina. La Trx-1 tiene varias actividades biológicas que incluyen la regulación de factores de transcripción, la unión de factores al DNA y la neuroprotección. En concreto, actúa facilitando la reducción de otras proteínas a través de un intercambio tiol-disulfuro en la cisteína.

La Trx-1 es regulada al alza por las ERKs y por la vía CREB-CRE. La Trx-1 es necesaria para que la señalización de los factores de crecimiento nervioso a través de CRE expresen c-Fos. Por tanto, la Trx-1 es un cofactor neurotrófico que ejerce un papel citoprotectivo en el cerebro (Masutani y cols., 2004). La Trx-1 puede translocarse al núcleo, interactuar con factores de transcripción, como NF- κ B, fosforilar CREB induciendo la expresión de diversos genes como lo de la enzima antiapoptótica Bcl-2 y la antioxidante MnSOD, aumentando de esta manera la supervivencia de las células en el cerebro y el corazón (Chiueh y cols., 2005). Estudios recientes han implicado la Trx-1 en la adicción a drogas. En concreto, la administración de metanfetamina incrementa la expresión de la Trx-1, lo cual regula la actividad de CREB (Lv y cols., 2013). Además, estudios con cultivos celulares han demostrado que la administración de morfina incrementó los niveles de Trx-1 en el núcleo celular (Luo y cols., 2012a,b). Otros estudios, han sugerido que la epinefrina es capaz de inducir la expresión de Trx-1 a través de la activación de receptores β y su cascada de señalización AMPc/PKA/DARPP-32, promoviendo la expresión de CREB (Jia y cols., 2013).

5. ALTERACIONES CARDIACAS DURANTE LA ADICCIÓN: IMPLICACIÓN DEL CRF

Las sustancias de abuso, no solo causan alteraciones moleculares a nivel del SNC, sino que también alteran la regulación de los órganos periféricos, como el corazón, y causan alteraciones en proteínas, receptores y vías de señalización. Así, entre las causas de muerte de los pacientes adictos a drogas de abuso, se encuentra la arritmia, el infarto de miocardio y la muerte súbita, especialmente en consumidores de cocaína, metanfetaminas (Simonsen y cols., 2011) y heroína, con una tasa de mortalidad anual de 1-5% de los adictos (Fernández-Miranda y cols., 1999; Nerantzis y cols., 2013).

Actualmente, es conocido que el CRF puede modular la respuesta del sistema nervioso autónomo (Dunn y Berridge, 1990). Los estímulos procedentes del entorno estimulan la corteza cerebral y el hipocampo, activando áreas del hipotálamo, en concreto el PVN, que es un núcleo regulador de funciones endocrinas, vegetativas y conductuales. Como hemos visto, el PVN regula la activación de las áreas bulbares mediante la liberación de CRF en el NTS-A2 y el VLM-A1, siendo el bulbo la principal área cerebral encargada de la regulación simpática cardíaca (Nakamura y Sapru, 2009; Kc y Dick, 2010; Dampney y cols., 2002). Además, el PVN recibe inervación de estructuras límbicas relacionadas con las emociones como la CeA, el VTA o la CPF, pudiendo estar implicadas en la respuesta cardíaca a factores externos del entorno. Por tanto, a nivel del SNC, el CRF produce una activación del sistema nervioso simpático estimulando la liberación de adrenalina en la glándula suprarrenal y la transmisión de NA en el hígado, el lecho vascular y el corazón (Kang y cols., 2011) (Figura 22). A nivel cardíaco, produce

un incremento en la presión arterial media y de la frecuencia cardiaca (Matínez-Laorden y cols., 2014).

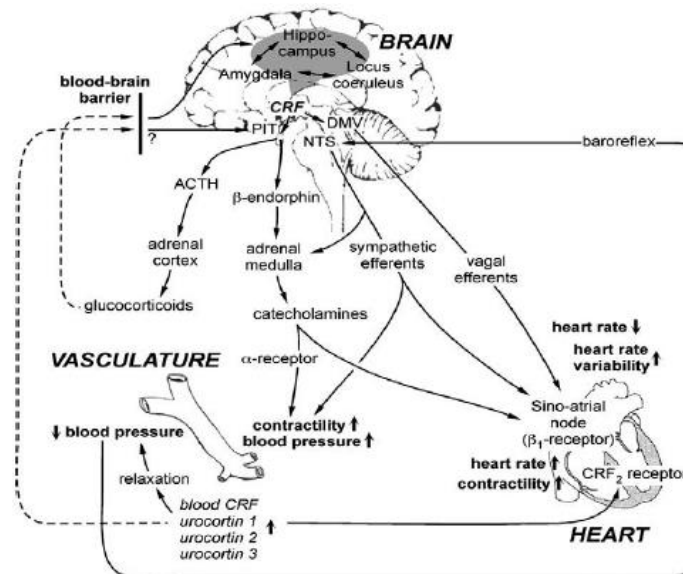


Figura 22. Inervación cardiaca simpática. Tomada de Yang y cols., 2010

Durante la adicción a morfina, se han encontrado alteraciones en la expresión de diferentes proteínas como la TH o las proteínas de choque térmico (HSP) (Martínez-Laorden y cols., 2012, 2014; Drastichova y cols., 2011). También se han descrito alteraciones en proteínas implicadas en vías de señalización celular como las PKC, las ERKs o las MAPK p-38 (Drastichova, 2012; Almela y cols., 2006; 2007).



OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Diferentes estudios anatómicos, funcionales y de comportamiento sugieren un papel para los sistemas de CRF en los procesos adictivos. Con el fin de buscar dianas terapéuticas que pudieran ser de utilidad para el tratamiento de las adicciones el principal objetivo de este estudio se ha centrado en investigar la implicación de los sistemas de CRF y de los receptores de CRF1 en los efectos reforzantes positivos y negativos de la adicción a morfina, y en los cambios celulares y moleculares observados en diferentes estructuras cerebrales relacionadas con los sistemas de recompensa, los circuitos del estrés y la memoria. Para ello, utilizamos ratones genéticamente modificados en los cuales el receptor de CRF1 ha sido borrado (knockdown, KO) y ratones tratados con un antagonista selectivo de los receptores de CRF1. Como modelos de comportamiento utilizamos la preferencia condicionada de plaza (CPP) y la aversión condicionada de plaza (CPA), paradigmas de condicionamiento pauloviano en los que las propiedades reforzantes o aversivas de un fármaco, inicialmente relacionadas con un estímulo ambiental neutro, originan a lo largo del condicionamiento que este estímulo ambiental adquiera propiedades motivacionales, bien de atracción o aversión, cuando el animal es posteriormente expuesto.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Nuestro primer objetivo tuvo como finalidad establecer la posible participación del sistema cerebral del estrés en los efectos reforzantes de morfina. En los animales que presentan CPP a morfina y en sus controles evaluamos: a) la actividad del eje hipotálamo-hipófisis adrenal (HPA) mediante la determinación de los niveles plasmáticos de ACTH y corticosterona (radioinmunoanálisis); b) los posibles cambios en el número de neuronas de CRF y en la activación de las mismas (doble inmunocitoquímica CRF/CREB) en algunas de las estructuras que conforman el sistema cerebral del estrés hipotalámico (PVN) y extra-hipotalámico (CeA y BNST, inmunocitoquímica); y c) las proyecciones de las neuronas de CRF que inervan el sistema mesolímbico (NAc y VTA) y el NTS-A2, principal área noradrenérgica que inerva los circuitos del estrés. Todos estos parámetros también se analizaron en un grupo de animales que recibían morfina o salino fuera de la caja de comportamiento (no condicionados) (Artículo 1).

2. Ya que es conocido que la adicción, el estrés y la memoria comparten mecanismos de modulación por los mismos factores neurotróficos, cascadas intracelulares y estructuras cerebrales nuestro siguiente objetivo fue investigar los posibles cambios moleculares que se originarían en los sistemas del estrés hipotalámico (PVN) y en DG, estructura hipocampal

considerada de una gran importancia para el almacenamiento de la memoria asociada a contextos y experiencias en ratones sometidos al paradigma de CPP. El CRF liberado en el DG del hipocampo por diferentes estímulos, activa los receptores de CRF1, lo que desencadena una serie de señales de transducción que fosforilan el factor de transcripción CREB, factor muy estudiado en el campo del aprendizaje, la memoria y la adicción a drogas. Para llevar a cabo este objetivo evaluamos la activación de las neuronas de CRF en PVN (doble inmunofluorescencia CRF/CREB) y sus proyecciones al DG, así como la expresión de pCREB y Trx-1 y su co-localización (western-blot, inmunofluorescencia) en ambas estructuras. Dentro de este mismo objetivo evaluamos la implicación de los receptores de CRF1 en los efectos reforzantes de la morfina y en los cambios observados en los diferentes parámetros descritos anteriormente. Para ello, administramos CP-154,526, antagonista selectivo de los receptores de CRF1 (Artículo 2).

3. En roedores, el componente afectivo de la dependencia de opiáceos puede ser reflejado y estudiado mediante el modelo de CPA que nos ofrece una medida altamente sensitiva del estado emocional negativo producido por el síndrome de abstinencia a opioides, permitiendo a su vez explorar los mecanismos neurobiológicos que subyacen en los efectos aversivos y en la extinción de los mismos. En base a ello, en este objetivo estudiamos los efectos aversivos precipitados por naloxona, mediante el paradigma de CPA, en ratones silvestres y KO del receptor del CRF1 tratados crónicamente con morfina. Además, exploramos las modificaciones de las vías noradrenérgicas bulbares (NTS-A2, VLM-A1) que inervan al VTA y al NAc mediante la cuantificación del número de neuronas de TH, enzima limitante de la síntesis de catecolaminas, y del número de neuronas de TH fosforilada en serina 40 ó 31 en el NTS y en VLM. Así mismo, investigamos la activación de dichas neuronas mediante la colocalización c-Fos/TH fosforilada en serina 40 ó 31 (inmucitoquímica) en animales KO del receptor de CRF1 (Artículo 3).

4. Como continuación del objetivo anterior hemos estudiado la extinción de los efectos aversivos precipitados por naloxona en ratones silvestres y KO tratados crónicamente con morfina. Nos planteamos este objetivo teniendo en cuenta que el estudio de los cambios adaptativos que continúan o desaparecen durante la extinción puede darnos una amplia información acerca de los mecanismos que desencadenan la recaída, principal problema de las adicciones. Evaluamos el papel de los receptores de CRF1 en la expresión y extrinción de los efectos aversivos en el paradigma del CPA, en los signos físicos del síndrome de abstinencia precipitado por naloxona y en la activación del eje HPA mediante la determinación de los

niveles plasmáticos de ACTH y corticosterona (RIA) después de la expresión o extinción de los efectos aversivos de la abstinencia. Este objetivo lo realizamos en ratones machos y hembras ya que existe un conocimiento bastante limitado en cuanto a los mecanismos que subyacen en los diferentes patrones adictivos que presentan los hombres y mujeres (Artículo 4).

5. 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 trastornos cardíacos. Así se ha descrito que la heroína produce importantes cambios en los tejidos de conducción cardíacos que llevan a la producción de diferentes tipos de arritmias, responsables en parte de la muerte súbita que acontece en adictos a esta droga. Por ello, en este último objetivo valoramos el papel de los receptores de CRF1 en los cambios adaptativos que se producen en las vías noradrenérgicas centrales y periféricas durante el síndrome de abstinencia precipitado por la administración de naloxona. Ya que existe una clara conexión entre PVN, núcleos bulbares y corazón, evaluamos el turnover de NA en PVN (HPLC), la activación de las neuronas de TH fosforilada en serina 40 en el área VLM mediante la colocalización TH/c-Fos (inmunocitoquímica), el turnover de NA, la expresión de TH fosforilada en serina 40 y PKA (western-blot) en tejido cardíaco. Para la realización de este objetivo utilizamos ratones silvestres y KO del receptor de CRF1 (Artículo 5).



ARTÍCULOS

BRAIN STRESS SYSTEM RESPONSE AFTER MORPHINE-CONDITIONED PLACE PREFERENCE

García-Carmona JA, Milanés MV, Laorden ML

International Journal of Neuropsychopharmacology 2013; 16(9): 1999-2011; DOI: 10.1017/S1461145713000588 Factor de impacto: 5, 27

URL: <http://ijnp.oxfordjournals.org/content/16/9/1999.long>

ABSTRACT: This study examined the involvement of the brain stress system in the reinforcing effects of morphine. One group of mice was conditioned to morphine using the conditioned place preference (CPP) paradigm and the other group received morphine in a home-cage (non-conditioned). Adrenocorticotrophic hormone and corticosterone levels were measured by radioimmunoassay; phospho (p) CREB expression and the number of corticotropin-releasing factor (CRF) neurons and fibres were measured by immunohistochemistry in different brain areas. We observed that the number of CRF neurons in the paraventricular nucleus (PVN) was increased after morphine-induced CPP, which was paralleled with enhanced CRF-immunoreactivity fibres in the nucleus tractus solitarius (NTS) and ventral tegmental area (VTA) vs. home-cage group injected with morphine. Morphine exposure induced an increase in CREB phosphorylated at Ser 133 in the PVN and central amygdale (CeA), whereas mice exhibiting morphine CPP had higher levels of pCREB in the PVN, CeA and bed nucleus of the stria terminalis (BNST). We also found that most of the CRF-positive neurons in the PVN, CeA and BNST co-express pCREB after morphine CPP expression, suggesting that the drug-associated environmental contexts can elicit neuronal activity in the brain stress system. From the present results it is clear that exposure to a drug-associated context remains a potent activator of signalling pathways leading to CRF activation in the brain stress system.

CP-154526 MODIFIES CREB PHOSPHORYLATION AND THIOREDOXIN-1 EXPRESSION IN DENTATE GYRUS FOLLOWING MORPHINE-INDUCED CONDITIONED PLACE PREFERENCE.

García-Carmona JA, Camejo DM, Almela P, Jimenez A, Milanés MV, Sevilla F, Laorden ML

Plos One 2015 Factor de impacto: 3,58 doi: 10.1371/journal.pone.0136164

URL: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0136164>

ABSTRACT: Corticotropin-releasing factor (CRF) acts as neuro-regulator of the behavioral and emotional integration of environmental and endogenous stimuli associated with drug dependence. Thioredoxin-1 (Trx-1) is a functional protein controlling the redox status of several proteins, which is involved in addictive processes. In the present study, we have evaluated the role of CRF1 receptor (CRF1R) in the rewarding properties of morphine by using the conditioned place preference (CPP) paradigm. We also investigate the effects of the CRF1R antagonist, CP-154,526, on the morphine CPP-induced activation of CRF neurons, CREB phosphorylation and Trx expression in paraventricular nucleus (PVN) and dentate gyrus (DG) of the mice brain. CP-154,526 abolished the acquisition of morphine CPP and the increase of CRF/pCREB positive neurons in PVN. Moreover, this CRF1R antagonist prevented morphine-induced CRF-immunoreactive fibers in DG, as well as the increase in pCREB expression in both the PVN and DG. In addition, morphine exposure induced an increase in Trx-1 expression in DG without any alterations in PVN. We also observed that the majority of pCREB positive neurons in DG co-expressed Trx-1, suggesting that Trx-1 could activate CREB in the DG, a brain region involved in memory consolidation. Altogether, these results support the idea that CRF1R antagonist blocked Trx-1 expression and pCREB/Trx-1 co-localization, indicating a critical role of CRF, through CRF1R, in molecular changes involved in morphine associated behaviors.

RESTRICTED ROLE OF CRF1 RECEPTOR FOR THE ACTIVITY OF BRAINSTEM CATECHOLAMINERGIC NEURONS IN THE NEGATIVE STATE OF MORPHINE WITHDRAWAL

Garcia-Carmona JA, Almela P, Baroja-Mazo A, Milanes MV, Laorden ML

Psychopharmacology 2012; 220: 379–393; DOI 10.1007/s00213-011-2478-y

Factor de impacto: 4,08

URL: <http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00213-011-2478-y>

ABSTRACT: Evidence suggests that corticotropin-releasing factor (CRF) system is an important mediator in the negative symptoms of opioid withdrawal. We used genetically engineered mice lacking functional CRF receptor-1 (CRF1R) levels to study the role for CRF/CRF1R pathways in the negative affective states of opioid withdrawal. Wild-type and CRF1R^{-/-} offspring of CRF1R ^{+/-} breeders were identified by PCR analysis of tail DNA and were rendered dependent on morphine via intraperitoneal injection of increasing doses of morphine (10–60 mg/kg). Negative state associated with opioid withdrawal was examined by using conditioned place aversion (CPA), TH expression and TH phosphorylation were measured in different brain regions involved in addictive behaviours using immunohistochemistry.

The weight loss in morphine withdrawn CRF1R^{-/-} animals was significantly ($p < 0.05$) lower versus wild-type. The aversion for environmental cues paired with opioid withdrawal was lower ($p < 0.001$) in the CRF1R-deficient versus wild-type. Using dual immunolabeling for c-Fos, data show that naloxone-induced withdrawal increases the number of TH positive neurons phosphorylated at Ser40 or Ser31 that coexpress c-Fos in the nucleus of tractus solitarius (NTS)-A2 from wild-type and CRF ^{-/-}-deficient mice. By contrast, the number of phospho-Ser40 or phospho-Ser31 positive neurons expressing c-Fos was lower in the ventrolateral medulla (VLM)-A1 in CRF ^{-/-} -deficient mice.

Our study demonstrates an increased activity of brainstem catecholaminergic neurons after CPA induced by morphine withdrawal suggesting that CRF1R is implicated in the activation of A1 neurons and provides evidence that this receptor is involved in the body weight loss and in the negative aversive effects of morphine withdrawal.

SEX DIFFERENCES BETWEEN CRF1 RECEPTOR DEFICIENT MICE FOLLOWING NALOXONE-PRECIPIATED MORPHINE WITHDRAWAL IN A CONDITIONED PLACE AVERSION PARADIGM: IMPLICATION OF HPA AXIS

García-Carmona JA, Baroja-Mazo A, Milanés MV, Laorden ML

Plos One 2015 Factor de impacto: 3,58 doi: 10.1371/journal.pone.0121125

URL: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0121125>

ABSTRACT: Extinction period of positive affective memory of drug taking and negative affective memory of drug withdrawal, as well as the different response of men and women might be important for the clinical treatment of drug addiction. We investigate the role of corticotropin releasing factor receptor type one (CRF1R) and the different response of male and female mice in the expression and extinction of the aversive memory.

For this purpose, we used genetically engineered male and female mice lacking functional CRF1R. The animals were rendered dependent on morphine by intraperitoneally injection of increasing doses of morphine (10–60 mg/kg). Negative state associated with naloxone (1 mg/kg s.c.)-precipitated morphine withdrawal was examined by using conditioned place aversion (CPA) paradigm. No sex differences for CPA expression were found in wild-type (n = 29) or CRF1R knockout (KO) mice (n = 29). However, CRF1R KO mice presented less aversion score than wild-type mice, suggesting that CRF1R KO mice were less responsive than wildtype to continuous associations between drug administration and environmental stimuli. In addition, CPA extinction was delayed in wild-type and CRF1R KO male mice compared with females of both genotypes. The genetic disruption of the CRF1R pathway decreased the period of extinction in males and females suggesting that CRF/CRF1R is implicated in the duration of aversive memory. Our results also showed that the increase in adrenocorticotrophic hormone (ACTH) levels observed in wild-type (n = 11) mice after CPA expression, were attenuated in CRF1R KO mice (n = 10). In addition, ACTH returned to the baseline levels in males and females once CPA extinction was finished. In conclusion, these results suggest that, at least, CPA expression is partially due to an increase in plasma ACTH levels, through activation of CRF1R, which can return when CPA extinction is finished.

SYMPATHETIC ACTIVITY INDUCED BY NALOXONE-PRECIPITATED MORPHINE WITHDRAWAL IS BLOCKED IN GENETICALLY ENGINEERED MICE LACKING FUNCTIONAL CRF1 RECEPTOR

García-Carmona JA, Martínez-Laorden E, Milanés MV, Laorden ML

Toxicology and Applied Pharmacology 2015, 283: 42–49 doi: 10.1016/j.taap

Factor de impacto: 3,98

URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0041008X15000058>

ABSTRACT: There is large body evidence indicating that stress can lead to cardiovascular disease. However, the exact brain areas and the mechanisms involved remain to be revealed. Here, we performed a series of experiments to characterize the role of CRF1 receptor (CRF1R) in the stress response induced by naloxone-precipitated morphine withdrawal. The experiments were performed in the hypothalamic paraventricular nucleus (PVN) ventrolateral medulla (VLM), brain regions involved in the regulation of cardiovascular activity, and in the right ventricle by using genetically engineered mice lacking functional CRF1R levels (KO). Mice were treated with increasing doses of morphine and withdrawal was precipitated by naloxone administration. Noradrenaline (NA) turnover, c-Fos, expression, PKA and TH phosphorylated at serine 40, was evaluated by high-performance liquid chromatography (HPLC), immunohistochemistry and immunoblotting. Morphine withdrawal induced an enhancement of NA turnover in PVN in parallel with an increase in TH neurons expressing c-Fos in VLM in wild-type mice. In addition we have demonstrated an increase in NA turnover, TH phosphorylated at serine 40 and PKA levels in heart. The main finding of the present study was that NA turnover, TH positive neurons that express c-Fos, TH phosphorylated at serine 40 and PKA expression observed during morphine withdrawal were significantly inhibited in CRF1R KO mice. Our results demonstrate that CRF/CRF1R activation may contribute to the adaptive changes induced by naloxone-precipitated withdrawal in the heart and in the brain areas which modulate the cardiac sympathetic function and suggest that CRF/CRF1R pathways could be contributing to cardiovascular disease associated to opioid addiction.



CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en la presente Tesis Doctoral nos permiten plantear las siguientes conclusiones:

- 1.** Las neuronas de CRF localizadas en el PVN y las proyecciones de las mismas al NTS-A2 y VTA regulan los efectos reforzantes de morfina puestos de manifiesto mediante la utilización del paradigma de CPP. El aumento de la actividad (co-localización CRF/CREB) de las neuronas de CRF en el PVN, CeA and BNST no se evidenció en animales condicionados a morfina fuera de las cajas de comportamiento lo que nos permite afirmar que las señales asociadas al consumo son las que inducen un aumento de las vías de CRF en el sistema cerebral del estrés, apoyando la idea de que el entorno donde se consume las drogas tiene una importancia fundamental en el tratamiento de la adicción.
- 2.** Los resultados de este estudio muestran que CP-154,526, antagonista selectivo de los receptores de CRF1 abolió la preferencia de plaza observada con morfina así como el aumento de CREB en PVN y DG, área considerada de una gran importancia para el almacenamiento de la memoria asociada a contextos y experiencias. Además, la expresión de tioredoxina 1, proteína redox capaz de fosforilar a CREB y la co-localización PCREB/tioredoxina fueron antagonizados en presencia de CP-154,526 en el DG. Estos resultados nos permiten concluir que las vías de CRF a través de la activación del receptor de CRF1 están claramente implicadas en los procesos adictivos, concretamente en los efectos reforzantes positivos (recompensa) y en la asociación de la recompensa a la droga con el entorno donde se consume.
- 3.** El presente estudio indica que la delección genética de los receptores de CRF1 abolió los efectos aversivos, evaluados mediante el paradigma de CPA, del síndrome de abstinencia. La activación de las neuronas de TH fosforilada en serina 40 ó 31 en el NTS observada después del paradigma de CPA no fue abolida en animales KO del receptor de CRF1 mientras que el estímulo de las neuronas noradrenérgicas en el área VLM fue suprimido. Estos resultados demuestran que los receptores de CRF1 estarían implicados en los efectos aversivos del síndrome de abstinencia y que estos receptores modularían la activación de algunas de las vías noradrenérgicas bulbares que podrían ser responsables de la sintomatología negativa de la abstinencia. Debido a la conocida interacción anatómica y funcional entre CRF y NA, es posible que los receptores de CRF1 puedan ser importantes dianas terapéuticas para el tratamiento de los efectos adversos del síndrome de abstinencia a morfina.

4. Nuestros resultados demuestran que los efectos aversivos del síndrome de abstinencia a morfina están modulados por la activación del eje HPA, con un claro aumento de las concentraciones plasmáticas de ACTH. Además, este aumento retorna a niveles basales tras la extinción de los efectos aversivos, lo que claramente indica la participación del sistema cerebral del estrés hipotalámico en el mantenimiento de la memoria aversiva. La delección genética del receptor de CRF1 abolió los efectos aversivos y el aumento de las concentraciones plasmáticas de ACTH, lo que indica la implicación de estos receptores. La extinción de la memoria aversiva fue más rápida en las hembras que en los machos lo que demuestra distintos patrones adictivos en hombres y mujeres lo que puede tener importancia en el tratamiento clínico de las adicciones.

5. De los resultados obtenidos en animales KO del receptor de CRF podemos deducir que la activación de los receptores de CRF1 está implicada en los cambios adaptativos cardíacos que se producen en tejido cardíaco (aumento del turnover de NA, expresión de TH y PKA) y en las áreas cerebrales (PVN: aumento del turnover de NA; VLM: activación de neuronas de TH) que controlan la función cardíaca. Estos resultados sugieren que las vías de CRF a través de la activación de receptores de CRF1 podrían contribuir al establecimiento de las enfermedades cardíacas asociadas a los procesos adictivos.



ENGLISH SUMMARY

1. ADDICTION

Addiction to drugs of abuse is a chronic disease of the central nervous system (CNS), due to a neurobiological dysfunction of the midbrain, limbic and cortical brain circuits involved in motivation and behavior (Kalivas and Volkow, 2005). Continued use of these substances induces adaptive changes in the CNS, leading to a physical dependence, sensitization, the "craving" or overwhelming craving and relapse. Finally, it is established a pattern of repeated self-administration that often leads to tolerance, withdrawal and compulsive substance administration.

1.1 ADDICTION AS A PUBLIC HEALTH PROBLEM

The drug addiction involves a high cost in healthcare as well as social, legal, family and labor resources. Health problems related to drug use are a frequent complaint in clinical practice, in fact, 15-20% of primary care consultations are attributable to problems related to drug use. The drug addiction and its magnitude represents a serious worldwide public health problem. Different drugs have a different prevalence and medical problems in different world regions. For example, in Africa and Oceania were presented for treating more people due to problems related to cannabis (62% and 44%, respectively). Cocaine is the most prominent drug in North and South America (29% and 49%, respectively). In contrast, opiates were the primary drug treated in Asia and Europe (61% and 63%, respectively) (UNODC, 2014).

In Spain, the profile of drug users has changed. From the 70s to the early 90s, the substance that caused more social alarm was the heroin. In the mid-nineties, the number of cannabis and cocaine users increased and appeared the phenomenon known as "recreational use" of drugs, ie, simultaneous consumption of substances such as alcohol, cannabis, cocaine, ecstasy and amphetamine or synthetic drugs.

Today, after many years of continued decline in heroin consumption, some studies point to an increase in heroin smoking. Other drugs that cause major morbidity and mortality in Spain are cocaine and alcohol. In 2009, in our country, treatment admissions for cocaine accounted for 17% of admissions to drug treatment / addiction. More complicated is to measure the magnitude of alcoholism, it is a systemic disease that is associated with serious health problems, increasing the risk of many diseases among which liver disease, cancer and encephalopathy. Also, note that alcohol use is the addiction with major consequences because may be involved in traffic accidents and violent behavior caused by alcohol users.

Table 1. Prevalence of drug one-life consume in the population between 15-64 years old. (%) Spain, 1995-2010. Modified from Plan Nacional sobre Drogas 2012.

	1995	1997	1999	2001	2003	2005	2008	2010
Tobacco	-	69,7	64,9	68,4	68,9	69,5	68,5	68,3
Alcohol	-	90,6	87,3	89,0	88,6	93,7	88,0	87,4
Cannabis	14,5	22,9	19,6	23,8	29,0	28,6	27,3	27,9
Stasis	2,0	2,5	2,4	4,0	4,6	4,4	4,3	4,1
Amphetamines	2,1	2,7	2,2	2,9	3,2	3,4	3,8	3,9
Cocaine	3,7	3,8	3,5	5,3	6,4	7,6	9,8	10,1
Heroine	0,8	0,6	0,5	0,6	0,9	0,7	0,8	0,9

1.2 ADDICTION AS A PSYCHIATRIC ILLNES

The drug induces the appearance of dependence, which is characterized by the appearance of a set of cognitive, behavioral and physiological symptoms indicating that the individual continues to consume the substance despite the appearance of significant problems related to it. Although not specifically included in the diagnostic criteria, the consumer irresistible urge or "craving" is observed in most patients with substance abuse dependence.

Dependence is defined as a group of three or more of the symptoms listed below, which appear at any time within a period of 12 months:

Tolerance: need for increasing amounts of the drug to achieve intoxication or the desired effect, or a significant decrease in the effects of it with continued at the same doses used.

Abstinence: is a change of maladaptive behavior, with cognitive and physiological implications, which occurs when the concentration in blood or tissues of a drug decreases an individual who has maintained a prolonged consumption of large amounts of it. After the appearance of unpleasant withdrawal symptoms, the subject takes the drug to eliminate or alleviate the symptoms, however, neither the tolerance nor withdrawal is necessary nor sufficient conditions to diagnose dependence on substances of abuse.

Or the following criteria describe the pattern of compulsive use of a drug dependency characteristic:

- The drug is often taken in larger amounts or for longer than initially intended period.
- There is a persistent desire or unsuccessful efforts to cut down or control their consumption.

- Much time is spent on activities related to the production of the drug consumption or in recovery from the effects of same activities.
- Important social, occupational or recreational activities because of its consumption.
- Continue consumption of the drug despite being aware of psychological or physical recurrent or persistent problems, which seem caused or exacerbated by the use of the substance abuse.

1.3 ADDICTION AS A CHRONIC ILLNES

Today we have abundant scientific evidence on the fact that addiction to opiates and other drugs is a chronic disease of the CNS that is characterized not only by increased incentive motivational aspects such substances and associated stimuli, but also by deterioration in the ability to inhibit inappropriate responses (Volkow and Kalivas, 2005). Therefore, addiction is a chronic neurological disorder, prone to relapse, characterized by compulsive drug seeking and drug use; loss of control over drug taking; and appearance of a negative emotional state when there is no access to it. Currently, neither tolerance nor withdrawal are necessary conditions for the diagnosis of addiction (Goodman, 2008).

Substance dependence, like most psychiatric disorders is influenced by genetic factors, included among the genetically complex chronic diseases (Lander and Schork, 1994). These diseases conform to a model of polygenic-multifactorial heredity, influenced by a few genes of minor effect and environment, which is necessary but not sufficient condition. In other words, for an individual end up being dependent on heroin, you need a contact with the drug, however, not all people who consume the substance ever end up being addicted to it. The shared genetic vulnerability between different substances could be explained by the enhancement of brain reward circuit after administration of the drug, but could also operate by genes associated with impulse control or other related with vulnerability to psychiatric disorders (Mayfield and Schuckit, 2008).

Therefore, drugs are chemicals that modify the operation of certain neurotransmitter systems and brain circuits, producing cognitive, emotional, motivational and behavioral changes. Acute administration produces transient changes. However, chronic use can leave significant traces in memory remodeling emotional connections and neural pathways, producing long-lasting changes in brain function leaving the person most vulnerable to restart consumption. In this way, all substances produce molecular and cellular changes that occur at various stages or phases of addictive disease

2. THE STAGES OF ADDICTION

The dependence begins with the occasional consumption of drugs motivated by a conglomerate of personal, psychological, social and environmental factors leading to the first and successive stages of addiction. Addiction has been conceptualized in a cycle of three stages: acute consumption/intoxication, withdrawal/negative state and preoccupation/anticipation; with two primary sources of reinforcement: positive reinforcement and negative reinforcement. Positive reinforcement is defined as the process by which the presentation of a stimulus increases the probability of produce a specific response, whereas negative reinforcement is defined as the process by which the lack of an aversive stimulus (an aversive state in addiction) increases the response probability.

Secondary sources of reinforcement of addictive behavior include different factors that act as positive or negative reinforcers as psychological social, labors, neurobiological and genetic aspects of the individual vulnerability to addiction (Koob et al., 2014). All these conditions can be overlaid at different stages of the cycle of addiction.

Thus, the timely use of the drug produces pleasurable effects that act as positive reinforcers of behavior, this being impulsive and perpetuated in time to become chronic (Kalivas and O'Brien, 2008). Once established chronic drug use, if this is interrupted a series of aversive effects, both somatic and psychiatric, which act as negative reinforcers and manage chronic drug use to prevent the occurrence of this syndrome occur abstinence. Negative reinforcers produce a disturbance of conduct, which becomes compulsive with loss of control over drug use (Koob and Le Moal, 2001; Cami and Farre, 2003) and a serious commitment to social activities, previous work and individual recreation.

The spiral of anxiety that causes the first use of the addictive substance described as, in some cases, the first failure of self-regulation of intake can cause anxiety or emotional distress, establishing a cycle of repeated failures of self-regulation, each one producing an additional negative state. The escalation of anxiety has also been described as the cause of progressive deregulation afflicting the brain reward system in the context of successive addictive cycles (Figure 1). The constructs of psychiatry and experimental psychology suggest the same cycle of addiction and various animal models have been established and validated for symptoms of the cycle of addiction, addiction criteria and sources of reinforcement associated with addiction (Koob, 1995; Koob et al., 1998; 2001).

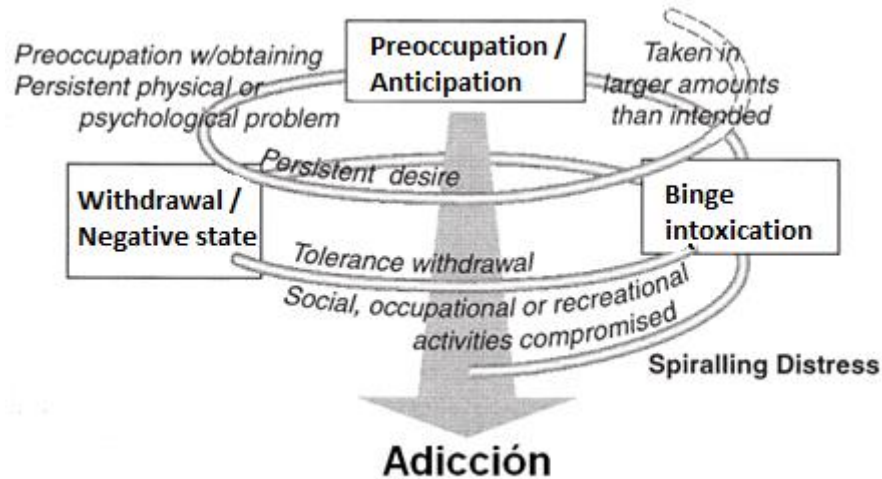


Figure 1. Diagram describing the spiral of the addictive cycle with many factors or criteria involving the development of drug dependence. Modified from Koob and Le Moal, 2001.

2.1 ACUTE ADMINISTRATION: REWARD AND POSITIVE REINFORCEMENT

To understand how the brain reward system is altered during the development of addiction, we must understand the basis of the mechanisms of biological reward. One of the principles on which research has focused are the projections and neuronal terminals of the mesocorticolimbic dopaminergic system (Le Moal and Simon, 1991). The main components of this reward circuit are the ventral tegmental area (VTA), where are the cell bodies of the dopaminergic neurons; the forebrain [includes the nucleus accumbens (NAc), the olfactory tubercle, the amygdala (AMY) and the prefrontal cortex (PFC)]; and the dopaminergic connections between the VTA and the forebrain. Other components are the multiple interactions of the structures of this system by other neurotransmitters such as the γ -aminobutyric acid (GABA), glutamate and serotonin (Koob, 1992; Koob and Le Moal, 2008).

Dopaminergic projections to the forebrain modulate cortical regions and enable, under physiological conditions, the integrative activity of these structures. In the center of these interrelationships are two groups of structures: the mesolimbic-amygdala circuit, with emphasis on the extended amygdala and NAc shell (Heimer et al., 1991; Koob, 1999); and the striatal-thalamic circuit (Figure 2).

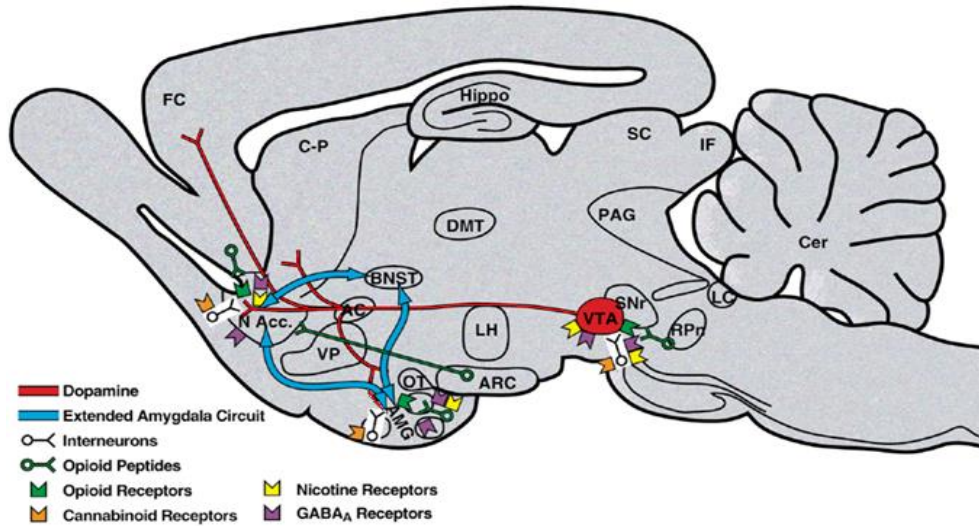


Figure 2. Neural pathways, neurotransmitters and receptors involved in acute reinforcing effects of drugs of abuse. Endogenous opioids activate opioid receptors in the VTA, NAc and AMY. In addition, opioids facilitate the release of dopamine in the NAc or indirectly after inhibit VTA GABAergic interneurons. Modified from Edwards and Koob, 2010.

Dopaminergic projections from the VTA to the limbic structures such as the NAc, are functionally involved in the acute reinforcing effects of psychostimulants, while changes associated with the motivational aspects of drug withdrawal could include neuroadaptive processes of the extended amygdala (Koob, 1999; Di Chiara, 1999). The system called the extended amygdala establishes decisive connections between brain areas, such as the shell of the NAc, the central amygdala (CeA) and the nucleus of the striaterminallis (BNST) (Alheid et al., 1998).

Compulsive drug-seeking circuits may depend of the basolateral amygdala and including cortical projections to the NAc, which is anatomically related with the striatal circuit (Everitt et al., 1999). It should be noted that the CeA is connected with regions of the midbrain and bulb, as the nucleus of the solitary tract (NTS-A2) or the ventrolateral medulla area (VLM-A1), both involved in autonomic responses; while the corticostriatal thalamic circuit consists of regions involved in learning, evaluation of reinforcement (NAc), central inhibition mechanisms, integration of stimulus-response associations and repetitive compulsive behavior (Jentsch and Taylor, 1999).

Importantly, both circuits are connected and modulated by dopamine (DA) (Le Moal, 1995). Furthermore, it is well established that mesocortical and mesolimbic dopaminergic neurons have different physiological regulation, being the use of DA in the NAc under the control of cortical excitatory-accumbens pathway (Le Moal and Simon, 1991). Therefore, various drugs

may activate this neuron circuit in different nuclei through different molecular and cellular mechanisms (Table 2).

Table 2. Neurobiological substrates of acute reinforcing effects of drugs of abuse. Modified from Koob and Le Moal, 2008.

Drug	Neurotransmitter	Nuclei target
Cocaine	DA/Serotonine	Nac, amygdale
Opioids	DA, opioid peptides	VTA, NAc
Nicotine	DA, opioid peptides	VTA, NAc
Alcohol	DA, opioid peptides, GABA, serotonine, glutamate	VTA, NAc, amygdale

Both exogenous opioids (morphine, heroin) and endogenous (enkephalin) are ligands of the opioid receptors in the CNS, primarily in the NAc, the AMY and VTA. Opioids bind specifically and reversibly to their cellular receptors and thus produce their biological actions. Nowadays, at least three types of opioid receptors have been identified: MOR = μ OR = Mu; DOR = δ OR = Delta; and KOR = κ OR = Kappa. They all have a structural similarity of 60% (Chen et al., 1993) and are membrane receptors type metabotropic G protein coupled ($G_{\alpha i}$ / $G_{\alpha o}$). The physiological effects of morphine and the positive reinforcing effects of this, are absent in MOR knockout mice (Matthes et al., 1996; Le Merrer et al., 2009). Once MOR is activated by binding its endogenous or exogenous ligands, the G_{α} and $G_{\beta\gamma}$ subunits interact with the intracellular effectors systems to inhibit the adenylate cyclase (AC) and the voltage-dependent channels of Ca^{2+} , stimulating K^{+} channels and the phospholipase $C\beta$ stimulating, thus, the release of DA in the NAc (Waldhoer et al., 2004; Williams et al., 2013).

2.2 CRHONIC USE AND TRANSITION IN ADDICTION

Consume of substance of abuse begins with intense alteration of motivational state that can be triggered by conditioned stimuli by eating small amounts of opioids or other drugs and by the states of stress. This alteration of motivation or desire is known as craving, which has a neurobiological substrate associated with the reward circuit. The dopaminergic-glutamatergic connection plays an important role in the craving; because of VTA DA neurons have AMPA and NMDA receptors, their activation by glutamate modulates the mesolimbic dopaminergic neurons. NMDA antagonist receptors may provide the reinforcing effects and induce relapse while facilitating the activity of the endogenous AMPA receptors reduces drug seeking behavior (Self, 2005). Patients, who present a state of craving, often result in seeking behaviors and drug use. Many patients describe quite accurately their craving episodes, more

frequent and impulsive way to the loss of control and compulsive consumption of drugs when they expose to certain stimuli.

The transition to chronic use of the substance abuse (Figure 3) is explained by a model known as hedonic allostasis (Koob and Le Moal, 1997, Koob et al., 2004). Allostasis concerns the integration of the adaptive processes maintaining stability through changes that are not made in the normal range of homeostasis. This implies that many physiological functions are mobilized or deleted, as reflected in the cascade of brain-body interactions that is carried out. Controlling all mechanisms simultaneously, the brain directs the experience, memory, anticipation and re-assessment of needs in advance to the physiological requirements. When demands become chronic, brain-body system, tonically adapts at all levels, entering a relaxed condition which could create an unpleasant withdrawal state from physiological regulation of itself. Changes in hormones, neurotransmitters and endogenous opioids provide a physiological basis to continue seeking the drug to alleviate this condition of high domestic demand (McEwen, 1998), and stabilize a new level of activity away from homeostatic balance. However, when the withdrawal is established, repeated stress and negative affect regulations extend far from normal, disappearing capacity to respond to additional challenges. In addiction, the changes directed to maintain the stability of the reward function, however, the DA and endogenous opioid peptides have a limited ability to maintain a homeostatic range in the reward function.

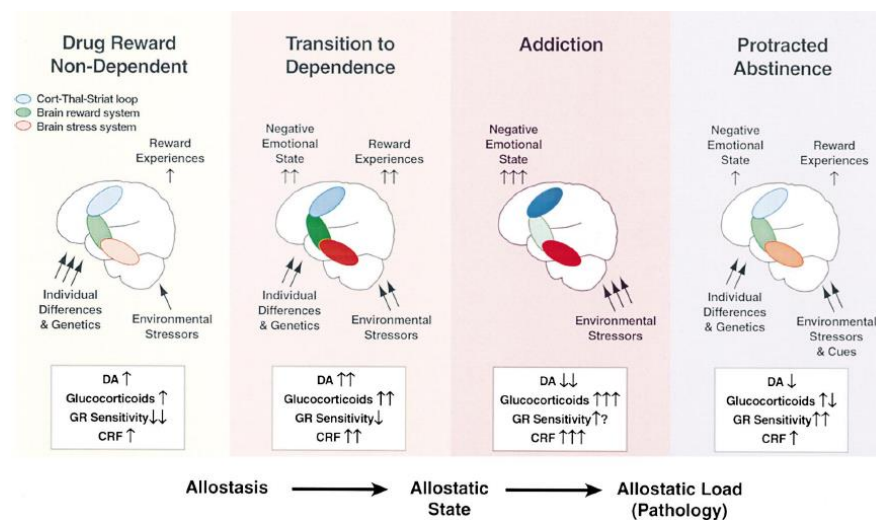


Figure 3. Diagram showing the relationship between the continuum from allostasis to the pathology and the transition from drug use to abstinence. Three brain circuits change and contribute to allostatic state system rewards: the reward system (green), the brain stress system (red) and the cortico-thalamic-striate system (blue). The activation of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis contributes to cerebral allostatic stress state. Taken from Koob and Le Moal, 2001.

2.3 TOLERANCE AND SENSITIZATION

Most individuals who are dependent on opioids recently are not fully conscious of it. Then, they consume more drugs in a state of euphoria, and withdrawal symptoms are mild and manageable. Cognitive assessment of the subject is: "I can quit whenever I want", seeking a greater sense of euphoria, the individual may change the route of administration to another to produce more intense and rapid effects, such as an intranasal or via a parenteral or try a more potent blend of heroin with analgesics, hypnotics or sedatives, causing drug abuse.

During chronic use of substance abuse, neural adaptations occur in the mesolimbic system in an attempt to restore homeostasis in the reward system. Thus, basal dopaminergic function is progressively reduced and the drug is less effective to produce the typical increase in dopaminergic transmission, and this phenomenon called tolerance. Therefore, repeated administration of drugs can produce a process of tolerance to the effects thereof. The degree to which tolerance develops substance varies widely. Subjects consuming large doses of opiates and stimulants may have significant levels of tolerance, up to doses that would be lethal to a person not consume the substance. The fact that tolerance occurs with all opioids, makes us think that the mechanism underlying tolerance pharmacodynamic type, ie, affects some event between the occupied receptor, the chain of transduction and the final answer.

Recent studies on the mechanisms of opioid tolerance, including the simultaneous activation of more than one type of opioid receptor (MOR and DOR mainly) or different intracellular signaling cascades mediated by differential activation of protein subtype G_α (Piñeyro and Archer Iahlou, 2007). Until recently it was thought that the mechanisms of endocytosis of the receptor, the downregulation in the coupling between opioid receptors and G (desensitization process), protein in the appearance of antiopioides peptides or presentation mechanisms Alternative transduction (Nestler and Aghajanian, 1997), had great importance in tolerance, but many previous studies support the activation of different protein G (Christie, 2008; Koch and Holtt, 2008; Berger and Whistler, 2010; von Zastrow, 2010). Thus, chronic morphine treatment modifies the effector system coupled to MOR but has little effect on receptor density.

The adaptive mechanisms after chronic exposure to morphine can contribute to a rapid desensitization, including Mor phosphorylation mechanisms, increased activation of the ERK-1/2, regulatory kinases G protein coupling (GRK's) or arrestin; or upregulation of regulatory proteins G protein coupling (RGS) or phospholipase D2 (Gold et al., 2003; Koch et al 2006; Fan et al., 2003). Thus, multiple proteins bind to the intracellular domain of MOR and acting

sterically hindering the interaction with proteins G. Finally, there is strong evidence that PKC plays a significant role in tolerance to morphine actions as this, you can be reduced by administration of inhibitors of PKC (Hua et al., 2002) and the elimination of PKC using knockout mice reduces morphine tolerance (Newton et al., 2007) (Figure 4).

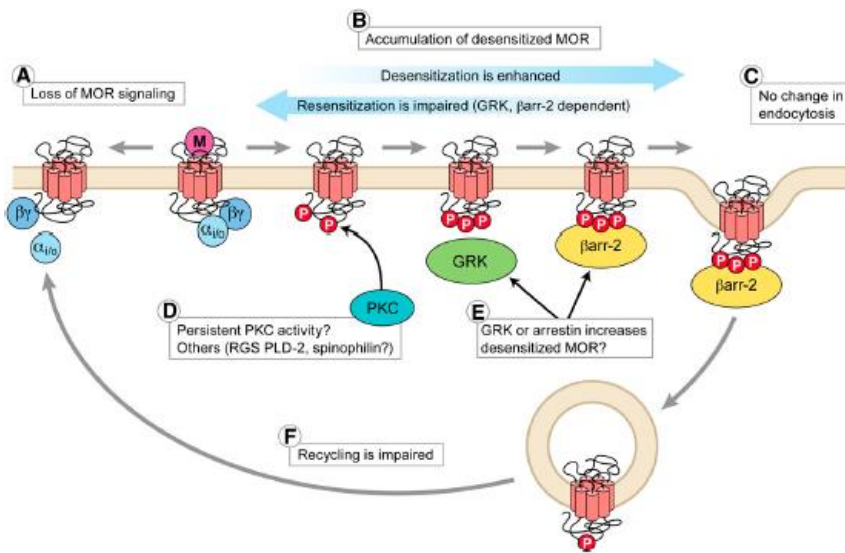


Figure 4. Schematic illustration of the adaptations that may contribute to tolerance of MOR after chronic exposure to morphine. (A) The studies show the loss of more than 80% of functional MOR for the development of tolerance is needed. Taken from Williams et al., 2013.

Other pharmacological studies have identified several proteins involved in the induction of tolerance to morphine, including the NMDA receptor, nitric oxide synthetase, PKA and CaMKII. Recently, it has been demonstrated the association between physical and NMDAs MORs in postsynaptic structures, producing a negative feedback MORs in signaling and development of tolerance (Garzon et al., 2012)

Therefore, individuals develop tolerance need to increase the amount of drug administered to experience the effects of the drug with the same intensity as in the beginning.

In the process of raising two phases are distinguished from the neurobiological point of view: the initiation phase, during repeated administration of the drug and the expression phase, when re-administering the drug after a period of abstinence. The ability of a drug to reinstate an associated consumer behavior is directly related to its ability to cause neurochemical and behavioral sensitization, as postulated theory awareness of the incentive given by Robinson and Berridge (Robinson and Berridge, 2001). In this regard, awareness has been directly related to compulsive drug seeking and relapse phenomena. The incentive stimulus associated with the drug increases progressively by associative learning, reaching a state of "craving" or

search and compulsive drug use. Continuous awareness of this system favors the phenomenon of relapse.

In particular, it has been observed that exposure to natural enhancers, such as chocolate, DA transmission increase in NAc shell and core and the CPF. In the NAc shell, but not in the core of the NAc or the CPF, the response produces an adaptive control after a single exposure to the flavor / food, which does not occur with drugs of abuse (De Luca et al. 2012). This response is reduced after repeated stimulation and is known as the phenomenon of habituation (Rankin et al., 2009). However, in both cases, habituation can be modified by the environment and stimuli associated with drug (Bassareo and Di Chiara, 1999). Recent studies have shown that the DA in the NAc shell is activated by stimuli not previously known, while the DA in the PFC encodes the motivational generic value assigned by the subject matter of the stimulus (De Luca, 2014). Thus, the phenomenon of habituation is present in the shell but not in NAc NAc core or the CPF and regulated by DA transmission to the CPF. However, dysfunction of the CPF to inhibit subcortical functions can be considered a marker of awareness. This can result in excessive motivation for inappropriate actions clearly caused by a loss of control over impulses. Finally, the DA in the NAc during the sensitization process per se can be considered as a marker of drug dependence (De Luca, 2014).

Recent observations suggest that the inhibitory control of CPF on dopaminergic response in subcortical / grooved areas is different depending on the ventral sub-region studied. Different subregions of the CPF (prelimbic, infralimbic) have different projections to different compartments of the NAc.

2.4 WITHDRAWAL AND RELAPSE

Withdrawal syndrome resulting from cessation of opioids chronic administration, essentially, unmask all neuronal adaptations that have occurred in the brain in an attempt to balance the presence of drug. A leading cause of physical signs of withdrawal is the dramatic reduction of dopaminergic release in the efferent circuits involved in the acute reinforcing effects of drugs (Diana et al., 1995). The most accepted hypothesis is that DA systems are engaged in crucial stages of the cycle of addiction, such as abstinence, and lead to a decreased motivation for stimuli unrelated to the drug and increased sensitivity to abuse drug intake (Melis et al., 2005). Likewise, there is a decreased neurotransmission of serotonin in the NAc during drug withdrawal (Rossetti et al., 1992). However, there is an increased sensitivity of the transduction mechanisms of the opioid receptors in the NAc (Stinus et al., 1990), decreased

levels of GABA and increased NMDA glutamatergic transmission during withdrawal from alcohol and opiates (Weiss et al., 1996).

Second components of the state of withdrawal are the neural adaptations that occur in the brain stress system in an attempt to counteract the chronic presence of the drug and restore the normal brain function. Both the HPA axis and the brain stress system are activated by CRF during drug abstinence, with a common response of all drugs, increasing the ACTH and the cortisol plasma levels and the CRF in the AMY (Contarino and Papaleo, 2005; Koob and Kreek, 2007).

One of the most important structures of the brain stress system is the hypothalamic-pituitary-adrenal axis (HPA) and the hypothalamic CRF system that induces finally GC release by the adrenal glands.

The other brain structure involved in the brain stress system, known as extended amygdala, has been identified as the substrate of positive reinforcing effects of drugs of abuse and of the negative reinforcement allostatic state associated with addiction.

The term extended amygdala was coined by Johnston (1923) and consists of several forebrain areas: the BNST, the CeA, the area sublenticular innominate and NAc shell (Heimer and Alheid, 1991). All these structures are afferent connections of cortex, hippocampus, basolateral amygdala, VTA, lateral hypothalamus (LH) and, in turn, emit efferent connections to the ventral globus pallidus (PV), the VTA, the NTS-A2, the VLM- A1 and LH (Figure 5).

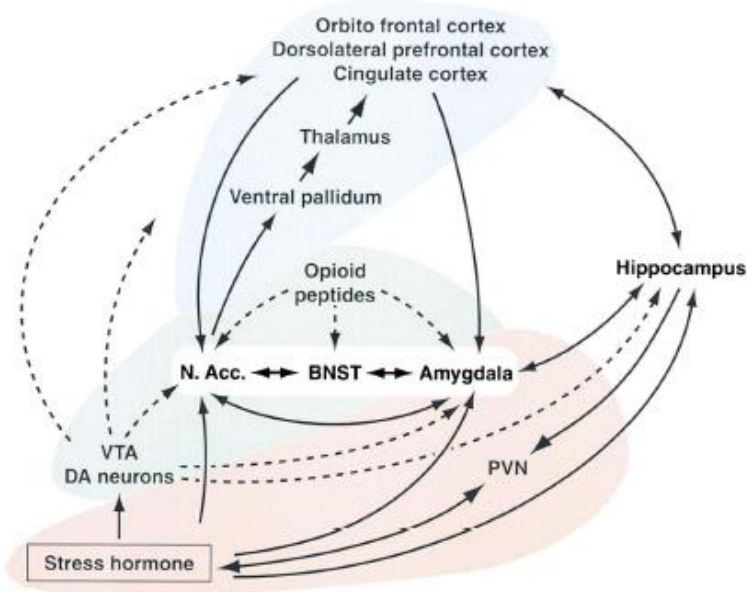


Figure 5. Diagram illustrating the circuit of the extended amygdala as a mediator of allostasis in drug addiction. The HPA axis and brain stress system promote the dysregulation of the reward circuitry; and the cortico-thalamic-striate circuit expressing and perpetuating the compulsive drug seeking behaviour. Taken from Koob and Le Moal, 2001.

The extended amygdala is an extra-hypothalamic CRF system whose cell bodies are located in the CeA and BNST, areas related to emotions, emotional and sensitive memory, negative affective states and stress. During the chronic consumption and especially during drug withdrawal occurs an increase in the release of CRF in the NAc shell that acts by modulating the expression and transmission of D_1 receptors.

Other neural systems, in addition to the CRF and mesocorticolimbic systems, play a crucial role in the syndrome of physical and psychological withdrawal. These include the NA (Weinshenker and Schroeder, 2007), orexin or DYN (Mahler et al., 2012.) (Yuferov et al., 2004; Schlosburg et al., 2013) (Figure 6).

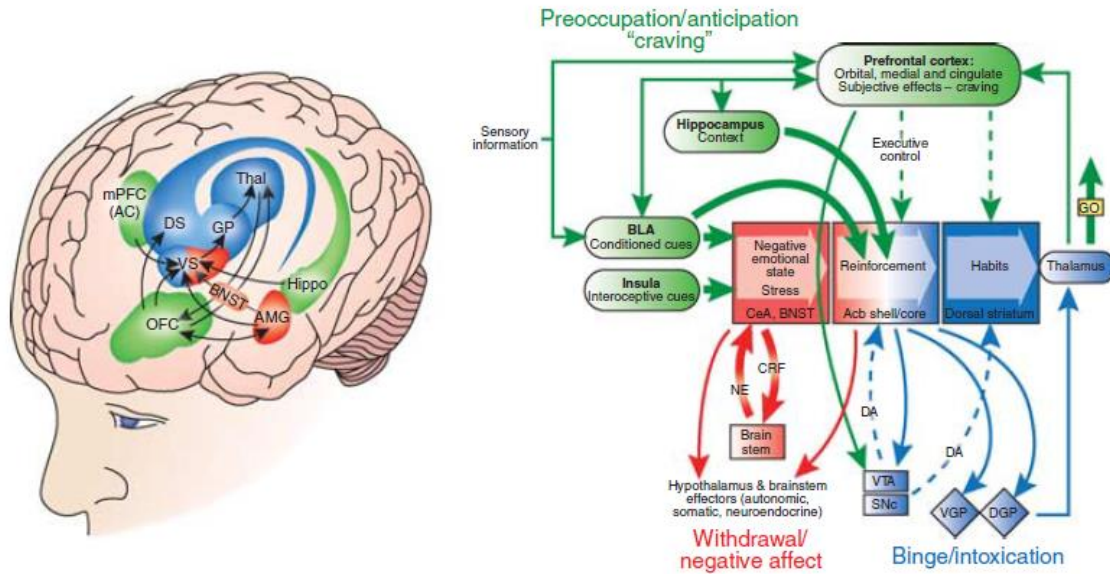


Figure 6. Schematic illustration of the combinations of neuro-adaptations in different brain circuits for the three stages of the cycle of addiction that promote drug-seeking behavior in addicts. Activation of ventral/dorsal striatum and the extended amygdala is driven by the hippocampus while the basolateral amygdala and insula lead the appearance of a negative emotional state and stress. The prefrontal cortex is involved, producing deficits in executive functions, thus contributing to the prominent incentive to produce drugs compared with natural positive reinforcers. Dopamine systems are compromised and brain stress system, such as CRF, activated to restore the importance of drugs in the context of dysphoric state of abstinence. Taken from Koob and Volkow, 2010.

Relapse into drug addiction is the state in which addicts return to drug binge eating after a short or long period of abstinence. Phase of concern / anticipation consists of two processes: long and post-stress abstinence relapse. The CRF contributes to residual negative emotional state that can be the basis for seeking drug relapse triggered by exposure to stressful stimuli or situations (Valdez et al., 2002; Valdez and Koob, 2004). CRF system in the BNST is activated when stressors induce relapse (Shaham et al., 2003). The use of CRF antagonists prevents post-stress cocaine, alcohol and opiate self-administration in animal models (Erb et al., 1998, Liu and Weiss, 2002, Zislis et al., 2007) relapse. Other brain systems involved in the post-stress relapse include NA, oxytocin and vasopressin (Zanos et al., 2014). Therefore, brain stress system is involved in the withdrawal state / negative emotional state and the state of worry / advance.

3. MODELS OF BEHAVIOR TO ASSESS DRUG ADDICTION IN RODENTS

Clinical research in human addicts has been useful to know the size, demographics and the phases of addictive disease, however, most of the progress in the study of addiction and its neurobiological basis, comes from work done in animal models. Although there is no animal model that can explain and fully develop the addictive process how it develops in humans,

these models allow us to investigate specific elements that are part of this process (Koob and Le Moal, 2008). Examples of models to measure these phases are the paradigms of intracranial electrical stimulation, conditioning place methods and self-stimulation techniques, among others (Sanchis-Segura and Spanagel, 2006).

3.1 INTRACRANIAL STIMULATION

Initial studies using the paradigm of intracranial stimulation (ICSS) had a key role in identifying the brain reward circuit (Olds and Milner, 1954). In the ICSS model, animals are implanted with intracranial electrodes in a brain structure associated with reward and are trained to keep an operant behavior and get an electric pulse through the electrodes (Figure 7). During these sessions the level of electrical stimulation necessary to induce ICSS is estimated. Typically, the reinforcing stimuli, such as drugs, reduce the basal level of self-stimulation, while aversive stimuli, such as drug abstinence, elevate it (Markou et al., 1993).



Figure 7. Intracranial self-stimulation paradigm. Taken from Sanchis-Segura and Spanagel, 2006.

3.2 CONDITIONED PLACE PREFERENCE OR AVERSION

The model of place conditioning is a procedure based on classical conditioning used to investigate the rewarding effect produced by drugs of abuse (Gomezano and Katz, 1979). Briefly, the animals explore two neutral but different compartments. One of them will be associated with the effects of the drug. After conditioning, the animal is offered the opportunity to choose between the two compartments (Figure 8). The time the animal spends in the drug-paired compartment is an indirect score of the reinforcing value of the drug. The animal will express a preference for that context where has experienced a positive reinforcement (conditioned place preference or CPP) and avoid that context that induces an aversive state (conditioned place aversion or CPA).

The model of place conditioning is a simple, quick and economical way to evaluate the pleasurable properties of the drugs. Thus, this model gives us a unique tool to verify the conditioning that can exert a drug and gives indirect information about possible pleasurable or dysphoric effects (Carboni and Vacca, 2003).

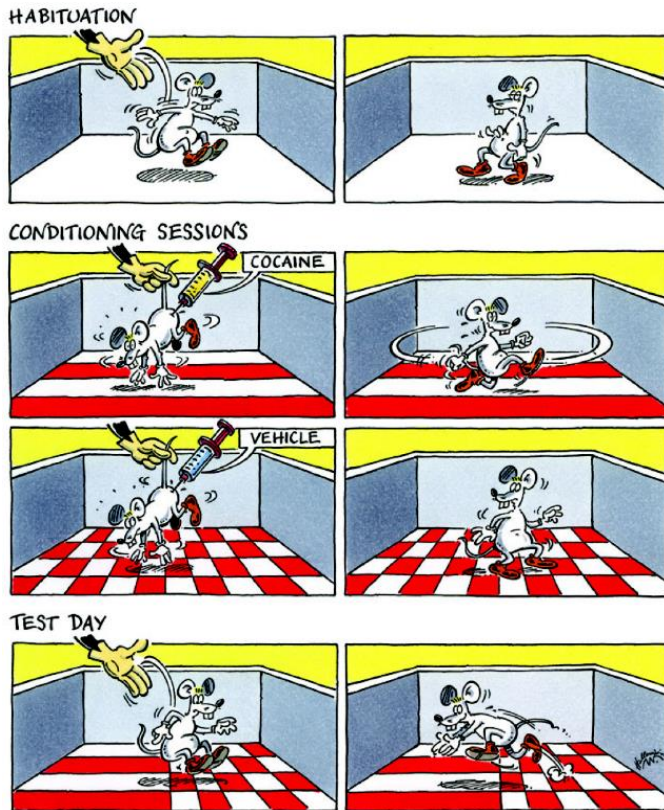


Figure 8. Paradigm of conditioned place preference. Taken from Sanchis-Segura and Spanagel, 2006.

3.3 OPERANT SELF-ADMINISTRATION

Operant conditioning was born from the psychological learning theory developed by Skinner. The basis of this paradigm is the notion of contingency between the response requests the animal and the reinforcement it receives as a result of it. Thus, when a reinforcing situation (drug effects) is contingent on a response (a lever, insert the nose in a hole), the probability increases that such behavior appears (Skinner, 1938). Operant conditioning is undoubtedly one of the most used and most predictive capability for the study of the neurobiological processes involved in addiction models. The method most commonly used is self-administered intravenously, but other routes of self-administration, as oral and intracranial are also used (Figure 9). Operant conditioning has helped to explain the behavior of self-administration of addicts to drugs of abuse. Self and Nestler (1995) pointed out that drugs are classified as reinforcers if the probability of a search response is increased when associated with drug exposure. Thus, intravenous self-administration of a drug is the gold standard in animal models that predicts the potential of a drug abuse (Collins et al., 1984).

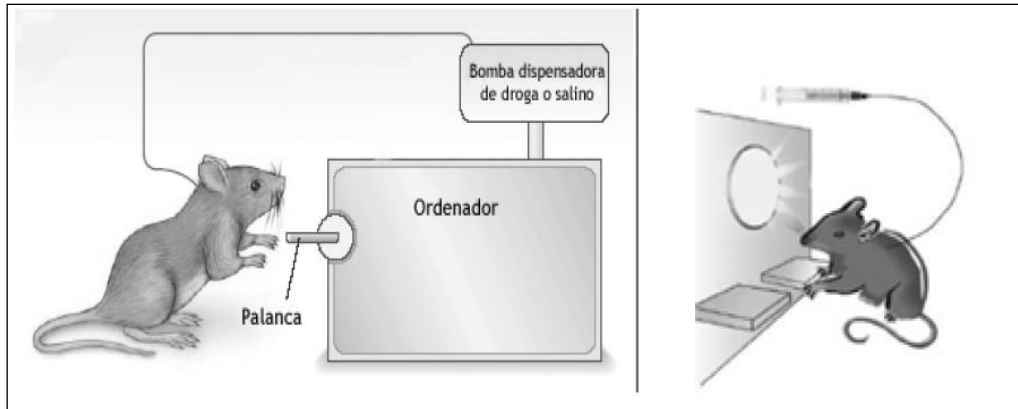


Figure 9. Model of operant conditioning reinforced by intravenous self-administration of a drug. (Modified from Cami and Farre, 2003).

This model is a variation of the original "Skinner box" where are available two handgrips (i.e. lever); the response in lever asset directly leads to the release of an intravenous infusion of drug (booster), and the response in the other lever has no consequence. Often, a protocol type "fixed ratio" in which the number of responses is required for reinforcement is fixed for each session.

There are other protocols such as variable ratio, fixed interval, variable interval, second-order patterns, etc. In the interval programs, reinforcement occurs after a period of time fixed or variable, from the last reinforced response. Second-order protocols are more complex, as they include two different programs, one of the protocols is fixed by interval and the other by fixed ratio.

4. SYSTEMS INVOLVED IN THE ADDICTIVE PROPERTIES OF MORPHINE

4.1 DOPAMINERGIC SYSTEMS

The dopaminergic system is one of the crucial elements in the addictive disorder, whose involvement and importance have repeatedly confirmed the studies in this field. The two most important dopaminergic brain areas involved in the addictive process are, the VTA and NAc.

VTA consists of 60-65% dopaminergic neurons, 25% of GABA interneurons and the rest by glutamatergic interneurons. The GABA interneurons express the μ -opioid receptor (MOR) (Swanson, 1982; Nair-Roberts et al., 2008). Morphine administration excited indirectly dopaminergic neurons by inhibiting GABA neurons synapse in dopaminergic VTA dendrites. This disinhibition of dopaminergic neurons requires the activation of NMDA and AMPA

receptors (Jalabert et al., 2011). In this regard, previous studies in animals have shown that acute activation of MOR, in naïve animals, inhibits glutamatergic neurons through arachidonic acid which enhance the K^+ channels voltage-dependent. GABA neurons are inhibited by G proteins that mediate the inhibition of Ca^{2+} and the activation of K^+ conductance, and GABA release is decreased by inhibiting cAMP, which facilitates the release of the neurotransmitter.

During chronic intake, a biphasic situation occurs in dopamine release. On one hand, when there is an acute intake of drug, extracellular DA levels are elevated; but on the other hand, after consumption ceased, decreased endogenous dopamine release occurs, which leads to consume again. Tolerance to the inhibitory effects of MOR on GABA neurons develops through the regulation of the compensatory rise of cAMP system, but K^+ channels in dopaminergic neurons are adjusted downward, setting an elevated basal download of DA activity in these neurons.

Finally, during abstinence exists a dopaminergic hypofunctionality associated with neuroadaptive changes affecting mainly the reward circuits in which the activity of the GABA neurons is increased by the increased activity of Ca^{2+} and reduced K^+ channel activity (Figure 10).

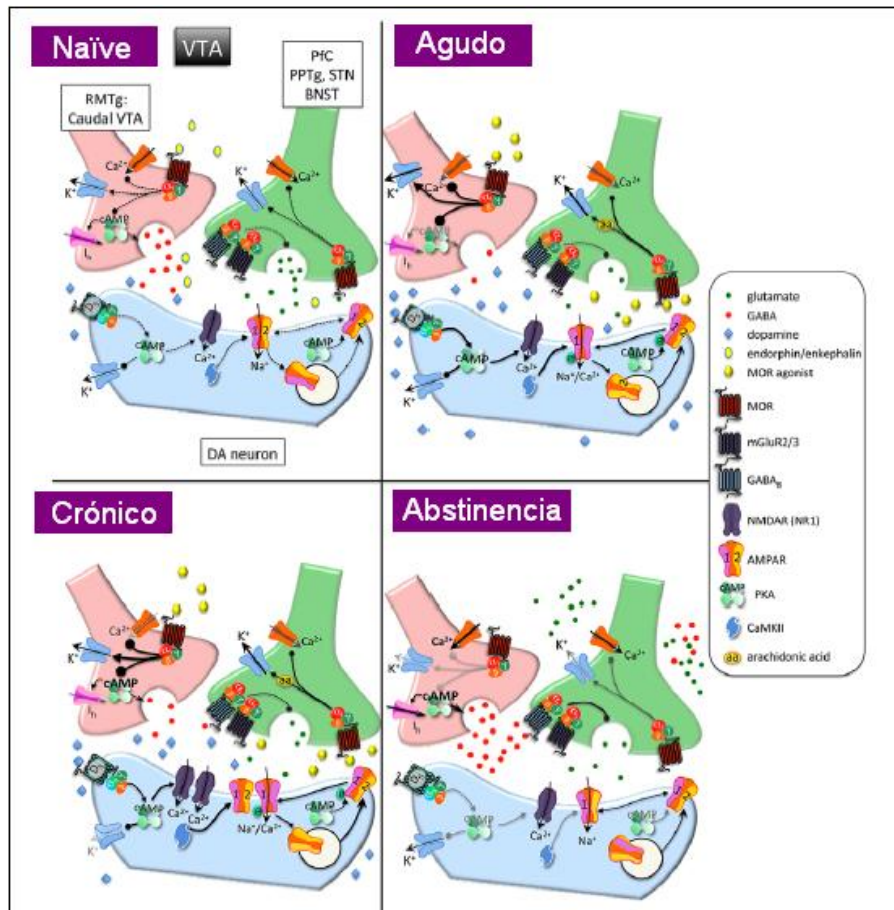


Figure 10. Interactions between MOR and glutamatergic afferents to the VTA. Modified from Chartoff and Connery, 2014.

NAC is a nucleus formed by a large majority of medium spiny neurons (MSNs) (90-95%), the remaining cells are cholinergic and GABA interneurons (Kawaguchi et al., 1995). These NAC MSNs can be divided into two groups, those that express receptors of D₁ family (D₁ and D₅ included) or D₂ receptor family (including D₂, D₃, D₄). Specifically, MOR is coupled to inhibitory G proteins (G_{αi}) and are located in glutamatergic and GABAergic terminals in the MSNs expressing D₁ receptor family. Acute activation of MOR in naïve animals suppresses the release of GABA and glutamate through inhibition of Ca²⁺ and the activation of K⁺ conductance as well as, the inhibition of other cations mediated by cAMP (Figure 11).

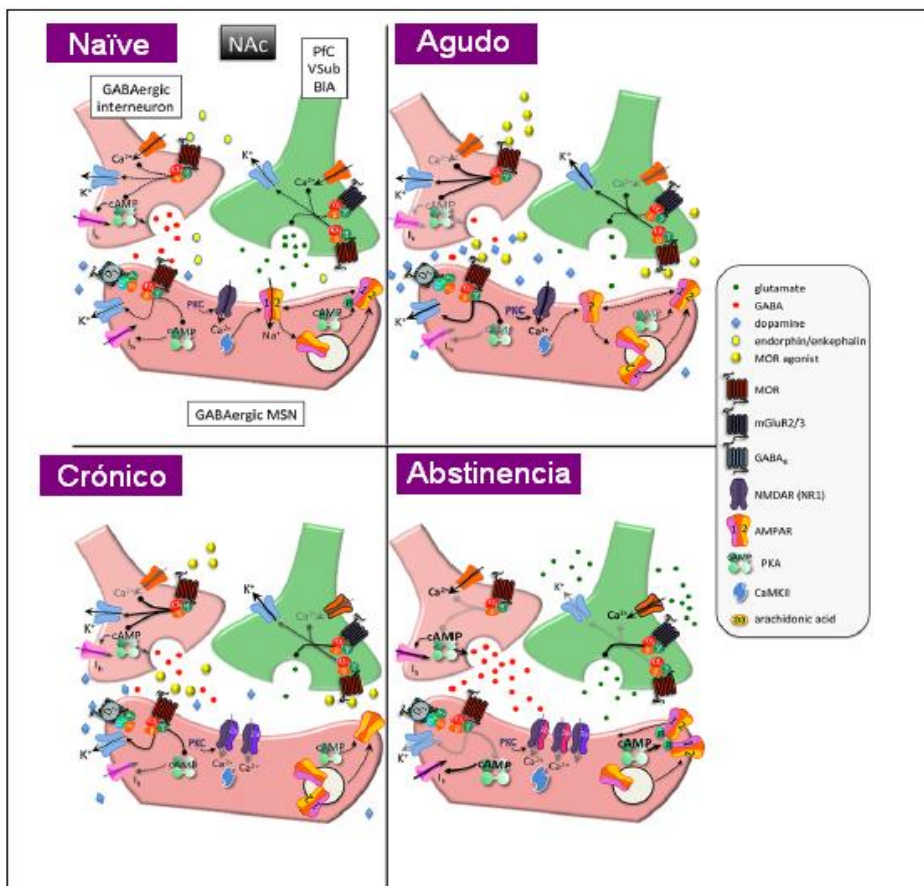


Figure 11. Interactions between MOR and input from the NAC. Modified from Chartoff and Connery, 2014.

Moreover, opioid chronic administration increases the inhibitory effect of mGluR2/3 receptors inhibiting pre-synaptic glutamate release

Finally, during opioid withdrawal syndrome, extracellular glutamate levels are increased but the synaptic transmission is reduced by the regulation of mGluR2/3. GABA release is enhanced by increasing the PKA/cAMP pathway.

Structurally, glutamatergic afferent fibers to the MSNs of the NAc synapse with dendritic spines modulating the synapsis of dopaminergic fibers by extra-synaptic connections. This triad

of dendritic spine, glutamatergic and dopaminergic synapses allows the DA to modulate the excitability of the neurons in the NAc (Sesack and Grace, 2010).

The cortical arousal performing the MSNs in the presence of DA is carried out by the activation of post-synaptic receptors D_1 . D_1 receptors are coupled to Gs proteins and activate the intracellular pathway of cyclic adenosine monophosphate (cAMP)/PKA/cAMP response binding (CREB) or other transcription factors (AP-1, GATA, STAT3, FOS, FOSB, JUN, ATF3, CEPBD, NFKBI and NFKBIZ) and therefore the expression of genes involved in addiction, such as c-fos, pro-DYN, AVP, AVPR1A, CRFR-1 CRFR-2, FKBP5, GAL, GLRA1, NPY1R and NR3C2 (Levrán et al., 2014; Bannon et al., 2014).

4.2 NORADRENERGIC SYSTEM

Other structures of the brain stress system are the nuclei and noradrenergic pathways, such as the NTS-A2, the VLM-A1 and the locus coeruleus (LC-A-6). For its part, the noradrenergic neurons of LC-A6 regulate the activity of the VTA and the CPF, stimulating the release of DA during acute drug administration (Goodman, 2008). Furthermore, noradrenergic LC-A6 projections innervate the CeA and the BNST modulating the allostasis in the extended amygdala by CRF release in this system during addiction. The NTS-A2, VLM-A1 and the LC-A6, send noradrenergic projections to the PVN, activating the α -1 and α -2 receptors in CRF neurons with the result of the HPA axis activation (Cunningham and Sawchenko, 1988; Sewybold and Cummings, 1988). In addition, there is evidence that CRF neurons of PVN, CeA and BNST, innervate the noradrenergic nuclei commented above (Daftary et al., 2000), establishing a loop of NA-CRF (Koob and Kreek, 2007) regulating the activation of brain stress system (Figure 12).

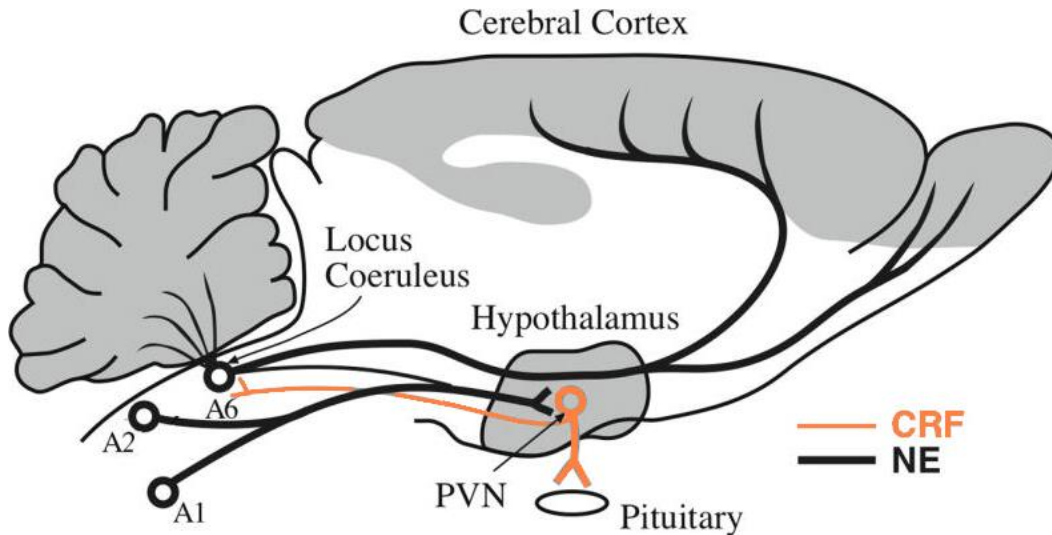


Figure 12. Diagram illustrating the two main projections of the noradrenergic system, the locus coeruleus (LC-A6) and VLM-A1/NTS-A2 and their interactions with the paraventricular nucleus of the hypothalamus (PVN) neurons containing corticotropin-releasing factor (CRF). The loop between the PVN and the LC-A6 is a reciprocal positive excitation modulating the body response to stress. Dunn and modified Swiergiel, 2008.

4.3 CRF SYSTEMS

At the end of the fifties, the presence of a hypothalamic factor that stimulated the secretion of ACTH in the anterior pituitary was demonstrated and was called CRF (Saffran and Schally, 1955; Guillemin and Rosenberg, 1955). The CRF is a 41 amino acid neuropeptide originally isolated from the ovine hypothalamus (Vale et al., 1981) which plays a crucial role in the regulation of the HPA axis, both at baseline and in response to stress (Suda et al., 2004). Its primary structure was determined in sheep by Spiess et al., in 1981 and later in different species including humans, rats, mice, pigs, goats or frogs. The CRF of mice and humans is identical although they differ slightly from sheep (Figure 13). The discovery of other peptides with significant structural similarity with CRF, especially the family of urocortins (urocortins-1, -2, -3) suggests a broader role not only in behavioral responses to stress but also in autonomous and peripheral responses (Bale and Vale, 2004).

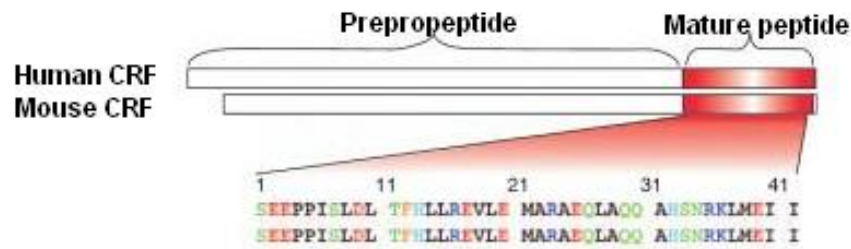


Figure 13. Corticotropin-releasing factor (CRF) aminoacid structure in humans and mice. There is great similarity in the pre-pro-peptide and the structure of the mature peptide in both animal species. Modified from Huising et al., 2010.

In recent years, it has been shown that during dependence of different substances of abuse, stimulation of hypothalamic and extra-hypothalamic CRF systems occurs, which has been postulated as a major factor in maintaining addiction and in relapse during the withdrawal (Koob, 2010; Koob et al., 2014; Wise and Koob, 2014; Zorrilla et al., 2014).

CRF is released in a variety of neuronal populations involved in processes of cognition, emotion and regulation of autonomic and endocrine functions (Figure 14). Most CRF neurons and fibers appear in areas that regulate the pituitary, the olfactory bulb, the hippocampus and the autonomic nervous system with cortical interneurons (Grigoriadis and De Souza, 2002). Thus, the largest concentration of CRF neurons in the PVN is in particular in the parvocellular region from which send axon terminals to the capillaries of the median eminence. There is also a small group of CRF neurons that project to the brainstem and spinal cord, in order to regulate the autonomic responses to stress, being important the CRF fibers in the NTS-A2, VLM-A1 and LC-A6. Other hypothalamic nuclei containing CRF neurons include the medial preoptic area, dorsomedial nucleus, arcuate nucleus, the posterior hypothalamus and the mammillary nucleus.

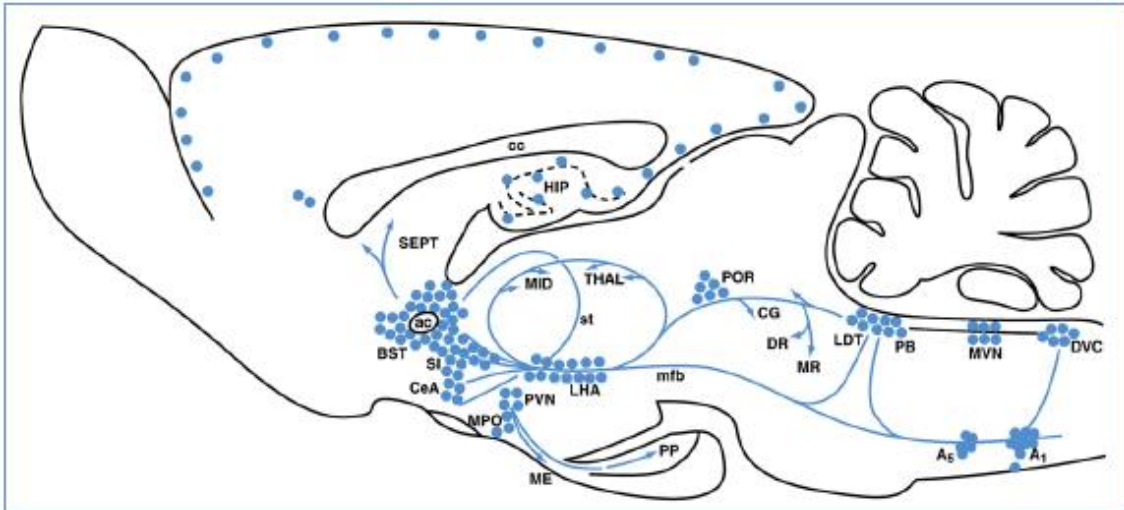


Figure 14. Schematic illustrating brain sagittal anatomic location of CRF neurons (circles) and fibers (fleches) mediating endocrine, autonomic and behavioral responses to stress. Taken from Zorrilla et al., 2014.

Various CRF neurons are found in structures of the extended amygdala. In concrete, CRF neurons project from the CeA to the PVN parvocellular region, the parabrachial nucleus and the brainstem; regulating behavior, neuroendocrine activity and autonomic function. CRF neurons of the BNST send terminals to the brainstem, as the parabrachial nucleus and the dorsal vagal complex, coordinating the autonomous activity. Moreover, CRF fibers interconnect the BNST with the AMY and the hypothalamus and reach the shell NAc regulating processes related to emotions. Towards the midbrain areas, such as the VTA, many CRF fibers are directed from the extended amygdala. Finally, a dispersed group of CRF neurons present in the AMY send a few projections to the hippocampus, the dentate gyrus (DG) and the subiculum.

At spinal cord level, CRF neurons are located in the V-VIII and X in the intermediolateral sheets and thoracic spine and lumbar level. These ascending fibers of CRF play an important role in modulating afferent sensitivity and sympathetic activity through pre-CRF ganglion neurons.

4.3.1 NEURONAL CRF PATHWAYS

CRF neuronal populations are conceptually divided in two brain systems, one that regulates neuroendocrine functions from the hypothalamus, and other extra-hypothalamic, which regulates nerve functions related to emotions, behavior and self-control versus stress functions.

Hypothalamic CRF system regulates the neuroendocrine stress HPA axis. This neuroendocrine axis is formed by the PVN, which is subdivided into the magnocellular region, whose neurons

synthesize vasopressin and oxytocin; and the parvocellular region, where the CRF neurons are found. The medial parvocellular region sends CRF projections to the median eminence inducing the release of ACTH by the anterior pituitary, which induces finally GC release by the adrenal glands (Figure 15).

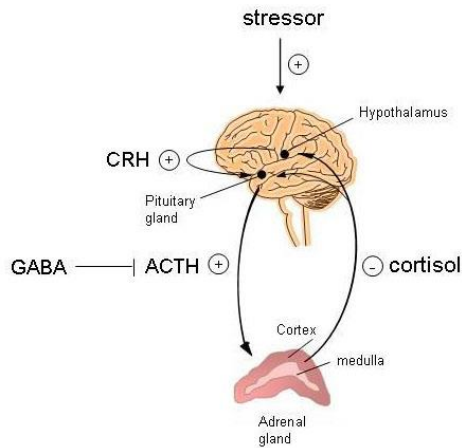


Figure 15: hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA). In response to stress or physical or psychological aggression, the hypothalamus releases corticotropin releasing factor (CRF), which stimulates the anterior pituitary release of adrenocorticotropic hormone (ACTH). ACTH stimulates the adrenal cortisol secretion. Excess of cortisol inhibits the release of CRF and ACTH by a negative feedback. Taken from Ross et al., 2013.

The GC exert a negative feedback on the release of CRF and ACTH. Various studies concluded that high plasma levels of GC during chronic stress increase the sensitivity of the mesocorticolimbic pathway to the reinforcing effects of drugs due to the presence of GC receptors in the VTA, which facilitate the release of DA (Polter and Kauer, 2014).

Extra-hypothalamic CRF system is a key component of the extended amygdala, which neuro-anatomy was discussed above. Numerous studies have demonstrated the importance of this system in the regulation of the responses associated with fear and stress. Its components are mainly involved in the negative reinforcing effects occurring during withdrawal, such as anxiety, depression, dysphoria etc. (Koob and Zorrilla, 2010; Breese et al., 2011; Logrip et al., 2011).

4.3.2 INVOLVEMENT OF CRF RECEPTORS IN ADDICTION

Various molecular studies have shown the existence of three types of CRF receptors, being named as CRF receptors-1, -2 and -3 (CRFR-1, CRFR-2 and CRFR-3). The three receptors belong to the subfamily of secretin/B G protein coupled receptors and all have an extracellular hormone binding domain (Langerstrom and Schioth, 2008). The CRFR-1 and CRFR-2 have been identified in humans, rodents and other mammals; while CRFR-3 only has been identified in catfish or *Silurus glanis* (Arai et al., 2001).

The general structure of CRF receptors (Figure 16) comprises an N-terminal extracellular (ECM 1), three helices in the extracellular domain (EC 2-4), seven domains domain transmembrane

(TMD 1-7), an intracellular domain consisting of three helices (ICD 1-3) and a C-terminal (Hoare, 2005).

These receptors are mainly CRF ligand but have been identified peptide analogues with high affinity for them, called urocortins.

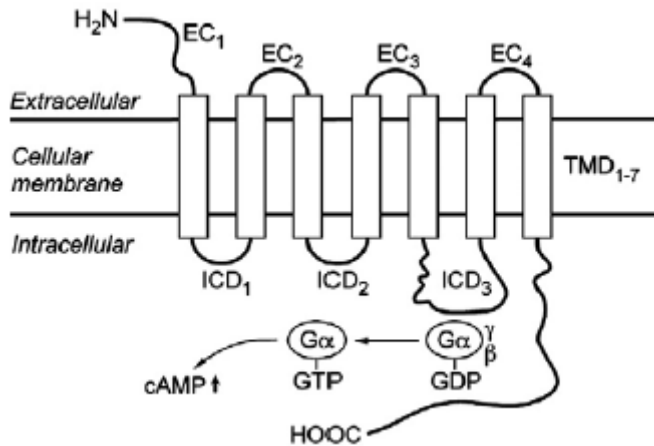


Figure 16. General Structure of CRF receptors. The N-terminal extracellular domain (EC1) has the highest ligand binding site affinity, while the extracellular domains (EC2-4), and the 7 transmembrane domains (TMD1-7) are partly involved in ligand binding. Taken from Yang et al., 2010.

The ligand activate the Gs-coupled receptor protein by binding to the N-terminal and the transmembrane segments (Grace et al., 2004), transducing the signal to the cells by the AC pathway and increasing cAMP production. However, recently it has been shown its ability to interact with other G proteins like Gq and Gi/o. Thus, CRF receptors can modulate various intracellular signaling pathways such as PKA, PKC, MAPK and the intracellular concentration of Ca²⁺ in both acute and chronic exposure to drugs and during withdrawal (Figure 17).

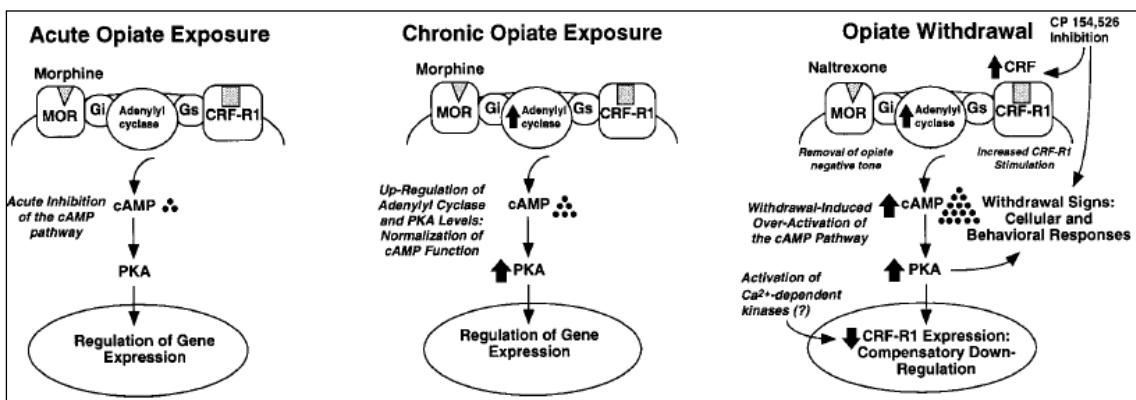


Figure 17. CRF-R1 signaling pathways during acute and chronic exposure and opioid withdrawal. Taken from Grace et al., 2004.

On one hand, it has been identified, among different animal species, eight allelic variants (a, b, c, d, e, f, g and h) of CRFR-1, consisting of 415-420 amino acids (Perrin et al., 1993). However, the CRFR-1 (a) seems to be the only active form of the eight variants (Grammatopoulos and

Chrousos, 2002). Meanwhile, there are three CRFR-2 variants: CRFR-2 (a) 411-413 amino acids, CRFR-2 (b) of 431-438 amino acids, and CRFR-2 (c) of 397 amino acids (Spiess et al., 1998).

Regarding its distribution in the body, it is different for each type (Figure 18). The CRFR-1 is abundant in the CNS, preferably in the anterior pituitary (Bale and Vale, 2004), hippocampus, cortex, cerebellum, AMY and olfactory bulb (Palchoudhuri et al., 1998). Recent studies showed moderate presence in the left atrium and both ventricles, of this receptor in humans and rodents (Kimura et al., 2002).

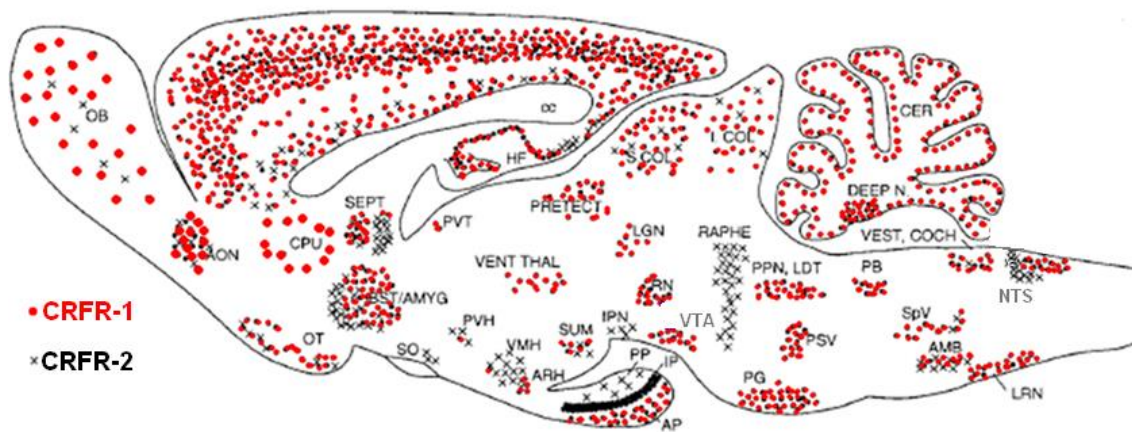


Figure 18. Distribution of CRF receptor type 1 and 2 in the mouse brain. Modified from Van Pett et al., 2000).

The CRFR-2 and its variants show a different distribution between human and rodents. In rats and mice, the CRFR-2 (a) is preferably located in the CNS, especially in the lateral septum, the ventromedial hypothalamus and the choroid plexus, however, its presence in the pituitary is testimonial (Hauger et al., 2003). The CRFR-2 (b) is detected mainly in brain arterioles and in peripheral tissues, including heart, vascular smooth muscle, lung, skeletal muscle, gastrointestinal tract, ovaries and testes (Hauger et al., 2003; Spiess et al., 1998). In contrast, human CRFR-2 (a) is expressed in both the CNS and in peripheral tissues and in the four cardiac chambers, while the CRFR-2 (b) is mainly found in the brain and in the left atrium (Kimura et al., 2002; Perrin and Vale, 1999). Currently, the CRFR-2 (c) only has been located in some regions such as the hippocampus and in small amounts in the AMY (Kostich et al., 1998).

CRF receptors have different binding ligands that modulate its activity. It has been demonstrated that the extracellular domains of CRFR-1, namely the domain EC-1 (N-terminal), is crucial for receptor binding of agonists and antagonists (Perrin et al., 2006), while domains EC-2, EC-4 and EC-3-TMD5 contribute to this union. The N-terminal region of CRF, although it binds to the TMD-5 with a weak affinity region, is responsible for receptor activation. Furthermore, TMD-3 and TMD-5 spirals are responsible for the binding of non-peptide ligands

(Spiess et al., 1998). The fact that the EC-1-4 regions of both CRFR-2 variants have a lower homology to the same regions of CRFR-1, could explain why the CRFR-2 preferentially binds to CRF analogs sauvagine and urocortin 2, rather than to the CRF (Palchaurri et al., 1998).

As for its functions, numerous studies have shown the important role of CRF receptors in the etiology of various pathological processes. Specifically, it is proposed involvement in various disorders associated with stress, such as anxiety and depression. In addition various studies have found that activation of neuronal CRF system is involved in the symptoms of withdrawal to different substances of abuse such as cocaine, amphetamines, alcohol and morphine. It has been proposed that the CRFR-1 is mediating the secretion of ACTH and anxiogenic effects occurring during withdrawal. This data is supported by studies in which the administration of antagonists CRFR-1 (Table 3) attenuates the activation of the HPA axis and signs of opioid withdrawal (Lu et al., 2000; Stinus et al., 2005; Contarino and Papaleo, 2005; Navarro-Zaragoza et al., 2010). Regarding CRFR-2 functions, recent studies point to its involvement in the morphine withdrawal syndrome (Papaleo et al., 2008; Ingallinesi et al., 2012) and relapse to drugs such as cocaine (Williams et al., 2014), although its function has been studied as potential therapeutic target in myocardial infarction, as it has been shown that urocortins, by activation of CRFR-2, produce a vasodilator and inotropic effect (Bale et al., 2004; Yang et al., 2010).

Table 3. Effects of CRFR-1 antagonists in various processes of addiction to drugs of abuse such as cocaine, opioids, alcohol, nicotine or cannabis. Modified from Koob, 2009.

Drug	CRF Antagonist Effects				
	Withdrawal-induced changes in extracellular CRF in CeA	Withdrawal-induced anxiety-like or aversive responses	Baseline self-administration or place preference	Dependence-induced increases in self-administration	Stress-induced reinstatement
Cocaine	↑	↓	—	↓	↓
Opioids	↑	↓	—	↓	↓
Ethanol	↑	↓	—	↓	↓
Nicotine	↑	↓	—	↓	↓
Δ^9 -THC	↑	↓			

—, no effect; blank entries indicate not tested. CeA, central nucleus of the amygdala.

4.3.3 INVOLVEMENT OF CRF AND ITS RECEPTORS IN ADDICTION

CRF systems play an important role in the three stages of the cycle of addiction but especially in the last stage or negative/withdrawal affective state. After the positive reinforcing effects regulated, by the DA in the VTA, a process of counter-regulation occurs to maintain homeostasis, producing dysthymia and a state of tension/wake through the down-regulation of the reward system and the up-regulation of the brain stress system, including CRF and NA in the extended amygdala (Koob and Zorrilla, 2010; Breese et al., 2011; Logrip et al., 2011). Following repeated cycles of intoxication/withdrawal, the allostasis process dominates the reward process and, consequently, the addict needs more drug to maintain the euthymia, progressively increasing the CRF in various brain areas (Figure 19). This process is mediated by the CRFR-1 in the extended amygdala increasing levels of CRF in the CeA and BNST during withdrawal to alcohol (Roberto et al., 2010; Olive et al., 2002), nicotine (George et al., 2007), cocaine (Richter and Weiss, 1999), opioids (Weiss et al., 2001) and cannabis (Rodriguez de Fonseca et al., 1997).

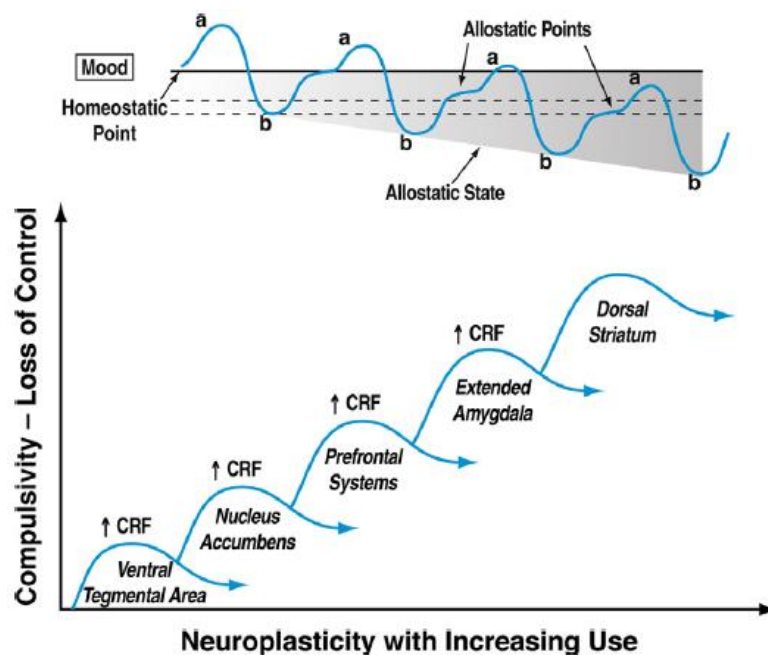


Figure 19. The progression of compulsive drug use alters the homeostasis through up-regulation of the CRF activity in multiple brain areas, such as the VTA, the NAc, the CPF and the extended amygdala. Taken from Zorrilla et al., 2014.

The counter-regulation process also increases the activation of the HPA axis via CRF receptor-1, raising the levels of ACTH and GC during withdrawal from drugs of abuse. GC, may activate

and sensitize CRF systems in the extended amygdala, interacting neuroendocrine and extra-hypothalamic CRF systems.

In fact, several studies have reported elevated levels of CRF and CRFR-1 after weeks of abstinence to ethanol or morphine in animal models (Zorrilla et al., 2001; Sommer et al., 2008); and the administration of CRFR-1 antagonists attenuated anxiety (Overstreet et al., 2002; Zhao et al., 2007).

It also has established a role for CRF/CRFR-1 in relapse to drug abuse. For example, antalarmin and MTIP, both CRFR-1 antagonists, attenuated relapse induced by stressful stimuli, as electrical stimulation, in rats dependent on alcohol, cocaine, opiates, nicotine and methamphetamine (Lu et al., 2003; Bruijnzeel et al., 2009; Nawata et al., 2012; Robert et al., 2010). In all cases, there was an increase of neurotransmission in the CRF systems of the extended amygdala which was inhibited by using CRFR-1 antagonists (Hansson et al., 2006; Francesconi et al., 2009).

Recent studies point to an important role of CRFR-2 in opiate withdrawal, as their antagonists inhibit the onset of withdrawal signs (Papaleo et al., 2008). Furthermore, CRFR-2 knockout mice did not suffer dysphoria during opioid withdrawal and showed basal levels of ACTH and corticosterone. Overall, the CRFR-2 could lead the response of extra-hypothalamic CRF underlying opiate withdrawal through a positive pre-synaptic regulation of the synthesis and release of CRF (Ingallinesi et al., 2012).

Actually, a few clinical human trials have been done using antagonists CRFR-1 to treat anxiety and major depression (pexacerfont and CP-316.311 respectively) with mixed results, but less effective than medical treatments approved currently, as benzodiazepines or antidepressants serotonin reuptake inhibitors (Coric et al., 2010; Binneman et al., 2008).

Currently, some clinical trials with CRFR-1 antagonists are being developed (Figure 20) to address problems related to addiction. The pharmaceutical company GlaxoSmithKline and the National Institutes of Health (NIH) are evaluating whether verucerfont can reduce stress and anxiety produced during the craving in women addicted to alcohol (NCT01187511). In addition, the laboratory Bristol Myers Squibb and the NIH are testing whether pexacerfont can prevent stress-induced by craving in patients on diet to palatable food (NCT01656577), smoking craving and abstinence (NCT01557556), and stress-induced by craving in alcoholic women who suffer from anxiety (NCT01227980) (Bailey et al., 2011; Zorrilla et al., 2013).

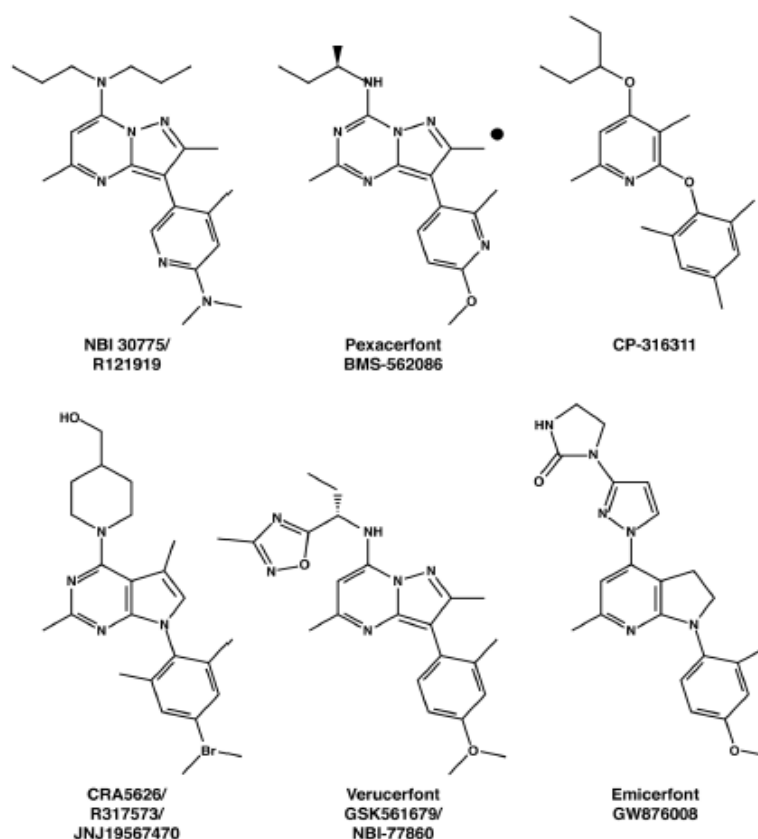


Figure 20. Chemical Structure of the different prototypes of CRFR-1 antagonists under evaluation. Taken from Zorrilla et al., 2013.

4.4 ROLE OF THE GLUCOCORTICIDS

GC secreted as a result of HPA axis activation play an important role in the processes that allow the organism to adapt to stressors (McEwen, 2008). Acute administration of active substances of abuse in animals enhance the HPA axis and could, first, facilitate activity in reward circuits and as a result promote the acquisition of drug seeking behavior (Piazza and Le Moal, 1997). Regarding the CRF, these acute changes are deregulated with the repeated administration of cocaine, opioids, nicotine and alcohol (Koob and Kreek, 2007). Currently, it is believed that an atypical response to stress may contribute to the persistence and relapse in the cycle of addiction (Kreek and Koob, 1998).

All drugs of abuse activate the HPA axis during drug administration and acute withdrawal. However, as the addiction cycle and abstinence continuous, HPA axis responses show tolerance, but the brain exposure to high levels of glucocorticoid cause profound effects on the extra-hypothalamic brain stress systems. Thus, although the transient elevation of GC is beneficial to the organism, repeated or prolonged elevations, as a result of chronic stress, produce a number of pathological conditions that contribute to addiction. At the cellular level, GC, through the glucocorticoid receptors (GRs), mediate genomic effects through transcriptional regulation (de Kloet et al., 2008) and non-genomic rapid effects through a variety of mechanisms including protein coupled receptors G, which regulate the production of

endogenous cannabinoids (Tasker et al., 2006) and the inhibition of monoamine transporter 3 sensitive to GC (Gasser et al., 2006).

The GRs are expressed in neural circuits involved in stress, including CRF neurons of BNST (Cintra et al., 1987) DA neurons in the VTA (Harfstrand et al., 1986), interneurons of CPF (Ostrander et al., 2003) and in various neuronal types in NAc (Zoli et al., 1990). In these regions, has been shown the implication of the GC in various processes including neuronal adaptation to stress, CRF mRNA expression in the BNST (Schulkin et al., 1998), increased glutamate in the VTA (Saal et al. 2003), dendritic morphology and DA neurotransmission in the CPF (Butts et al., 2011) and glutamatergic neurotransmission in the NAc (Campioni et al., 2009).

Therefore, GC are associated with a high response to novelty, facilitating the reward during the initial use of the drug and may also enhance neural adaptations in the brain, specifically in systems comprising the extended amygdala which contribute to disruption of homeostasis that triggers the pathology associated with substance abuse.

4.5 CHANGES IN THE PATTERNS OF GENE EXPRESSION

Addiction is the result of changes in the patterns of gene expression promoted by the cellular mechanism of drug action, modifying the neuronal homeostasis and in turn, the physiology of the neuronal circuits that develop the typical addictive behavior (Nestler and Aghajanian, 1997). Numerous mechanisms by which drug repeated exposure alters the gene expression of neurons in brain areas have been described, such as changes in the rate of gene transcription, modifications of the synthesis of the messenger ribonucleic acid (mRNA), alterations in protein maturation and trafficking them to their intracellular locations (Nestler, 2004).

CREB is a transcription factor that regulates the effects of the route of AC / cAMP / PKA on gene expression. PKA acts phosphorylating the serine residue (Ser) CREB 133, which causes dimerization of this transcription factor and the consequent binding of these to the CRE promoter sequence in the DNA, thus regulating the expression of various genes (Figure 21). CREB can also be phosphorylated in the same manner by other protein kinases such as the calcium-dependent kinase (CaMK), the protein kinase C (PKC), the extracellular regulatory kinase signal (ERKs) and the mitogen-activated kinases (MAPK) (Mayr and Montminy, 2001).

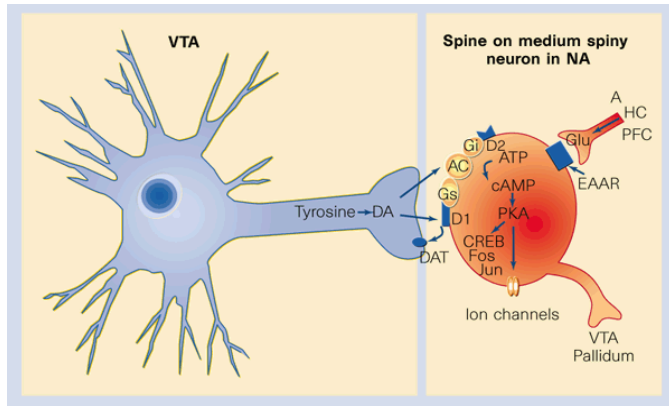


Figure 21. Diagram depicting how drugs phosphorylate CREB and heterodimerize Fos or Jun modifying gene expression of neurons. Taken from Maze et al., 2010.

CREB was first described in 1987 as a cAMP-responsive transcription factor regulating the somatostatin gene (Montminy and Bilezikjian, 1987) and has been discovered that regulates the transcription of various genes involved in addiction, among which are c-Fos, the brain-derived neurotrophic factor (BDNF), the tyrosine hydroxylase (TH) and multiple neuropeptides, enkephalins, the nerve growth factor (BGF) and the corticotropin-releasing hormone (CRF) (Carlezon et al., 2005). In turn, CREB is involved in conditioned learning processes mediated by the AMY (Nonaka et al., 2014), in processes of long term memory mediated by the hippocampus and the striatum (Shu et al., 2014; Bambah-Mukku et al., 2014) and neuronal plasticity (Madsen et al., 2012). Finally, CREB knockout mice showed less dependence and withdrawal (Maldonado et al., 1996).

Among the genes whose regulation is regulated by CREB, are the immediate expression genes (IEG), which expression is rapidly induced following exposure to certain stimuli. These genes have a great importance in the development of addiction, in particular the families of Fos and Jun, which are IEG encoding various transcription factors. The Fos family includes c-Fos, FosB, Fra-1 and 2 and Δ FosB (Nestler, 2012). Transcription factors, members of the Fos family, heterodimerize with the Jun (c-Jun, JunB) family forming the complex activating protein-1 (AP-1) which promote the gene transcription by binding to DNA.

Acute administration of various drugs of abuse induce the expression of several protein families discussed above, in a rapid and transient form, which lasts for 8 to 12 hours, returning to previous baseline. In contrast, other proteins such Δ FosB, are stable, so it will accumulate with repeated drug administration, becoming a predominant protein in the NAc. Furthermore, these proteins remain elevated months, even when the subject stops the administration of the addictive substance (Chen et al., 1997). These types of proteins produce permanent changes in addicted subjects (Chao and Nestler, 2004).

4.6 ROLE OF THE ANTIOXIDANT PROTEINS IN ADICTION

Actually, it is being investigated the posible relationship between antioxidant proteins and numerous transcription factors, not only in addiction but also in Parkinson or Alzheimer disease, in which has been found decreased levels of redox proteins, as the tioredoxin-1 (Trx-1) (Liu et al., 2013; Gil-Bea et al., 2012). The Trx-1 is found in almost all organisms and is essential for life. It is a 12 kD oxidoreductase enzyme formed by a dithiol-disulfide active site. It is ubiquitous and is found in many organisms from bacteria to plants and mammals. Many substrates have been identified in vitro for Trx-1, including ribonuclease, coagulation factors, insulin and glucocorticoid receptors. Trx-1 has various biological activities including regulation of transcription factors, the factors binding to DNA and neuroprotection. In particular, acts to facilitate reduction of other proteins through thiol-disulfide exchange in cysteine.

Trx-1 is upregulated by the ERKs and the CREB-CRE pathway. The Trx-1 is required for the signaling of the nerve growth factors, through CRE, which results in c-Fos expression. Therefore, the trx-1 is a neuronal cofactor exerting a cytoprotective role in the brain (Masutani et al., 2004). Trx-1 can translocate to the nucleus, interact with transcription factors such as NF- κ B, phosphorylate CREB inducing the expression of various genes as the anti-apoptotic Bcl-2 enzyme and antioxidant MnSOD, thereby increasing the survival of cells in the brain and heart (Chiueh et al., 2005). Recent studies have implicated Trx-1 in drug addiction. Specifically, administration of methamphetamine increases expression of Trx-1, which regulates the activity of CREB (Lev et al., 2013). Furthermore, morphine administration increased the levels of Trx-1 in the nucleus of neurons (Luo et al., 2012a, b). Other studies have suggested that epinephrine is capable of inducing the expression of Trx-1 through β receptor signaling cascade and cAMP / PKA / DARPP-32, promoting the expression of CREB (Jia et al., 2013).

5. CARDIAC CHANGES DURING THE ADDICTION: INVOLVEMENT CRF

Among the causes of death of addicts, is common the arrhythmia, myocardial infarction and sudden death, especially in cocaine and methamphetamine (Simonsen et al., 2011) and heroin addicts, with a mortality about 1-5% of addicts per year (Fernández-Miranda et al., 1999; Nerantzis et al., 2013.). The substances of abuse, not only cause molecular alterations in the CNS but also alter the regulation of peripheral organs such as the heart and cause alterations in proteins, receptors and signaling pathways.

If we consider that the regulation of the cardiac function depends on the coordination between the activity generated by the neurons located in the CNS and the neurons located in the heart ganglion (intrinsic cardiac innervation) (Ardell et al., 2001); cardiac adaptive changes

that occur after chronic morphine administration could be due to the activation of brain circuits and changes in the cardiac ganglion.

Currently, there is a good agreement between studies which conclude that CRF acts on the brain by modulating the response of the autonomic nervous system (Dunn and Berridge, 1990; Brown and Fisher, 1990). Stimuli from the environment stimulate the cerebral cortex and hippocampus areas activating the hypothalamus, particularly the PVN, an important region regulating the endocrine, autonomic and behavioral functions. As we have seen, the PVN regulates the activation of the bulbar areas through the release of CRF in the NTS-A2 and the VLM- A1, being the main brain area responsible of the cardiac sympathetic regulation (Nakamura and Sapru, 2009; Kc and Dick, 2010; Dampney et al., 2002). In addition, the PVN receives innervation of limbic structures related with emotions like CeA, the VTA or CPF, which may be involved in the cardiac response to external environmental factors. Therefore, CRF produces an activation of the sympathetic nervous system by stimulating the release of adrenaline in the adrenal gland and the transmission of NA in the liver, heart and vascular bed (Kang et al., 2011) (Figure 20). At cardiac level, CRF produces an increase in the mean arterial pressure and the heart rate (Martínez-Laorden et al., 2014).

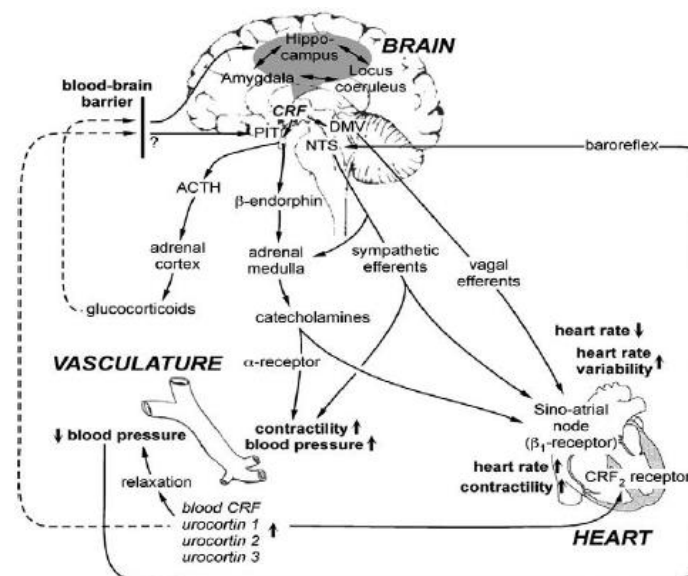


Figure 22. Cardiac sympathetic innervation Modified from Yang and cols., 2010

During addiction to substances of abuse, these neural pathways endure many adaptive changes that affect the regulation of the heart, modifying their signaling pathways, receptors, proteins and physiology.

Specifically, in the addiction to morphine, we found altered expression of various proteins including TH or heat shock protein (HSP) 27 in both the dependence and withdrawal syndrome (Martínez-Laorden et al., 2012, 2014; Drastichova et al., 2011). Moreover, it has been described alterations in proteins involved in cell signaling pathways such as PKC, MAPK, ERKs or p-38 (Drastichova, 2012; Almela et al., 2006; 2007).

MAIN AIM

Different anatomical, functional and behavioral studies suggest a role for the CRF systems in the addictive processes. In order to find therapeutic targets that could be useful for the treatment of addictions, the main objective of this study was focused on investigating the involvement of CRF systems and the CRF1 receptor in the positive and negative reinforcing effects of morphine addiction, and on cellular and molecular changes observed in different brain structures involved in reward systems, circuits of memory and stress. Here, we use genetically modified mice, in which the CRF1R has been deleted (knockdown, KO), and mice treated with a selective antagonist of the CRF1 mice. As addiction models, we used the conditioned place preference (CPP) and the conditioned place aversion (CPA), both paradigms of Pavlovian conditioning in which the reinforcing or aversive properties of a drug, first related to a neutral environmental stimuli, cause to conditioning throughout this environmental stimulus acquires motivational properties of either attraction or aversion, when the animal is subsequently exposed

ESPECIFIC AIMS

1. Our first objective was to establish the possible involvement of the brain stress system in the reinforcing effects of morphine. We evaluated, using animals treated with morphine CPP and their controls: a) activity of the HPA axis by determining plasma levels of ACTH and corticosterone (radioimmunoassay RIA); b) changes in the number of CRF neurons and their activation (immunocytochemistry double CRF / CREB) in some of the structures that make up the hypothalamic brain stress system (PVN) and extra-hypothalamic (CeA and BNST); c) projections of CRF neurons innervating the mesolimbic system (NAc and VTA) and the NTS-A2, main noradrenergic area that supplies the circuits of stress. All these parameters were also analyzed in a group of animals receiving morphine or saline out of the behavior box (unconditioned) (Article 1).
2. Since it is known that addiction, stress and memory share mechanisms modulation by common neurotrophic factors, intracellular cascades and brain structures, our next aim was to investigate the possible molecular changes that would arise in systems of the hypothalamic stress (PVN) and in DG, a hippocampal structure considered of great importance for the storage of the associated contexts and experiences in mice subjected to the test of CPP. The CRF released into the DG of the hippocampus by different stimuli activated the CRF1 receptor what triggers a series of signal transduction that phosphorylate the transcription factor CREB, factor largely studied in the field of learning, memory and drug addiction. To accomplish this

goal we evaluated the activation of CRF neurons in the PVN (double immunofluorescence CRF / CREB) and projections to DG and expression of pCREB and Trx-1 and its co-localization (Western blot, immunofluorescence) in both brain structures. Within this aim, we evaluate the involvement of CRF1 receptors in the reinforcing effects of morphine and observed changes in the parameters described above. To carry out it, we administered CP-154,526, a selective antagonist of CRF1 receptor (Article 2).

3. In rodents, the affective component of opioid dependence can be imaged and studied by the CPA model that offers a highly sensitive measure of the negative emotional state produced by the opioid withdrawal syndrome, while allowing explore the neurobiological mechanisms underlying aversive effects and extinction. On this basis, we evaluated the aversive effects precipitated by naloxone, using the CPA paradigm, in wild-type and CRF1 receptor knockout mice chronically treated with morphine. In addition, we explored the changes in the noradrenergic bulbar pathways (NTS-A2, VLM-A1) that innervate the VTA and the NAc by quantifying the number of TH neurons, the limiting enzyme of catecholamine synthesis, and the number of neurons TH phosphorylated at serine 40 or 31 in the NTS-A2 and VLM-A1. Also, we investigated the activation of such neurons by colocalization c-Fos / TH phosphorylated at serine 40 or 31 (immunohistochemistry) in KO mice of CRF1 receptor (Article 3).

4. Following the above objective, we studied the extinction of the aversive effects precipitated by naloxone in wild-type and KO mice chronically treated with morphine. We raised this target considering that the study of the adaptive changes that continue or disappear during extinction can give extensive information about the mechanisms that trigger relapse, the main problem of addiction. We evaluated the role of CRF1 receptor in the expression and extinction of aversive effects using the paradigm of CPA and we measured the physical signs of withdrawal syndrome and the HPA axis by determining plasma levels of ACTH and corticosterone (RIA) after expression or extinction of the aversive effects of withdrawal. This goal is conducted in male and female mice because there is limited knowledge in the mechanisms underlying the different addictive patterns in men and women (Article 4).

5. In addition to the neuroadaptive changes that occur in different areas of the CNS during the addictive processes, it is known that there is a close relationship between addiction and cardiac disorders. It has been reported that heroin produces significant changes in cardiac conduction leading to the production of different types of arrhythmias, responsible in part for the sudden death in addicts. Therefore, in this work, we evaluated the role of CRF1 receptors in the adaptive changes that occur in the central and peripheral noradrenergic pathways

during the withdrawal syndrome precipitated by naloxone. Since a clear connection between PVN, bulbar nuclei and heart has been described, here we evaluated the NA turnover in the PVN (HPLC), the activation of catecholaminergic neurons in the VLM-A1 by measuring TH phosphorylated at serine-40 expressing c-Fos (immunocytochemistry), and finally, the NA turnover and TH phosphorylated at serine 40 expression and PKA (Western blot) in cardiac tissue. To carry out this goal we used wildtype and KO mice lacking the CRF1 receptor (Article 5).

The results obtained in this thesis allow us to make the following conclusions:

1. CRF neurons located in the PVN and their projections to the NTS-A2 and VTA regulate the reinforcing effects of morphine showed by using the CPP paradigm. The increased activity (co-localization CRF / CREB) of CRF neurons in the PVN, CeA and BNST was not evident in animals conditioned to morphine in their home-cages. Therefore, the signals associated with the consumption induce an increase of the CRF pathways in the brain system stress, supporting the idea that the environment where the drugs are consumed plays a key role in the treatment of addiction.

2. The results of this study show that CP-154.526, a selective antagonist of CRF 1 receptors, abolished the CPP acquisition to morphine and the increased expression of CREB in the PVN and DG, an area considered important for memory storage of associated contexts and experiences. Furthermore, the expression of thioredoxin 1, a redox protein capable of phosphorylating CREB, and the co-localization of pCREB / thioredoxin were antagonized in the presence of CP-154.526 in the DG. These results demonstrate that CRF pathways, through the CRF1 receptor activation, are clearly involved in addictive processes, particularly, in the positive reinforcing effects (reward) and the association of drug reward with the environment.

3. The present study indicates that genetic deletion of the CRF1 receptor abolished the aversive effects of the withdrawal syndrome, as assessed by the CPA paradigm. Activation of TH neurons phosphorylated at serine 40 or 31 in the NTS-A2 observed after CPA paradigm was not abolished in KO animals for the CRF1 receptor, while activation of the noradrenergic neurons was suppressed in the area VLM. These results demonstrate that CRF1 receptors are implicated in the aversive effects of withdrawal and modulate the activation of some of the bulbar noradrenergic pathways which could be responsible of the negative symptoms of withdrawal. Due to the known anatomical and functional interactions between CRF and NA, CRF1 receptors could be an important therapeutic target for the treatment of morphine withdrawal syndrome.

4. Our results demonstrate that the aversive effects of morphine withdrawal syndrome are modulated by the activation of the HPA axis, with a clear increase in plasma concentrations of ACTH. Moreover, this increase return to baseline levels after the extinction of the aversive effects, which clearly indicates the involvement of hypothalamic brain stress system in the maintenance of aversive memory. Genetic deletion of the CRF1 receptor abolished the

aversive effects and the increased plasma ACTH concentrations, indicating the involvement of these receptors. The extinction of aversive memory was faster in females than in males demonstrating different addictive patterns in men and women which may be important in the clinical treatment of addictions.

5. From the results obtained in KO animals of the CRF1 receptor we can conclude that activation of CRF1 is involved in cardiac adaptive changes that occur in heart tissue (abolished the increase of NA turnover, TH expression and PKA) and the brain areas (PVN: abolished the increase of NA turnover; VLM: abolished TH activation of neurons) that control heart function. These results suggest that CRF pathways, through the CRF1 receptor activation, may contribute to the development of cardiac diseases associated with addictive process.



REFERENCIAS

Alheid GF, Beltramino CA, De Olmos JS, Forbes MS, Swanson DJ, Heimer L. The neuronal organization of the supracapsular part of the stria terminalis in the rat: the dorsal component of the extended amygdala. *Neuroscience* 1998; 84: 967-996

Almela P, Cerezo M, Milanés MV, Laorden ML. Role of PKC in regulation of Fos and TH expression after naloxone induced morphine withdrawal in the heart. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2006; 372: 374-382

Almela P, Milanés MV, Laorden ML. Activation of the ERK signalling pathway contributes to the adaptive changes in rat hearts during naloxone-induced morphine withdrawal. *Br J Pharmacol* 2007; 151: 787-97

Arai M, Assil IQ, Abou-Samra AB. Characterization of three corticotropin-releasing factor receptors in catfish: a novel third receptor is predominantly expressed in pituitary and urophysis. *Endocrinology* 2001; 142: 446-454

Bailey JE, Papadopoulos A, Diaper A, Phillips S, Schmidt M, van der Ark P, Dourish CT, Dawson GR, Nutt DJ. Preliminary evidence of anxiolytic effects of the CRF(1) receptor antagonist R317573 in the 7.5% CO(2) proof-of-concept experimental model of human anxiety. *J Psychopharmacol* 2011; 25: 1199-206

Bale TL, Vale WW. CRF and CRF receptors: role in stress responsivity and other behaviors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2004; 44: 525-557

Bale TL, Hoshijima M, Gu Y, Dalton N, Anderson KR, Lee KF, Rivier J, Chien KR, Vale WW, Peterson KL. The cardiovascular physiologic actions of urocortin II: acute effects in murine heart failure. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 3697-3702

Bambah-Mukku D, Travaglia A, Chen DY, Pollonini G, Alberini CM. A Positive Autoregulatory BDNF Feedback Loop via C/EBP β Mediates Hippocampal Memory Consolidation. *J Neurosci* 2014; 34: 12547-12559

Bannon MJ, Johnson MM, Michelhaugh SK, Hartley ZJ, Halter SD, David JA, Kapatos G, Schmidt CJ. A Molecular Profile of Cocaine Abuse Includes the Differential Expression of Genes that Regulate Transcription, Chromatin, and Dopamine Cell Phenotype. *Neuropsychopharmacology* 2014; 39: 2191–2199

Bassareo V, Di Chiara G. Modulation of feeding-induced activation of mesolimbic dopamine transmission by appetitive stimuli and its relation to motivational state. *Eur J Neurosci* 1999; 11, 4389–4397

Berger AC, Whistler JL. How to design an opioid drug that causes reduced tolerance and dependence. *Ann Neurol* 2010; 67: 559–569

-
- Binneman B, Feltner D, Kolluri S, Shi Y, Qiu R, Stiger T. A 6-week randomized, placebo-controlled trial of CP-316,311 (a selective CRH1 antagonist) in the treatment of major depression. *Am J Psychiatry* 2008; 165: 617-620
- Breese GR, Sinha R, Heilig M. Chronic alcohol neuroadaptation and stress contribute to susceptibility for alcohol craving and relapse. *Pharmacol Ther* 2011; 129: 149–171
- Bruijnzeel AW, Prado M, Isaac S. Corticotropin-releasing factor-1 receptor activation mediates nicotine withdrawal-induced deficit in brain reward function and stress-induced relapse. *Biol Psychiatry* 2009; 66: 110–117
- Butts KA, Weinberg J, Young AH, Phillips AG. Glucocorticoid receptors in the prefrontal cortex regulate stress-evoked dopamine efflux and aspects of executive function. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; 45: 18459-18464
- Cami J, Farre M. Drug addiction. *N Eng J Med* 2003; 349: 975-986
- Campioni MR, Xu M, McGehee DS. Stress-induced changes in nucleus accumbens glutamate synaptic plasticity. *J Neurophysiol* 2009; 101: 3192-3198
- Carboni E, Vacca C. Conditioned place preference. A simple method for investigating reinforcing properties in laboratory animals. *Methods Mol Med* 2003; 79: 481-498
- Carlezon WA Jr, Duman RS, Nestler EJ. The many faces of CREB. *Trends Neurosci* 2005; 28: 436-445
- Chao J, Nestler EJ. Molecular Neurobiology of drug addiction. *Annu Rev Med* 2004; 55: 113-132
- Chartoff EH, Connery HS. It's MORE exciting than mu: crosstalk between mu opioid receptors and glutamatergic transmission in the mesolimbic dopamine system. *Front Pharm* 2014; 5: 116; doi: 10.3389/fphar.2014.00116
- Chen J, Kelz MB, Hope BT, Nakabeppu Y, Nestler EJ. Chronic Fos-related antigens: stable variants of delta FosB induced in brain by chronic treatments. *J Neurosci* 1997; 17: 4933-4941
- Chen Y, Mestek A, Liu J, Yu L. Molecular cloning of a rat kappa opioid receptor reveals sequence similarities to the mu and delta opioid receptors. *Biochem J*. 1993; 295: 625-628
- Chiueh CC, Andoh T, Chock PB. Induction of thioredoxin and mitochondrial survival proteins mediates preconditioning-induced cardioprotection and neuroprotection. *Ann NY Acad Sci* 2005; 1042: 403-418
- Christie MJ. Cellular neuroadaptations to chronic opioids: tolerance, withdrawal and addiction. *Br J Pharmacol* 2008; 154: 384–396
- Cintra A, Fuxe K, Härfstrand A, Agnati LF, Wikström AC, Okret S, Vale W, Gustafsson JA. Presence of glucocorticoid receptor immunoreactivity in corticotrophin releasing factor and in

growth hormone releasing factor immunoreactive neurons of the rat di- and telencephalon. *Neurosci Lett.* 1987; 77: 25-30

Collins RJ, Weeks JR, Cooper MM, Good PI, Russell RR. Prediction of abuse liability of drugs using IV self-administration by rats. *Psychopharmacology* 1984; 82: 6-13

Contarino A, Papaleo F. The corticotropin-releasing factor receptor-1 pathway mediates the negative affective states of opiate withdrawal. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102: 18649-18654

Coric V, Feldman HH, Oren DA, Shekhar A, Pultz J, Dockens RC, Wu X, Gentile KA, Huang SP, Emison E, Delmonte T, D'Souza BB, Zimbroff DL, Grebb JA, Goddard AW, Stock EG. Multicenter, randomized, double-blind, active comparator and placebo-controlled trial of a corticotropin-releasing factor receptor-1 antagonist in generalized anxiety disorder. *Depress Anxiety* 2010; 27: 417-425

Cummings S, Seybold V. Relationships of alpha -1- and alpha-2-adrenergic binding sites to regions of the paraventricular nucleus of the hypothalamus containing corticotropin-releasing factor and vasopresin neurons. *Neuroendocrinology* 1988; 47: 523-532

Cunningham ET, Sawchenko PE. Anatomical specificity of noradrenergic inputs to the paraventricular and supraoptic nuclei of the rat hypothalamus. *J Com Neurol* 1988; 274: 60-76

Daftary SS, Boudaba C, Tasker JG. Noradrenergic regulation of parvocellular neurons in the rat hypothalamic paraventricular nucleus. *Neuroscience* 2000; 96: 743-751

Dampney RA, Sleman MJ, Fontes MA, Hirooka Y, Horiuchi J, Li YW, Polson JW, Potts PD, Tagawa T. Central mechanisms underlying short-and long-term regulation of the cardiovascular system. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2002; 29: 261-268

De Kloet ER, Han F, Meijer OC. From the stalk to down under about brain glucocorticoid receptors, stress and development. *Neurochem Res* 2008; 33: 637-642

De Luca MA, Solinas M, Bimpisidis Z, Goldberg SR, Di Chiara G. Cannabinoid facilitation of behavioral and biochemical hedonic taste responses. *Neuropharmacology* 2012; 63: 161-168

De Luca MA. Habituation of the responsiveness of mesolimbic and mesocortical dopamine transmission to taste stimuli. *Front Integr Neurosci* 2014; 8: 21. doi: 10.3389/fnint.2014.00021

De Souza EB, Grigoriadis DE. Corticotropin-releasing factor: physiology, pharmacology, and role in central nervous system disorders. *En Neuropsychopharmacology: The Fifth Generation of Progress.* Ed Davis KL, Charney D, Coyle JT, Nemeroff C 2002; pp 91-107

Di Chiara G, Imperato A. Opposite effects of mu and kappa opiate agonists on dopamine release in the nucleus accumbens and in the dorsal caudate of freely moving rats. *J Pharmacol Exp Ther* 1988; 244: 1067-80

- Di Chiara G. Drug addiction as dopamine-dependent associative learning disorder. *Eur J Pharmacol* 1999; 375: 13–30
- Diana M, Pistis M, Muntoni A, Gessa G. Profound decrease of mesolimbic dopaminergic neuronal activity in morphine withdrawn rats. *J Pharmacol Exp Ther* 1995; 272: 781–785
- Drastichova Z, Skrabalova J, Neckar J, Kolar F, Novotny J. Prolonged morphine administration alters protein expression in the rat myocardium. *J Biomed Sci* 2011; 18:89
- Drastichova Z, Skrabalova J, Jedelsky P, Neckar J, Kolar F, Novotny J. Global Changes in the Rat Heart Proteome Induced by Prolonged Morphine Treatment and Withdrawal. *PLoS One* 2012; 7(10): e47167
- Dunn AJ, Berridge CW. Physiological and behavioral responses to corticotropin-releasing factor administration: is CRF a mediator of anxiety of stress responses? *Brain Res Rev* 1990; 15:71–100
- Dunn AJ, Swiergiel AH. The role of corticotropin-releasing factor and noradrenaline in stress-related responses, and the inter-relationships between the two systems. *Eur J Pharmacol* 2008; 583: 186–193
- Edwards S, Koob GF. Neurobiology of dysregulated motivational systems in drug addiction. *Future Neurol* 2010; 5: 393-401
- Erb S, Shaham Y, Stewart J. The role of corticotropin-releasing factor and corticosterone in stress- and cocaine-induced relapse to cocaine seeking in rats. *J Neurosci* 1998; 18: 5529-5536
- Everitt BJ, Parkinson JA, Olmstead MC, Arroyo M, Robledo P, Robbins TW. Associative processes in addiction and reward: The role of amygdala-ventral striatal subsystems. *Ann NY Acad Sci* 1999; 877: 412–438
- Fan XL, Zhang JS, Zhang XQ, Yue W, and Ma L. Differential regulation of beta-arrestin 1 and beta-arrestin 2 gene expression in rat brain by morphine. *Neuroscience* 2003; 117: 383–389
- Fernández-Miranda JJ, González G^a-Portilla MP, Sáiz-Matínez PA, Gutierrez-Cienfuegos E, Bobes-García J. Calidad de vida y severidad de la adicción en heroinómanos en mantenimiento prolongado con metadona. *Adicciones* 1999; 11: 43-52
- Francesconi W, Berton F, Repunte-Canonigo V, Hagihara K, Thurbon D, Lekic D, Specio SE, Greenwell TN, Chen SA, Rice KC, Richardson HN, O'dell LE, Zorrilla EP, Morales M, Koob GF, Sanna PP. Protracted withdrawal from alcohol and drugs of abuse impairs long-term potentiation of intrinsic excitability in the juxtacapsular bed nucleus of the stria terminalis. *J Neurosci* 2009; 29: 5389–5401

Garzón J, Rodríguez-Muñoz M, Sánchez-Blázquez P. Direct association of Mu-opioid and NMDA glutamate receptors supports their cross-regulation: molecular implications for opioid tolerance. *Curr Drug Abuse Rev* 2012; 5: 199-226

Gasser PJ, Lowry CA, Orchinik M. Corticosterone-sensitive monoamine transport in the rat dorsomedial hypothalamus: potential role for organic cation transporter 3 in stress-induced modulation of monoaminergic neurotransmission. *J Neurosci* 2006; 34: 8758-3766

George O, Ghozland S, Azar MR, Cottone P, Zorrilla EP, Parsons LH, O'dell LE, Richardson HN, Koob GF. CRF-CRF1 system activation mediates withdrawal-induced increases in nicotine self-administration in nicotine dependent rats. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 2007; 104: 17198–17203

Gil-Bea F, Akterin S, Persson T, Mateos L, Sandebring A, Avila-Cariño J, Gutierrez-Rodriguez A, Sundström E, Holmgren A, Winblad B, Cedazo-Minguez A. Thioredoxin-80 is a product of alpha-secretase cleavage that inhibits amyloid-beta aggregation and is decreased in Alzheimer's disease brain. *EMBO Mol Med.* 2012; 4: 1097-111

Gold SJ, Han MH, Herman AE, Ni YG, Pudiak CM, Aghajanian GK, Liu RJ, Potts BW, Mumby SM, Nestler EJ. Regulation of RGS proteins by chronic morphine in rat locus coeruleus. *Eur J Neurosci* 2003; 17: 971–980

Goldstein RZ, Volkow ND. Drug addiction and its underlying neurobiological basis: neuroimaging evidence for the involvement of the frontal cortex. *Am J Psychiatry* 2002; 159: 1642-1652

Goodman A. Neurobiology of addiction. An integrative review. *Biochemical pharmacology* 2008; 75: 266-322

Grace CR, Perrin MH, Di Gruccio MR, Miller CL, Rivier JE, Vale WW, Riek R. NMR structure and peptide hormone binding site of the first extracellular domain of type B1 G protein-coupled receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 12836-12841

Grammatopoulos DK, Chrousos GP. Functional characteristics of CRH receptors and potential clinical applications of CRH-receptor antagonists. *Trends Endocrinol Metab* 2002; 13: 436-444

Guillemin R, Rosenberg B. Humoral hypothalamic control of anterior pituitary: a study with combined tissue cultures. *Endocrinology* 1955; 57: 599-607

Hansson AC, Cippitelli A, Sommer WH, Fedeli A, Bjork K, Soverchia L, Terasmaa A, Massi M, Heilig M, Ciccocioppo R. Variation at the rat *Crhr1* locus and sensitivity to relapse into alcohol seeking induced by environmental stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2006; 103: 15236–15241

Härfstrand A, Fuxe K, Cintra A, Agnati LF, Zini I, Wikström AC, Okret S, Yu ZY, Goldstein M, Steinbusch H. Glucocorticoid receptor immunoreactivity in monoaminergic neurons of rat brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83: 9779-9783

Hauger RL, Grigoriadis DE, Dallman MF, Plotsky PM, Vale WW, Dautzenberg FM. Current status of the nomenclature for receptors for corticotropin-releasing factor and their ligands. *Pharmacol Rev* 2003; 55: 21-26

Heimer L, Alheid G. Piercing together the puzzle of basal forebrain anatomy. In Napier TC, Kalivas PW, Hanin I (eds), *The Basal Forebrain: Anatomy to Function*. New York, Plenum Press 1991; 1–42

Hoare SR. Mechanisms of peptide and non-peptide ligand binding to Class B G-protein-coupled receptors. *Drug Discov Today* 2005; 10: 417-427

Hua XY, Moore A, Malkmus S, Murray SF, Dean N, Yaksh TL, Butler M. Inhibition of spinal protein kinase C alpha expression by an antisense oligonucleotide attenuates morphine infusion-induced tolerance. *Neuroscience* 2002; 113: 99–107

Huising MO, Vale WW. Corticotropin-releasing hormone and urocortines: binding proteins and receptors. En *Stress Science: Neuroendocrinology* ed George Fink 2010, pp 87-92

Ingallinesi M, Rouibi K, Le Moine C, Papaleo F, Contarino A. CRF2 receptor-deficiency eliminates opiate withdrawal distress without impairing stress coping. *Mol Psychiatry* 2012; 17: 1283-1294

Jalabert M, Bourdy R, Courtin J, Veinante P, Manzoni OJ, Barrot M, Georges F. Neuronal circuits underlying acute morphine action on dopamine neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; 108: 16446-16450

Jentsch JD, Taylor JR. Impulsivity resulting from frontostriatal dysfunction in drug abuse: Implications for the control of behavior by reward-related stimuli. *Psychopharmacology* 1999; 146: 373–390

Jia JJ, Zeng XS, Li Y, Ma S, Bai J. Ephedrine induced thioredoxin-1 expression through β -adrenergic receptor/cyclic AMP/protein kinase A/dopamine-and cyclic AMP-regulated phosphoprotein signaling pathway. *Cell Signal* 2013; 25: 1194-1201

Kalivas PW, Volkow ND. The neural basis of addiction: a pathology of motivation and choice. *Am J Psychiatry* 2005; 162: 1403-1413

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

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

Katz RJ, Gormezano G. A rapid and inexpensive technique for assessing the reinforcing effects of opiate drugs. *Pharmacol Biochem Behav* 1979; 11: 231-233

- Kawaguchi Y, Wilson CJ, Augood SJ, Emson PC. Striatal interneurons: chemical, physiological and morphological characterization. *Trends Neurosci* 1995; 18: 527–535
- Kc P, Dick T. Modulation of cardiorespiratory function mediated by the paraventricular nucleus. *Resp Physiol Neurobiol* 2010; 174: 55-64
- Kimura Y, Takahashi K, Totsune K, Muramatsu Y, Kaneko C, Darnel AD, Suzuki T, Ebina M, Nukiwa T, Sasano H. Expression of urocortin and corticotropin-releasing factor receptor subtypes in the human heart. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87: 340-346
- Koch T, Wu DF, Yang LQ, Brandenburg LO, and Höllt V. Role of phospholipase-D2 in the agonist-induced and constitutive endocytosis of G-protein coupled receptors. *J Neurochem* 2006; 97: 365–372
- Koch T, Höllt V. Role of receptor internalization in opioid tolerance and dependence. *Pharmacol Ther* 2008; 117: 199–206
- Koob GF. Drugs of abuse: Anatomy, pharmacology, and function of reward pathways. *Trends Pharmacol Sci* 1992; 13: 177–184
- Koob GF. Animal models of drug addiction. In Bloom FE, Kupfer DJ (eds), *Psychopharmacology 1995; The Fourth Generation of Progress*. New York, Raven Press, pp 759–772
- Koob GF, Le Moal M. Drug abuse: hedonic homeostatic dysregulation. *Science* 1997; 278: 52-58
- Koob GF, Carrera R, Gold L, Heyser C, Maldonado-Irizarry C, Markou A, Parsons L, Roberts A, Schulteis G, Stinus L, Walker J, Weissenborn R, Weiss F. Substance dependence as a compulsive behavior. *J Psychopharmacol* 1998; 12: 39–48
- Koob GF. The role of the striatopallidal and extended amygdala systems in drug addiction. *Ann NY Acad Sci* 1999; 877: 445–460
- Koob, GF, Le Moal, M. Drug addiction, dysregulation of reward, and allostasis. *Neuropsychopharmacology* 2001; 24: 97-129
- Koob GF, Ahmed SH, Boutrel B, Chen SA, Kenny PJ, Markou A, O'Dell LE, Parsons LH, Sanna PP. Neurobiological mechanisms in the transition from drug abuse to drug dependence. *Neurosci Biobehav Rev* 2004; 27: 739-749
- Koob GF, Kreek MJ. Stress, dysregulation of drug reward pathways, and the transition to drug dependence. *Am J Psychiatry* 2007; 164: 1149-1159
- Koob GF, Le Moal M. Neurobiological mechanisms for opponent motivational processes in addiction. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2008; 363: 3113-3123

- Koob GF. Neurobiological substrates for the dark side of compulsivity in addiction. *Neuropharmacology* 2009; 56: 18–31
- Koob GF, Volkow ND. Neurocircuitry of Addiction. *Neuropsychopharmacology* 2010; 35: 217–238
- Koob GF, Zorrilla EP. Neurobiological mechanisms of addiction: focus on corticotropin-releasing factor. *Curr Opin Investig Drugs* 2010; 11: 63–71
- Koob GF, Buck CL, Cohen A, Edwards S, Park PE, Schlosburg JE, Schmeichel B, Vendruscolo LF, Wade CL, Whitfield Jr TW, George O. Addiction as a stress surfeit disorder. *Neuropharmacology* 2014; 76: 370-382
- Kostich WA, Chen A, Sperle K, Largent BL. Molecular identification and analysis of a novel human corticotropin-releasing factor (CRF) receptor: the CRF2gamma receptor. *Mol Endocrinol* 1998; 12: 1077-1085
- Kreek MJ, Koob GF. Drug dependence: stress and dysregulation of brain reward pathways. *Drug Alcohol Depend.* 1998; 51: 23-47
- Lander ES, Schork NJ. Genetic dissection of complex traits. *Science* 1994; 265: 2037-2048
- Le Merrer J, Becker JA, Befort K, Kieffer BL. Reward processing by the opioid system in the brain. *Physiol Rev* 2009; 89: 1379–1412
- Le Moal M, Simon H. Mesocorticolimbic dopaminergic network: Functional and regulatory roles. *Physiol Rev* 1991; 71: 155–234
- Le Moal M. Mesocorticolimbic dopaminergic neurons: Functional and regulatory roles. In Bloom FE, Kupfer DJ (eds), *Psychopharmacology 1995; The Fourth Generation of Progress*. New York, Raven Press, pp 283–294
- Levrán O, Peles, E, Randesi, M, Li Y, Rotrosen J, Ott J, Adelson M, Kreek MJ. Stress-related genes and heroin addiction: A role for a functional *FKBP5* haplotype. *Psychoneuroendocrinology* 2014; 45: 67-76
- Liu X, Weiss F. Additive effect of stress and drug cues on reinstatement of ethanol seeking: exacerbation by history of dependence and role of concurrent activation of corticotropin-releasing factor and opioid mechanisms. *J Neurosci* 2002; 22: 7856-7861
- Liu Z, Jing Y, Yin J, Mu J, Yao T, Gao L. Downregulation of thioredoxin reductase 1 expression in the substantia nigra pars compacta of Parkinson's disease mice. *Neural Regen Res* 2013; 8: 3275-3283
- Logrip ML, Koob GF, Zorrilla EP. Role of corticotropin-releasing factor in drug addiction: potential for pharmacological intervention. *CNS Drugs* 2011; 25: 271–287

- Lu L, Ceng X, Huang M. Corticotropin-releasing factor receptor type I mediates stress-induced relapse to opiate dependence in rats. *Neuroreport* 2000; 11: 2373-2378
- Lu L, Chen H, Su W, Ge X, Yue W, Su F, Ma L. Role of withdrawal in reinstatement of morphine-conditioned place preference. *Psychopharmacology* 2005; 181: 90-100
- Luo FC, Feng YM, Zhao L, Kui L, Wang SD, Song JY, Bai J. Thioredoxin-1 expression regulated by morphine in sh-sy5y cells. *Neurosci Letters* 2012a; 523: 50-55
- Luo FC, Qi L, Lv T, Wang SD, Liu H, Nakamura H, Yodoi J, Bai J. Geranylgeranylacetone protects mice against morphine induced hyperlocomotion, rewarding effect, and withdrawal syndrome. *Free Radic Biol Med* 2012b; 52: 1218–1227
- Lv T, Wang SD, Bai J. Thioredoxin-1 was required for CREB activity by methamphetamine in rat pheochromocytoma cells. *Cell Mol Neurobiol* 2013; 33: 319-325
- Madsen HB, Brown RM, Lawrence AJ. Neuroplasticity in addiction: cellular and transcriptional perspectives. *Front Mol Neurosci* 2012; 5: 99, 1-16
- Mahler SV, Smith RJ, Moorman DE, Sartor GC, Aston-Jones G. Multiple roles for orexin/hypocretin in addiction. *Prog Brain Res* 2012; 198: 79-121
- Maldonado R, Blendy JA, Tzavara E, Gass P, Roques BP, Hanoune J, Schütz G. Reduction of morphine abstinence in mice with a mutation in the gene encoding CREB. *Science* 1996; 273: 657-659
- Markou A, Weiss F, Gold LH, Caine SB, Schulteis G, Koob GF. Animal models of drug craving. *Psychopharmacology* 1993; 112: 163-182
- Martínez-Laorden E, Hurlé MA, Milanés MV, Laorden ML, Almela P. Morphine withdrawal activates hypothalamic-pituitary-adrenal axis and heat shock protein 27 in the left ventricle: the role of extracellular signal-regulated kinase. *J Pharmacol Exp Ther* 2012; 342: 665-675
- Martínez-Laorden E, García-Carmona JA, Baroja-Mazo A, Romecín P, Atucha NM, Milanés MV, Laorden ML. Corticotropin-releasing factor (CRF) receptor-1 is involved in cardiac noradrenergic activity observed during naloxone-precipitated morphine withdrawal. *Br J Pharmacol* 2014; 171: 688-700
- Masutani H, Bai J, Kim YC, Yodoi J. Thioredoxin as a neurotrophic cofactor and an important regulator of neuroprotection. *Mol Neurobiol* 2004; 29: 229-242
- Matthes HW, Maldonado R, Simonin F, Valverde O, Slowe S, Kitchen I, Befort K, Dierich A, Le Meur M, Dollé P, Tzavara E, Hanoune J, Roques BP, Kieffer BL. Loss of morphine-induced analgesia, reward effect and withdrawal symptoms in mice lacking the mu-opioid-receptor gene. *Nature* 1996; 383: 819–823

Mayfield RD, Schuckit MA. Genetic factors influencing alcohol dependence. *Br J Pharmacol* 2008; 154: 275-287

Mayr B, Montminy M. Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001; 8: 599-609

Maze I, Feng J, Wilkinson MB, Sun HS, Shen L, Nestler EJ. Cocaine dynamically regulates heterochromatin and repetitive element unsilencing in nucleus accumbens. *Proc Natl Acad Sci* 2010; 108: 3035–3040

McEwen BS. Stress, adaptation, and disease. Allostasis and allostatic load. *Ann N Y Acad Sci* 1998; 840: 33-44

Melis M, Spiga S, Diana M. The dopamine hypothesis of drug addiction: hypodopaminergic state. *Int Rev Neurobiol* 2005; 63:101-154

Montminy MR, Bilezikjian LM. Binding of a nuclear protein to the cyclic-AMP response element of the somatostatin gene. *Nature* 1987; 328: 175-8

Nair-Roberts RG, Chatelain-Badie SD, Benson E, White-Cooper H, Bolam JP, Ungless MA. Stereological estimates of dopaminergic, GABAergic and glutamatergic neurons in the ventral tegmental area, substantia nigra and retrorubral field in the rat. *Neuroscience* 2008; 152: 1024–1031

Nakamura T, Sapru HN. Cardiovascular responses to microinjections of urocortins into the NTS: role of inotropic glutamate receptors. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2009; 296: 2022-2029

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

Nawata Y, Kitaichi K, Yamamoto T. Increases of CRF in the amygdala are responsible for reinstatement of methamphetamine-seeking behavior induced by footshock. *Pharmacol Biochem Behav* 2012; 101: 297–302

Nerantzis CE, Couvaris CM, Pastromas SC, Marianou SK, Boghiokas ID, Koutsaftis PN. Histological findings of the atrioventricular conductive system in street heroin addicts, victims of sudden unexpected death. *J Forensic Sci* 2013; 58: 99-104

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

Nestler EJ. Molecular mechanisms of drug addiction. *Neuropsychopharmacology* 2004; 47: 24-32

Nestler EJ. Transcriptional mechanisms of drug addiction. *Clin Psychopharmacol Neurosci* 2012; 10:136-143

- Newton PM, Kim JA, McGeehan AJ, Paredes JP, Chu K, Wallace MJ, Roberts AJ, Hodge CW, Messing RO. Increased response to morphine in mice lacking protein kinase C epsilon. *Genes Brain Behav* 2007; 6: 329–338
- Nonaka M, Kim R, Fukushima H, Sasaki K, Suzuki K, Okamura M, Ishii Y, Kawashima T, Kamijo S, Takemoto-Kimura S, Okuno H, Kida S, Bito H. Region-Specific Activation of CRT1-CREB Signaling Mediates Long-Term Fear Memory. *Neuron* 2014; 84: 92-106
- Olds J, Milner P. Positive reinforcement produced by electrical stimulation of septal area and other regions of rat brain. *J Comp Physiol Psychol* 1954; 47: 419-427
- Olive MF, Koenig HN, Nannini MA, Hodge CW. Elevated extracellular CRF levels in the bed nucleus of the stria terminalis during ethanol withdrawal and reduction by subsequent ethanol intake. *Pharmacol Biochem Behav* 2002; 72: 213–220
- Ostrander MM, Richtand NM, Herman JP. Stress and amphetamine induce Fos expression in medial prefrontal cortex neurons containing glucocorticoid receptors. *Brain Res* 2003; 990: 209-214
- Overstreet DH, Knapp DJ, Breese GR. Accentuated decrease in social interaction in rats subjected to repeated ethanol withdrawals. *Alcohol Clin Exp Res* 2002; 26: 1259–1268
- Palchoudhuri MR, Wille S, Mevenkamp G, Spiess J, Fuchs E, Dautzenberg FM. Corticotropin-releasing factor receptor type 1 from *Tupaia belangeri*--cloning, functional expression and tissue distribution. *Eur J Biochem* 1998; 258: 78-84
- Papaleo F, Ghozland S, Ingallinesi M, Roberts AJ, Koob GF, Contarino A. Disruption of the CRF(2) receptor pathway decreases the somatic expression of opiate withdrawal. *Neuropsychopharmacology* 2008; 33: 2878-2887
- Perrin MH, Donaldson CJ, Chen R, Lewis KA, Vale WW. Cloning and functional expression of a rat brain corticotropin releasing factor (CRF) receptor. *Endocrinology*. 1993; 133: 3058-3061
- Perrin MH, Vale WW. Corticotropin releasing factor receptors and their ligand family. *Ann NY Acad Sci* 1999; 885: 312-328
- Perrin MH, Grace CR, Riek R, Vale WW. The three-dimensional structure of the N-terminal domain of corticotropin-releasing factor receptors: sushi domains and the B1 family of G protein-coupled receptors. *Ann N Y Acad Sci*. 2006; 1070: 105-119
- Piazza PV, Le Moal M. Glucocorticoids as a biological substrate of reward: physiological and pathophysiological implications. *Brain Res Brain Res Rev* 1997; 25: 359-372
- Piñeyro G, Archer-Lahlou E. Ligand-specific receptor states: implications for opiate receptor signalling and regulation. *Cell Signal* 2007; 19: 8–19

-
- Plan Nacional Sobre Drogas. Memoria 2012. Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad. <http://www.pnsd.msssi.gob.es/Categoria2/publica/pdf/memo2012.pdf>
- Polter AM, Kauer JA. Stress and VTA synapses: implications for addiction and depression. *Eur J Neurosci* 2014; 39: 1179-1188
- Rankin CH, Abrams T, Barry RJ, Bhatnagar S, Clayton DF, Colombo J. Habituation revisited: an updated and revised description of the behavioral characteristics of habituation. *Neurobiol Learn Mem* 2009; 92: 135–138
- Richter RM, Weiss F. In vivo CRF release in rat amygdala is increased during cocaine withdrawal in self-administering rats. *Synapse* 1999; 32: 254–261
- Roberto M, Cruz MT, Gilpin NW, Sabino V, Schweitzer P, Bajo M, Cottone P, Madamba SG, Stouffer DG, Zorrilla EP, Koob GF, Siggins GR, Parsons LH. Corticotropin releasing factor-induced amygdala gamma-aminobutyric acid release plays a key role in alcohol dependence. *Biol Psychiatry* 2010; 67: 831–839
- Robinson TE, Berridge KC. Incentive-sensitization and addiction. *Addiction* 2001; 96: 103-114
- Rodriguez De Fonseca F, Carrera MR, Navarro M, Koob GF, Weiss F. Activation of corticotropin-releasing factor in the limbic system during cannabinoid withdrawal. *Science* 1997; 276: 2050–2054
- Ross AP, Ben-Zacharia A, Harris C, Smrtka J. Multiple sclerosis, relapses, and the mechanism of action of adrenocorticotrophic hormone. *Front Neurol* 2013; 4: 21. doi: 10.3389/fneur.2013.00021
- Rossetti ZL, Hmaidan Y, Gessa GL. Marked inhibition of mesolimbic dopamine release: a common feature of ethanol, morphine, cocaine and amphetamine abstinence in rats. *Eur J Pharmacol* 1992; 221: 227-234
- Saal D, Dong Y, Bonci A, Malenka RC. Drugs of abuse and stress trigger a common synaptic adaptation in dopamine neurons. *Neuron* 2003; 37: 577-582
- Saffran M, Schyally AV. The release of corticotrophin by anterior pituitary tissue in vitro. *Can J Biochem Physiol* 1955; 33: 408-415
- Sanchis-Segura C, Spanagel R. Behavioural assessment of drug reinforcement and addictive features in rodents: an overview. *Addict Biol* 2006, 1: 2-38
- Schulkin J, Gold PW, McEwen BS. Induction of corticotropin-releasing hormone gene expression by glucocorticoids: implication for understanding the states of fear and anxiety and allostatic load. *Psychoneuroendocrinology* 1998; 23: 219-243

- Schlosburg JE, Whitfield TW Jr, Park PE, Crawford EF, George O, Vendruscolo LF, Koob GF. Long-term antagonism of κ opioid receptors prevents escalation of and increased motivation for heroin intake. *J Neurosci* 2013; 33: 19384–19392
- Self DW, Nestler EJ. Molecular mechanisms of drug reinforcement and addiction. *Annu Rev Neurosci* 1995; 18: 463-495
- Self DW. Neural basis of substance abuse and dependence. *Comprehensive textbook of psychiatry* 2005, ed 8, vol, 1: 308-322
- Sesack SR, Grace AA. Cortico-basal ganglia reward network: microcircuitry. *Neuropsychopharmacology* 2010; 35: 27–47
- Shaham Y, Shalev U, Lu L, de Wit H, Stewart J. The reinstatement model of drug relapse: history, methodology and major findings. *Psychopharmacology* 2003; 168: 3–20
- Shu SY, Jiang G, Zeng QY, Wang B, Li H, Ma L, Steinbusch H, Song C, Chan WY, Chen XH, Wu YM, Bao R, Chen YC, Wu JY. The marginal division of the striatum and hippocampus has different role and mechanism in learning and memory. *Mol Neurobiol* 2015;51: 827-839
- Simonsen KW, Hansen AC, Rollmann D, Kringsholm B, Müller IB, Johansen SS, Linnet K. Drug-related death in Denmark in 2007. *Dan Med Bul* 2011; 58: A4307
- Skinner BF. *The behavior of organisms*. Appleton-Century-Crofts, New York 1938
- Sommer WH, Rimondini R, Hansson AC, Hipskind PA, Gehlert DR, Barr CS, Heilig MA. Upregulation of voluntary alcohol intake, behavioral sensitivity to stress, and amygdala *crhr1* expression following a history of dependence. *Biol Psychiatry* 2008; 63: 139–145
- Spiess J, Rivier J, Rivier C, Vale W. Primary structure of corticotropin-releasing factor from ovine hypothalamus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981; 78: 6517-6521
- Spiess J, Dautzenberg FM, Sydow S, Hauger RL, Rühmann A, Blank T, Radulovic J. Molecular Properties of the CRF Receptor. *Trends Endocrinol Metab* 1998; 9: 140-145
- Stinus L, Le Moal M, Koob GF. Nucleus accumbens and amygdala are possible substrates for the aversive stimulus effects of opiate withdrawal. *Neuroscience* 1990; 37: 767–773
- Stinus L, Cador M, Zorrilla EP, Koob GF. Buprenorphine and CRF1R antagonists block the acquisition of opiate withdrawal-induced conditioned place aversion in rats. *Neuropsychopharmacology* 2005; 30: 90–98
- Suda T, Kageyama K, Sakihara S, Nigawara T. Physiological roles of urocortins, human homologues of fish urotensin I, and their receptors. *Peptides* 2004; 25: 1689-1701

- Swanson LW. The projections of the ventral tegmental area and adjacent regions: a combined fluorescent retrograde tracer and immunofluorescence study in the rat. *Brain Res Bull* 1982; 9: 321–353
- Tasker JG, Di S, Malcher-Lopes R. Minireview: rapid glucocorticoid signaling via membrane-associated receptors. *Endocrinology* 2006; 147: 5549–5556
- UNODC. World drug report 2014. United Nations Office on Drugs and Crime. En www.unodc.org/unodc/en/data-and-analysis/WDR-2014.html
- Valdez GR, Roberts AJ, Chan K, Davis H, Brennan M, Zorrilla EP. Increased ethanol self-administration and anxiety-like behavior during acute withdrawal and protracted abstinence: regulation by corticotropin-releasing factor. *Alcohol Clin Exp Res* 2002; 26: 1494–1501
- Valdez GR, Koob GF. Allostasis and dysregulation of corticotropin-releasing factor and neuropeptide Y systems: implications for the development of alcoholism. *Pharmacol Biochem Behav* 2004; 79: 671–689
- Vale W, Spiess J, Rivier C, Rivier J. Characterization of a 41-residue ovine hypothalamic peptide that stimulates secretion of corticotropin and beta-endorphin. *Science* 1981; 213: 1394–1397
- Van Pett K, Viau V, Bittencourt JC, Chan RK, Li HY, Arias C, Prins GS, Perrin M, Vale W, Sawchenko PE. Distribution of mRNAs encoding CRF receptors in brain and pituitary of rat and mouse. *J Comp Neurol* 2000; 428: 191–212
- von Zastrow M. Regulation of opioid receptors by endocytic membrane traffic: mechanisms and translational implications. *Drug Alcohol Depend* 2010; 108: 166–171
- Waldhoer M, Bartlett SE, Whistler JL. Opioid receptors. *Annu Rev Biochem* 2004; 73: 953–990
- Weinshenker D, Schroeder JP. There and back again: a tale of norepinephrine and drug addiction. *Neuropsychopharmacology* 2007; 32: 1433–1451
- Weiss F, Parsons LH, Schulteis G, Hyytia P, Lorang MT, Bloom FE, Koob GF. Ethanol self-administration restores withdrawal-associated deficiencies in accumbal dopamine and 5-hydroxytryptamine release in dependent rats. *J Neurosci* 1996; 16: 3474–3485
- Weiss F, Ciccocioppo R, Parsons LH, Katner S, Liu X., Zorrilla EP, Valdez GR, Ben-Shahar O, Angeletti S, Richter RR. Compulsive drug-seeking behavior and relapse. Neuroadaptation, stress, and conditioning factors. *Ann NY Acad Sci* 2001; 937: 1–26
- Williams JT, Ingram SL, Henderson G, Chavkin C, Von Zastrow M, Schulz S, Koch T, Evans CJ, Christie MJ. Regulation of mu-opioid receptors: desensitization, phosphorylation, internalization and tolerance. *Pharmacol Rev* 2013; 65: 223–254
- Wise RA, Koob GF. The development and maintenance of drug addiction. *Neuropsychopharmacology* 2014; 39: 254–262

- Yang LZ, Tovote P, Rayner M, Kockskämper J, Pieske B, Spiess J. Corticotropin-releasing factor receptors and urocortins, links between the brain and the heart. *Eur J Pharmacol* 2010; 632: 1-6
- Yuferov V, Fussell D, LaForge KS, Nielsen DA, Gordon D, Ho A, Leal SM, Ott J, Kreek MJ. Redefinition of the human kappa opioid receptor gene (OPRK1) structure and association of haplotypes with opiate addiction. *Pharmacogenetics* 2004; 12: 793-804
- Zanos P, Georgiou P, Wright SR, Hourani SM, Kitchen I, Winsky-Sommerer R, Bailey A. The oxytocin analogue carbetocin prevents emotional impairment and stress-induced reinstatement of opioid-seeking in morphine-abstinent mice. *Neuropsychopharmacology* 2014; 39: 855-365
- Zhao Y, Valdez GR, Fekete EM, Rivier JE, Vale WW, Rice KC, Weiss F, Zorrilla EP. Subtype-selective corticotropin-releasing factor receptor agonists exert contrasting, but not opposite, effects on anxiety-related behavior in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 2007; 323: 846–854
- Zislis G, Desai TV, Prado M, Shah HP, Bruijnzeel AW. Effects of the CRF receptor antagonist D-Phe CRF (12-41) and the alpha2-adrenergic receptor agonist clonidine on stress-induced reinstatement of nicotine-seeking behavior in rats. *Neuropharmacology* 2007; 53: 958-966
- Zoli M, Cintra A, Zini I, Hersh LB, Gustafsson JA, Fuxe K, Agnati LF. Nerve cell clusters in dorsal striatum and nucleus accumbens of the male rat demonstrated by glucocorticoid receptor immunoreactivity. *J Chem Neuroanat* 1990; 3: 355-366
- Zorrilla EP, Valdez GR, Weiss F. Changes in levels of regional CRF-like immunoreactivity and plasma corticosterone during protracted drug withdrawal in dependent rats. *Psychopharmacology* 2001; 158: 374–381
- Zorrilla EP, Heilig M, de Wit H, Shaham Y. Behavioral, biological, and chemical perspectives on targeting CRF1 receptor antagonists to treat alcoholism. *Drug Alcohol Depend* 2013; 128: 175–186
- Zorrilla EP, Logrip ML, Koob GF. Corticotropin releasing factor: A key role in the neurobiology of addiction. *Frontiers in Neuroendocrinology* 2014; 35: 234–244