



**UNIVERSIDAD DE MURCIA**

**Facultad de Medicina  
Departamento de Farmacología**



**Implicación de diferentes cascadas  
de señalización intracelular en los  
cambios adaptativos observados  
durante la dependencia de morfina**

**PILAR ALMELA ROJO  
2008**

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

La Tesis Doctoral titulada "Implicación de diferentes cascadas de señalización intracelular en los cambios adaptativos observados durante la dependencia de morfina" es un compendio de trabajos previamente publicados.

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

- Almela P, Cerezo M, Milanés MV, Laorden ML (2006)

Role of PKC in regulation of Fos and TH expression after naloxone induced morphine withdrawal in the heart

*N-S Arch Pharmacol* **372**: 374-82

- Almela P, Cerezo M, González-Cuello A, Milanés MV, Laorden ML (2007)

Differential involvement of 3',5'-cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase in regulation of Fos and tyrosine hydroxylase expression in the heart alter naloxone induced morphine withdrawal

*N-S Arch Pharmacol* **374**: 293-303

- Almela P, Milanés MV, Laorden ML (2007)

Activation of the ERK signalling pathway contributes to the adaptive changes in rat hearts during naloxone-induced morphine withdrawal

*Br J Pharmacol* **151**: 787-97

- Almela P, Milanés MV, Laorden ML

Implication of PKA and ERK<sub>1/2</sub> in tyrosine hydroxylase phosphorylation at serine 40 and 31 during morphine withdrawal in the heart (enviado, en revisión)

Pilar Almela Rojo





## UNIVERSIDAD DE MURCIA

Departamento de Farmacología

M. Luisa Laorden Carrasco y M. Victoria Milanés Maquilón,  
Catedráticas de Farmacología de la Universidad de Murcia,

HACEN CONSTAR:

Que la Tesis Doctoral como compendio de publicaciones y con  
mención de doctorado europeo titulada: **“Implicación de diferentes  
cascadas de señalización intracelular en los cambios adaptativos  
observados durante la dependencia de morfina”** que presenta Doña  
Pilar Almela Rojo, ha sido realizada bajo nuestra dirección en el  
Departamento de Farmacología de la Facultad de Medicina de Murcia

En Murcia a 9 de Enero de 2008

M.L. Laorden



M.V. Milanés



**Universidad de Murcia**  
**Facultad de Medicina**  
**Departamento de Farmacología**

---

M. Luisa Laorden Carrasco Catedrática de Farmacología de la Universidad de Murcia y Directora del Departamento de Farmacología

HACE CONSTAR:

Que la Tesis Doctoral como compendio de publicaciones y con mención de doctorado europeo titulada: **“Implicación de diferentes cascadas de señalización intracelular en los cambios adaptativos observados durante la dependencia de morfina”** que presenta Doña Pilar Almela Rojo, ha sido realizada bajo la dirección de M. Luisa Laorden Carrasco y M. Victoria Milanés Maquilón y que el Departamento de Farmacología ha dado su conformidad para que sea presentada ante la Comisión de Doctorado

En Murcia a 9 de Enero de 2008



M.L. Laorden

María Luisa Laorden Carrasco  
Directora del Departamento



UNIVERSIDAD  
DE MURCIA

VICERRECTORADO DE ESTUDIOS

UNIVERSIDAD DE MURCIA  
ÁREA DE GESTIÓN ACADÉMICA  
SECCIÓN DE POSTGRADO

Fecha: 25-5-2007

SALIDA Nº 253

D<sup>a</sup>. PILAR ALMELA ROJO  
C/ Catedrático Eugenio Úbeda, 2 - 5º C  
30008 - MURCIA

Vista la solicitud presentada el día 18 de abril de 2007 por D<sup>a</sup>. Pilar Almela Rojo, con D.N.I. número 48484191, sobre autorización para presentación de tesis doctoral como compendio de publicaciones con carácter previo a la tramitación de la misma en la Universidad de Murcia, le comunico que la Comisión de General de Doctorado, vistos:

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

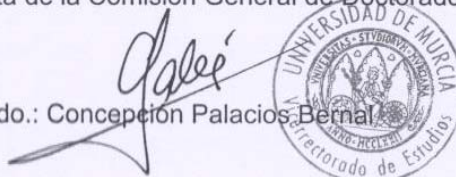
resolvió, en su sesión de 18 de mayo de 2007, **ACCEDER** a lo solicitado por el interesado pudiendo, por lo tanto, presentar su tesis doctoral en la modalidad de compendio de publicaciones.

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

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

Murcia, 22 de mayo de 2007  
Vicerrectora de Estudios y  
Presidenta de la Comisión General de Doctorado

Fdo.: Concepción Palacios Bernal



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

▪ **Sixth IBRO Congress of Neuroscience (Praga, 2003)**

Almela P, Milanés MV, Laorden ML

Effects of morphine dependence on G proteins-coupled receptor kinase2 (GRK2) in the brain and heart ventricles of rats.

▪ **European Opioid Conference (Visegrad, 2004)**

Almela P, Milanés MV, Laorden ML

Increase of tyrosine hydroxylase levels during morphine withdrawal in the heart.

▪ **Congress of the Federation of the European Pharmacological Societies (EPHAR) (Oporto, 2004)**

Almela P, Milanés MV, Laorden ML

Morphine withdrawal activates ERK pathway in the rat heart ventricles

Publicación: Fundamental and Clinical Pharmacology 18 Supl. 1 (2004) 23-126.

▪ **XI Congreso de la Sociedad Española de Neurociencia (Torremolinos, 2005)**

Almela P, Milanés MV, Laorden ML

Regulación de la tirosina hidroxilasa fosforilada en Ser31 y Ser40 en tejido cardiaco durante el síndrome de abstinencia a morfina.

Publicación: Revista de Neurología 41 Supl. 2 (2005) 55-95.

▪ **European Opioid Conference (Salamanca, 2006)**

Almela P, Milanés MV, Laorden ML

Implication of ERK1/2 in Fos expression after naloxone induced morphine-withdrawal in the heart.

▪ **5<sup>th</sup> Forum of European Neuroscience (Viena, 2006)**

Almela P, Milanés MV, Laorden ML

Role of protein kinase A in regulation of Fos expression and tyrosine hydroxylase levels during morphine withdrawal in the heart.

Publicación: FENS Forum Abstracts Vol 3. 2006.

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

- Ministerio de Ciencia y Tecnología SAF/FEDER2003-00756, 2006-00331 y 2007-62758.
- Instituto de Salud Carlos III PI041047
- Fundación Séneca 05679/PI/07



Pilar Almela Rojo ha sido becaria de investigación del Instituto de Salud Carlos III y del Ministerio de Educación y Ciencia.

## **Agradecimientos**

Mi más profundo agradecimiento a la Dra. Maria Luisa Laorden por haber hecho posible la realización de este trabajo, por todo lo que he aprendido de ella, por ser una gran trabajadora, por su confianza, por su amistad, por todos los buenos momentos pasados durante estos años tanto dentro como fuera del departamento, siempre le estaré agradecida.

A la Dra. Maria Victoria Milanés por la gran ayuda prestada en la realización de este trabajo, por estar ahí siempre que la he necesitado, por su apoyo científico, por su gran capacidad de trabajo, por la confianza que ha puesto en mí, por su amistad y por muchas más cosas, siempre se lo agradeceré.

A la Dra. Maria Teresa Castells por su colaboración en el análisis de imágenes, por sus consejos y por ser tan simpática.

A mis compañeras del Departamento Ana, Cristina y Fátima por ayudarme siempre en todo lo que he necesitado, por su compañerismo, por su amistad, y por los buenos ratos que hemos pasado en el trabajo y fuera de él.

A mi familia, por apoyar mi carrera científica desde el primer momento, animarme en los momentos difíciles y por su cariño.

A Juancho, por estar siempre ahí, por su apoyo en todo momento, y porque es una persona muy especial para mí.

A todos mis compañeros del Departamento de Farmacología, profesores, becarios, técnicos, administrativos, por brindarme su ayuda.

**A mis padres**



**UNIVERSIDAD DE MURCIA**

**Facultad de Medicina**

**Departamento de Farmacología**



**Implicación de diferentes cascadas  
de señalización intracelular en los  
cambios adaptativos observados  
durante la dependencia de morfina**

**PILAR ALMELA ROJO  
2008**

- AC:** Adenilato ciclasa.
- BH<sub>4</sub>:** Tetrahidrobiopterina.
- BSA:** Albúmina de suero bovino.
- CAMK:** Proteín kinasa activada por calcio y AMPc.
- CRE:** Elemento de respuesta al AMPc.
- CREB:** Proteína de unión a CRE.
- DA:** Dopamina.
- DAB:** Tetrahidrocloruro de 3,3'-diaminobencidina.
- DOPAC:** Ácido 3,4-dihidroxifenilacético.
- DMSO:** Dimetilsulfóxido.
- ERK:** Proteín kinasa regulada por señales extracelulares.
- GRK:** Proteín kinasas de receptores acoplados a proteínas G.
- HA-1004:** N-2' guanidinoetil-5-isoquinolinasulfonamida.
- HPLC:** Cromatografía líquida de alta resolución.
- HRP:** Peroxidasa de rábano.
- IEG:** Genes de expresión inmediata.
- MAPK:** Proteín kinasa activada por mitógenos.
- MEK:** MAP/ERK kinasa.
- NA:** Noradrenalina.
- NMN:** Normetanefrina.
- NSS:** Suero de cerdo.
- PAGE:** Electroforesis en geles de poliacrilamida.
- PBS:** Tampón fosfato salino.
- PDPK:** Proteín kinasa dirigida a prolina.
- PK:** Proteín kinasa.
- PKA:** Proteín kinasa A.
- PKC:** Proteín kinasa C.
- PKG:** Proteín kinasa G.
- PLC:** Fosfolipasa C.
- PVDF:** Fluoruro de polivinildieno.
- RO:** Receptor opioide.
- SDS:** Dodecil sulfato sódico.

**SNC:** Sistema nervioso central.

**SNP:** Sistema nervioso periférico.

**SRE:** Elemento de respuesta sérico.

**SRF:** Factor de respuesta sérico.

**TBS-T:** Tris buffer salino-tween 20.

**TH:** Tirosina hidroxilasa.

**VD:** Ventrículo derecho.

**VI:** Ventrículo izquierdo.

<b>I- INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>I.1- Neurobiología de la adicción.....</b>	<b>3</b>
<b>I.2- Mecanismos implicados en la tolerancia/dependencia a opioides.....</b>	<b>5</b>
I.2.1- Mecanismos neuroquímicos.....	6
I.2.2- Mecanismos receptoriales.....	10
I.2.3- Mecanismos post-receptoriales.....	11
<b>II- ARTÍCULOS.....</b>	<b>17</b>
<b>II.1-</b> Almela P, Cerezo M, Milanés MV, Laorden (2006) ML Role of PKC in regulation of Fos and TH expression after naloxone induced morphine withdrawal in the heart <i>N-S Arch Pharmacol</i> <b>372</b> : 374-82.....	<b>19</b>
<b>II.2-</b> Almela P, Cerezo M, González-Cuello A, Milanés MV, Laorden ML (2007) Differential involvement of 3',5'-cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase in regulation of Fos and tyrosine hydroxylase expression in the heart alter naloxone induced morphine withdrawal <i>N-S Arch Pharmacol</i> <b>374</b> : 293-303.....	<b>31</b>
<b>II.3-</b> Almela P, Milanés MV, Laorden ML (2007) Activation of the ERK signalling pathway contributes to the adaptive changes in rat hearts during naloxone-induced morphine withdrawal <i>Br J Pharmacol</i> <b>151</b> : 787-97.....	<b>45</b>
<b>II.4-</b> Almela P, Milanés MV, Laorden ML Implication of PKA and ERK <sub>1/2</sub> in tyrosine hydroxylase phosphorylation at serine 40 and 31 during morphine withdrawal in the heart (enviado, en	

revisión).....	59
<b>III- OBJETIVOS.....</b>	<b>101</b>
<b>IV- MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>107</b>
<b>IV.1- Animales.....</b>	<b>109</b>
<b>IV.2- Procedimiento experimental.....</b>	<b>109</b>
IV.2.1- Grupos experimentales.....	110
<b>IV.3- Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).....</b>	<b>111</b>
<b>IV.4- Inmunocitoquímica.....</b>	<b>112</b>
<b>IV.5- Western blot.....</b>	<b>114</b>
<b>IV.6- Medida de la actividad TH.....</b>	<b>118</b>
<b>IV.7- Análisis estadístico de los datos.....</b>	<b>119</b>
<b>V- RESULTADOS.....</b>	<b>121</b>
<b>V.1- Mecanismos celulares y moleculares que se ponen en marcha durante la dependencia de morfina.....</b>	<b>124</b>
a. Evaluación del turnover de NA y de la actividad TH durante el síndrome de abstinencia a morfina.....	124
b. Valoración de las modificaciones que se producen en los niveles de la proteína TH y de TH fosforilada en serina 40 y serina 31 durante el síndrome de abstinencia a	



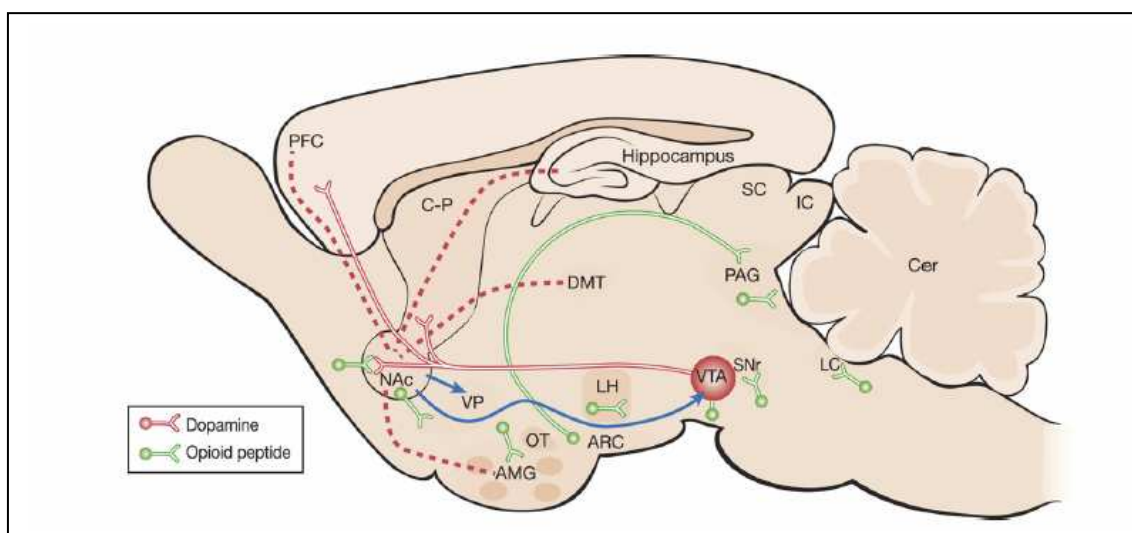
morfina.....	125
c. Evaluación de los cambios en la expresión de c-Fos, PKA, p-CREB, ERK total y p-ERK <sub>1/2</sub> durante el síndrome de abstinencia a morfina.....	126
<b>V.2- Implicación de las cascadas de transducción de señales PKA y PKC en la hiperactividad noradrenérgica observada durante el síndrome de abstinencia a morfina.....</b>	<b>129</b>
<b>V.3- Evaluación de la expresión de TH no fosforilada, TH total y TH fosforilada en serina 40 en presencia de inhibidores de PKA y PKC.....</b>	<b>129</b>
<b>V.4- Estudio de la implicación de PKA y PKC en el aumento de la expresión génica (c-fos) que se produce durante el síndrome de abstinencia a morfina.....</b>	<b>130</b>
<b>V.5- Implicación de la vía de las MAPK en la expresión de c-Fos y TH fosforilada en serina 31.....</b>	<b>131</b>
<b>VI- DISCUSIÓN.....</b>	<b>133</b>
<b>VII- CONCLUSIONES.....</b>	<b>143</b>
<b>VIII- BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>147</b>
<b>IX- RESUMEN EN INGLÉS.....</b>	<b>159</b>
<b>X- ANEXO.....</b>	<b>191</b>



# *I- INTRODUCCIÓN*

## I.1- NEUROBIOLOGÍA DE LA ADICCIÓN

La adicción o farmacodependencia es considerada actualmente como una enfermedad crónica producida por la exposición repetida a una droga adictiva y caracterizada por la pérdida de control sobre el uso de la misma (Koob y Le Moal, 2001; Nestler, 2004). Los circuitos neuronales que forman los llamados “sistemas de recompensa” juegan un papel central en el consumo compulsivo de drogas y en la adicción, y se encuentran situados en los sistemas mesocorticolímbicos dopaminérgicos que se originan en el área tegmental ventral y que proyectan al núcleo accumbens, amígdala y corteza prefrontal (figura 1).



**Figura 1.** Circuitos neuronales de la adicción. NAc: Núcleo accumbens. VTA: Área tegmental ventral. AMG: Amígdala. PFC: Corteza prefrontal. (Modificado de Nestler, 2001).

Los cambios adaptativos que aparecen en estas estructuras neuroanatómicas no son sólo debidos al uso continuado de una droga, sino el resultado de complejas interacciones entre la droga en sí misma y las circunstancias en que es consumida. Por ello, en individuos vulnerables, la interacción entre la droga y factores genéticos, psicosociales, medio ambiente, comportamentales, etc., produciría

adaptaciones a largo plazo en determinados grupos de neuronas que explicarían los efectos duraderos de la adicción.

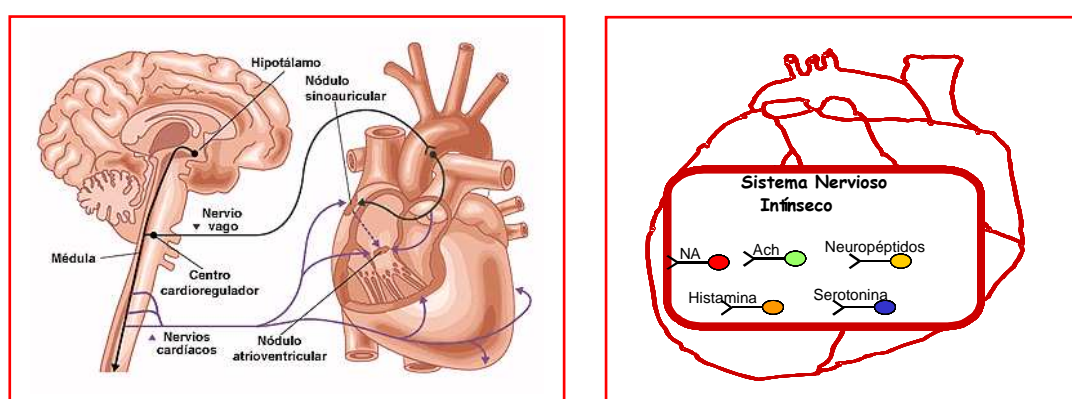
Entre las sustancias con mayor poder adictivo se encuentran los opioides, como morfina y derivados. En las neuronas, los receptores opioides (RO) se encuentran tanto en el soma como a lo largo de las dendritas y las terminaciones nerviosas. La respuesta inmediata de las neuronas a la acción de un opioide se caracteriza por una reducción de la excitabilidad neuronal, así como de la liberación del neurotransmisor en que se ha especializado la neurona. Buena parte de las acciones resultantes de la interacción de un opioide con su receptor van a consistir en modificaciones del estado de fosforilación de proteínas, cambios en la conductancia iónica y modificación en la expresión de proteínas nucleares que provocarán, a su vez, cambios en la expresión de genes (Goodman, 2008).

Tanto los opioides como las demás drogas adictivas actúan sobre los sistemas mesocorticolímbicos a través de distintos mecanismos. Concretamente, los opioides inducen la liberación de dopamina (DA) en el área tegmental ventral indirectamente, inhibiendo a las interneuronas gabaérgicas a través de la activación del RO  $\mu$  (Johnson y North, 1992; Bonci y Williams, 1997; Cami y Farre, 2003). A nivel del núcleo accumbens, los opioides activan directamente RO localizados en neuronas dopaminérgicas (Nestler, 1996; Hyman y Malenka 2001).

La activación de los sistemas de recompensa que producen las drogas de abuso induce una liberación masiva de DA que da lugar a euforia y búsqueda compulsiva de la droga.

Es importante destacar que los cambios adaptativos que producen las drogas de abuso no se limitan solo al sistema nervioso central (SNC) sino que también se producen a nivel periférico y concretamente en tejido

cardiaco. Si tenemos en cuenta que la regulación de la función cardiaca depende de la coordinación entre la actividad generada por las neuronas localizadas en SNC (inervación cardiaca extrínseca) y las neuronas localizadas en el ganglio cardiaco (inervación cardiaca intrínseca) (Ardell, 2001), los cambios adaptativos cardiacos que se producen tras la administración crónica de morfina podrían ser debidos por una parte a la activación de circuitos neuronales cerebrales y por otra a cambios adaptativos en las neuronas cardiacas intrínsecas, independientes del SNC (figura 2).



**Figura 2.** Esquema de la inervación cardiaca extrínseca e intrínseca.

## I.2- MECANISMOS IMPLICADOS EN LA TOLERANCIA/DEPENDENCIA A OPIOIDES

Los opioides son los fármacos analgésicos más potentes de los utilizados en clínica, no sólo para el alivio del dolor, sino también para el tratamiento de la diarrea o la tos. Sin embargo, su administración prolongada para el tratamiento del dolor crónico produce tolerancia a sus efectos analgésicos y dependencia, lo que limita en ocasiones su utilización terapéutica.

La tolerancia se manifiesta como una serie de cambios neuroadaptativos que conducen a una disminución progresiva de los efectos de estas sustancias a medida que se consumen de forma reiterada. La tolerancia también implica la necesidad de ir aumentando progresivamente la dosis con el fin de alcanzar los efectos iniciales. La dependencia psíquica es un trastorno conductual en el que el individuo tiene disminuido el control sobre el consumo de una determinada sustancia (Koob, 1992). La aparición de un síndrome de abstinencia cuando se deja de consumir la sustancia o tras la administración de un antagonista opioide desenmascara y refleja la existencia de dependencia física (la sustancia es requerida para el normal funcionamiento de las funciones biológicas).

Aunque los mecanismos celulares y moleculares implicados en la tolerancia/dependencia a opioides no están bien establecidos, dichos procesos representan fenómenos adaptativos celulares que tratan de compensar la activación crónica del RO (Koob y Bloom, 1988; Johnson y Fleming, 1989; Self y Nestler, 1995).

Se han propuesto diferentes mecanismos:

### **I.2.1- Mecanismos neuroquímicos**

El tratamiento crónico con opioides produce una serie de cambios adaptativos en las diferentes señales de transducción que resultan en modificaciones en la sensibilidad de las neuronas del SNC a diferentes neurotransmisores; estos cambios parecen ser de especial relevancia en la adquisición y mantenimiento de dependencia (Nestler, 1992; Nestler y cols, 1993; Nestler, 2000). Se ha constatado que diferentes áreas y circuitos neuronales podrían estar implicados en la génesis y mantenimiento de la tolerancia/dependencia a opioides, destacando el

locus ceruleus, núcleo accumbens, amígdala, hipocampo e hipotálamo, concretamente el núcleo paraventricular, que se comporta como un centro integrador de funciones tan importantes como las endocrinas, vegetativas y de comportamiento (Koob, 1992; Self y Nestler, 1995; Vargas y cols., 1997; Fuertes y cols., 2000a,b). Diferentes estudios realizados en nuestro laboratorio han demostrado que durante el síndrome de abstinencia a morfina se produce un aumento del turnover de noradrenalina (NA), puesto de manifiesto por un aumento de la ratio MHPG (3-metoxi-4-hidroxifenilglicol)/NA (Fuertes y cols., 2000a; Laorden y cols., 2000b).

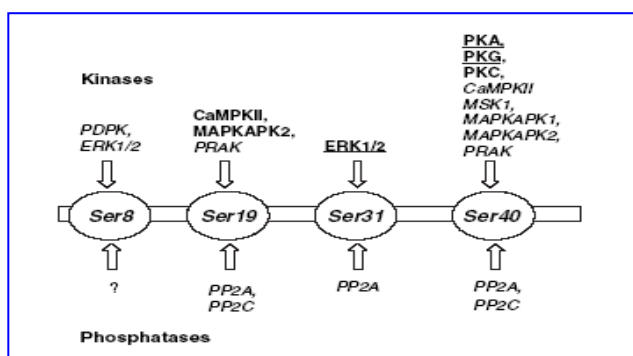
En contraposición con los numerosos estudios realizados con el fin de demostrar las implicaciones de las vías catecolaminérgicas en los procesos de tolerancia/dependencia de opioides a nivel del SNC, los cambios adaptativos que ocurren a nivel cardiaco han sido menos estudiados. En este sentido, trabajos realizados en nuestro laboratorio han demostrado que la administración de morfina a ratas placebo produce una disminución de la ratio DOPAC (ácido 3,4-dihidroxifenilacético)/DA, mientras que la administración crónica de morfina produce un aumento de esta ratio en diferentes tejidos cardiacos, concretamente en aurícula derecha e izquierda (Rabadán y cols., 1997). Estos resultados indican el desarrollo de tolerancia a los efectos cardiacos inhibitorios inducidos por morfina y están en consonancia con los estudios realizados por nuestro grupo de investigación en plexo mientérico de ñeón de cobaya (Garaulet y cols., 1994).

Estudios previos (Dixon y Chandra, 1987; Chang y Dixon, 1990; Cruz y Villarreal, 1993) han demostrado que durante el síndrome de abstinencia se produce un aumento de los niveles plasmáticos de NA y adrenalina, acompañados por una elevación de la presión arterial y de la frecuencia cardiaca, lo que puede ser indicativo de una posible hiperactividad simpática. Apoyando esta hipótesis, estudios realizados en nuestro laboratorio han demostrado que durante el síndrome de

abstinencia provocado por la administración de naloxona a ratas dependientes de morfina, se produce un aumento de la ratio NMN (normetanefrina)/NA y DOPAC/DA en diferentes tejidos cardiacos, lo que es indicativo de un incremento de la liberación de NA y DA (Rabadán y cols., 1998; Milanés y Laorden, 2000). Estos resultados sugieren que durante el síndrome de abstinencia a morfina se produciría una hiperactividad de los sistemas catecolaminérgicos, que podría ser la responsable de los efectos excitatorios observados en aurículas aisladas.

Por otra parte, uno de los cambios bioquímicos más consistentes observados en respuesta a la administración crónica de opioides es una regulación al alza de la tirosina hidroxilasa (TH; enzima limitante de la síntesis de catecolaminas, localizada exclusivamente en neuronas catecolaminérgicas) en varias regiones cerebrales (Benavides y cols., 2003; Boundy y cols., 1998; Nestler y Aghajanian, 1997). La actividad de TH puede ser modulada por dos mecanismos: regulación de la expresión génica a medio y largo plazo (regulación transcripcional) y regulación de la enzima a corto plazo (fosforilación)(Kumer y Vrana, 1996). Se han descrito múltiples sitios donde las diferentes proteínas kinasas (PK) pueden fosforilar al enzima TH. Todas ellas fosforilan residuos de serina localizados próximos al extremo amino-terminal del enzima (serina 8, serina 19, serina 31 y serina 40). TH es fosforilada en serina 19 por la PK activada por calcio (CaMK), en serina 40 por la PK dependiente de AMPc (PKA), PKG y PKC y en menor medida por la CaMK, y en serina 31 es fosforilada directamente por la PK regulada por señales extracelulares (ERK<sub>1/2</sub>) e indirectamente por la PKC. El residuo de serina 8 es fosforilado por la PK dirigida a prolina (PDPK) (figura 3).





**Figura 3.** PK y protein fosfatasas que modulan la fosforilación de TH in vitro e in situ (tomado de Dunkley y cols., 2004).

Diferentes estudios han demostrado que la exposición crónica a morfina produce un incremento de TH en el locus ceruleus y en el área ventral del tegmento (Nestler y Aghajanian, 1997). Este aumento en los niveles o en la actividad TH podría implicar un aumento en la capacidad de esas neuronas para sintetizar NA o DA, lo que podría explicar a su vez el incremento en la liberación de dichos neurotransmisores observado en la regiones diana de dichos núcleos durante el síndrome de abstinencia a morfina (Nestler y cols., 1993; Koob y cols., 1992).

Estudios previos realizados en este laboratorio han demostrado un incremento en los niveles y en la actividad TH durante el síndrome de abstinencia a morfina a nivel cardiaco (González-Cuello y cols., 2004c), cambios que podrían contribuir al incremento en la actividad noradrenérgica observada en corazón en respuesta a dicho síndrome.

En base a todos estos resultados, parece posible que la activación crónica del RO  $\mu$  produzca una serie de fenómenos adaptativos compensatorios en las neuronas que darían lugar a cambios en la síntesis y/o liberación de catecolaminas, procesos que quedarían desmascarados durante el síndrome de abstinencia.

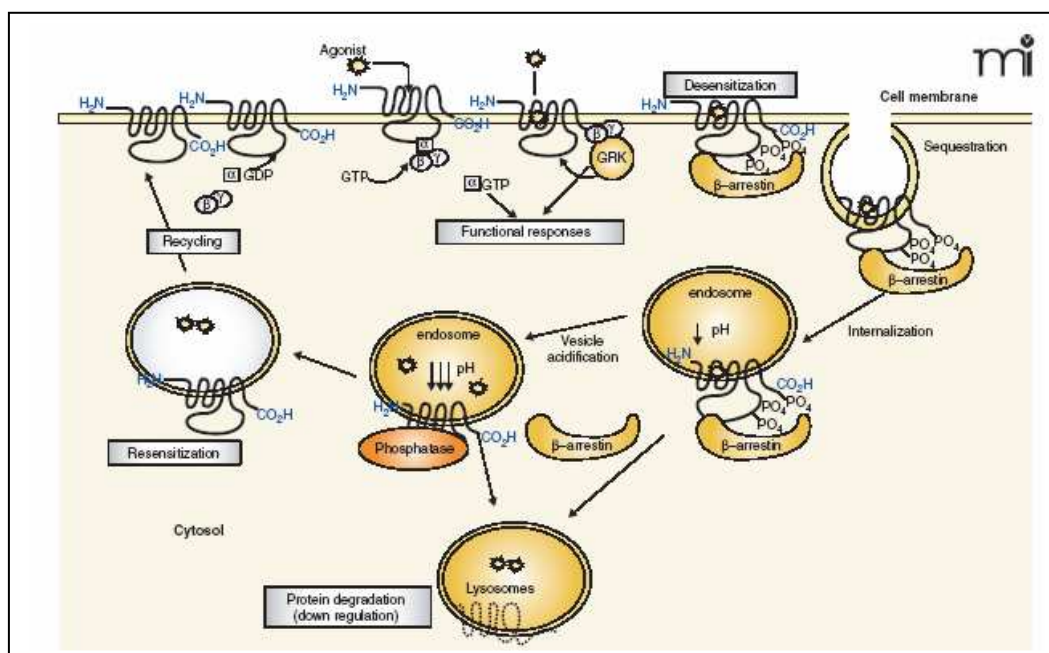
### **I.2.2- Mecanismos receptoriales**

Muchos investigadores han tratado de identificar los mecanismos moleculares de la tolerancia a opioides y hoy en día se admite la teoría de la desensibilización del RO, que es definida como una disminución de la señal del receptor tras una activación constante por parte de un agonista. Existen dos tipos de desensibilización, homóloga (Prather y cols., 1994) y heteróloga (Noble y Cox, 1996).

La desensibilización homóloga implica la fosforilación del receptor activado por el agonista por la familia de las GRKs (quinasas de receptores acoplados a proteínas G). Una vez fosforilado, el receptor se desacopla de su proteína G y es internalizado por medio de las  $\beta$ -arrestinas. Con respecto a la desensibilización heteróloga, los receptores activados y no activados por el agonista son fosforilados por kinasas dependientes de segundos mensajeros.

Es conocido que no sólo la fosforilación de los receptores acoplados a proteínas G conduce a su total inactivación sino que es necesaria la participación de unas proteínas denominadas  $\beta$ -arrestinas las cuales se unen al receptor fosforilado por la GRK y lo introducen en vesículas de clatrina, lo que conlleva a la internalización del receptor en el interior de estas vesículas y por tanto a una disminución en la respuesta del agonista (figura 4).

Una vez que el receptor ha sido internalizado se puede producir un reciclado del mismo a la membrana plasmática en el interior de endosomas, o puede ser degradado por lisosomas.



**Figura 4.** Mecanismos moleculares implicados en la desensibilización mediada por GRKs y  $\beta$ -arrestinas (tomado de Limbird, 2004).

A pesar de la importancia de las GRKs en los fenómenos de desensibilización, se sabe que no son las únicas quinasas capaces de mediar la fosforilación del receptor opioide y su desensibilización, sino que estos procesos pueden estar mediados también por otras quinasas tales como PKA, PKC, CAMPK II y PK activada por mitógenos (MAPK).

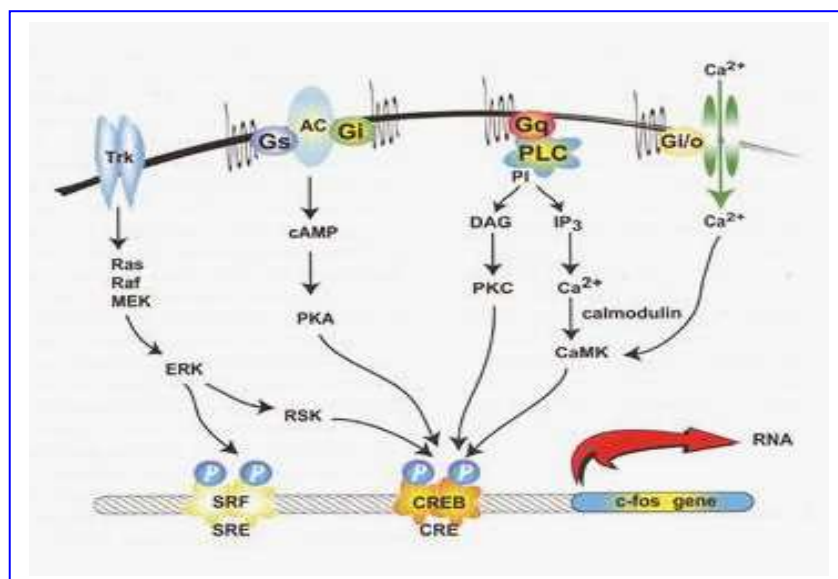
### **I.2.3- Mecanismos post-receptoriales**

Dentro de los cambios adaptativos que tienen lugar a nivel post-receptorial podemos incluir diferentes mecanismos: cambios en la actividad de la adenilato ciclasa (AC) o fosfolipasa C (PLC); modificaciones en el contenido y flujo neuronal de calcio y modificaciones en la regulación de la expresión génica vía segundos mensajeros, mediante cambios de los factores de transcripción.

La PKA consta de subunidades reguladoras y catalíticas. En ausencia de AMPc, la enzima se encuentra en estado de holoenzima inactivo, compuesto por un dímero de subunidades catalíticas idénticas,

cada una de unos 40 kDa aproximadamente, y unida a una subunidad reguladora de aproximadamente 50 kDa. El AMPc activa este enzima mediante su unión a las subunidades reguladoras, provocando así su separación de las unidades catalíticas (Nestler y Greengard, 1994).

En diversos estudios realizados tanto en SNC (locus ceruleus y núcleo accumbens) como en sistema nervioso periférico (SNP), concretamente en tejido cardiaco, se ha comprobado que mientras que la activación aguda del RO produce una inhibición de la AC y guanilato ciclasa y, por tanto, una disminución del AMPc y GMPc (Mackenzie y Milligan, 1990; Pepe y cols., 1997), el tratamiento crónico con opioides produce el efecto contrario, es decir, un aumento compensatorio del contenido de AMPc y GMPc (Nestler, 1992; Nestler y cols., 1993; Selley y cols., 1997; Milanés y cols., 1999; Guitart y cols., 1992; Maldonado y cols., 1996). Dicho incremento implica un aumento de las concentraciones de AC, PKA y, quizás, otros componentes de la cascada. Este efecto se pone de manifiesto cuando se deja de administrar el opioide (deprivación) o tras la administración de un antagonista opioide (síndrome de abstinencia provocado). En relación con el síndrome de abstinencia, estudios de este laboratorio demostraron un aumento de las concentraciones de AMPc en ventrículo derecho (VD) tras la administración de naloxona a animales dependientes de morfina (Milanés y cols., 2000). Todos estos resultados sugieren que los cambios en el contenido de AMPc y GMPc podrían ser parte de los mecanismos implicados en la instauración de tolerancia/dependencia a opioides. Recientemente se ha propuesto que no sólo la PKA sino también otras rutas intracelulares (PKC, MAPK, calcio intracelular) podrían jugar un papel importante en los procesos adaptativos asociados con la tolerancia/dependencia a opioides (Tokuyama y cols., 1995; Nestler y Aghajanian, 1997; Liu y Anand, 2001) (figura 5).



**Figura 5.** Esquema representativo de las diferentes vías de transducción de señales implicadas en los procesos adaptativos asociados a la tolerancia/dependencia a opioides (tomado de Duman y cols., 2005).

Recientemente, varios estudios han demostrado que la PKC es un importante modulador de la señal de los opioides y que tiene una especial importancia en los fenómenos de tolerancia/dependencia (Liu y Anand, 2001; Fundytus y Coderre, 1996). Esta kinasa juega un papel crucial en la transducción de señales mediante la fosforilación de diversos sustratos, incluyendo receptores de membrana, enzimas y factores de transcripción (Nishizuka, 1995). La familia de la PKC está compuesta de al menos 12 isoformas diferentes (Hool, 2005) que se agrupan en función de su estructura y de su capacidad de unión a diferentes cofactores. Estudios recientes realizados en este laboratorio han demostrado la implicación de esta PK en la activación del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal durante el síndrome de abstinencia a morfina (Benavides y cols., 2005). En este trabajo se observó que la administración del antagonista de la PKC, calfofostín C, antagonizaba el aumento de la expresión de c-Fos observado en el núcleo paraventricular y núcleo del tracto solitario/área ventrolateral durante el síndrome de abstinencia a morfina y que también modificaba los niveles de TH durante dicho síndrome en estas dos zonas. La PKC no sólo se expresa en SNC sino que ha sido demostrada su expresión en el

músculo cardíaco (Keef y cols., 2001). Además, estudios previos de nuestro laboratorio (Cerezo y cols., 2005) han demostrado la implicación de tres de sus isoformas (PKC $\alpha$ , PKC $\gamma$  y PKC $\xi$ ) en el síndrome de abstinencia a morfina. Los resultados indicaron que la administración de naloxona a ratas dependientes de morfina produjo una disminución de la expresión de la isoforma  $\alpha$  mientras que se produjo un aumento de la expresión de las isoformas  $\gamma$  y  $\xi$ , tanto en VD como en ventrículo izquierdo (VI). Estos resultados indican que la activación de la PKC podría formar parte de los mecanismos intracelulares a largo plazo que ocurren durante la dependencia de opioides a nivel cardíaco.

Las ERK, miembros de las MAPK, traducen una amplia gama de estímulos extracelulares en diversas respuestas intracelulares y están implicadas en varios procesos en el SNC, incluyendo la adicción a drogas (Berhow y cols., 1996; Eitan y cols., 2003; Mazzucchelli y cols., 2002). La vía de las ERK es una de las muchas rutas de señalización que podría alterar la expresión génica en distintas áreas cerebrales en respuesta a la exposición repetida a opioides. Aunque recientemente varios estudios han mostrado la implicación de esta ruta en el síndrome de abstinencia a morfina a nivel del SNC (Ren y cols., 2004; Cao y cols., 2005), no existen datos sobre su posible papel en las modificaciones cardíacas que se producen durante el tratamiento crónico con opioides.

Actualmente, está bien establecido que las PK regulan gran variedad de procesos celulares mediante la fosforilación de proteínas, incluyendo los factores de transcripción génica (Sand y Palmer, 2007). Los factores de transcripción son proteínas nucleares que se unen a secuencias cortas de DNA localizadas en las regiones promotoras de los genes, para regular su transcripción. Entre los factores de transcripción mejor conocidos se encuentran CREB (proteína de unión a CRE, elemento de respuesta al AMPc) y la familia Fos. La administración crónica de opioides produce

alteraciones del factor de transcripción CREB a través de la ruta dependiente de AMPc/PKA, y se ha demostrado la gran importancia de éste en la instauración de dependencia de morfina (Nestler y Aghajanian, 1997; Blendy y Maldonado, 1998). CREB podría mediar a su vez la regulación de otros genes de expresión inmediata (IEG), como c-Fos, ya que en las zonas promotoras de dicho gen se encuentra la secuencia CRE (Sheng y Greenberg, 1990). Diversos estudios realizados en SNC demuestran que la administración aguda de morfina produce un aumento de la proteína c-Fos en diferentes núcleos y áreas cerebrales (Laorden y cols., 2000; Chang y cols., 1996; García y cols., 1995) mientras que su administración crónica lleva a una disminución de la respuesta celular a morfina, traducida en un descenso en los niveles de c-Fos (Hemby, 2004; Laorden y cols., 2002b).

CREB y los miembros de las familias Fos y Jun representan sólo una pequeña parte de los factores de transcripción que son expresados en neuronas. Existen otros factores de transcripción tales como el factor de respuesta sérico (SRF), y el factor p62, que se unen a la secuencia SRE (elemento de respuesta sérico). SRF es susceptible de ser fosforilado por kinasas pertenecientes a distintas cascadas (CaMK, MAPK, PKA, PKC), induciendo así la expresión de c-Fos, lo que activaría la expresión de genes de expresión más lenta (Bian y cols., 1998; Haasteren y cols., 1999; Kovacs, 1998) . Al igual que ocurre en SNC, estudios previos de este laboratorio han mostrado un aumento en la expresión de c-Fos en tejido cardíaco durante el síndrome de abstinencia a morfina (González-Cuello y cols., 2003, 2007). Así pues, en la actualidad se ha propuesto que la administración crónica de opioides puede llevar a fenómenos adaptativos a largo plazo, que incluirían cambios en la expresión de determinados genes en SNC y SNP.



## *II - ARTÍCULOS*



**II.1 - ROLE OF PKC IN REGULATION OF FOS AND  
TH EXPRESSION AFTER NALOXONE INDUCED  
MORPHINE WITHDRAWAL IN THE HEART**

[Role of PKC in regulation of Fos and TH expression after naloxone induced morphine withdrawal in the heart.](#)

Almela P, Cerezo M, Milanés MV, Laorden ML.

Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. 2006 Feb;372(5):374-82

<http://www.springerlink.com/content/1744r63118717w62/>

**II.2- DIFFERENTIAL INVOLVEMENT OF 3',5'-  
CYCLIC ADENOSINE MONOPHOSPHATE-  
DEPENDENT PROTEIN KINASE IN REGULATION OF  
FOS AND TYROSINE HYDROXYLASE EXPRESSION  
IN THE HEART ALTER NALOXONE INDUCED  
MORPHINE WITHDRAWAL**

Differential involvement of 3', 5'-cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase in regulation of Fos and tyrosine hydroxylase expression in the heart after naloxone induced morphine withdrawal.

Almela P, Cerezo M, González-Cuello A, Milanés MV, Laorden ML.

Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. 2007 Jan;374(4):293-303.  
Epub 2006 Nov 25

<http://www.springerlink.com/content/512566877v627745/>

**II.3- ACTIVATION OF THE ERK SIGNALLING  
PATHWAY CONTRIBUTES TO THE ADAPTIVE  
CHANGES IN RAT HEARTS DURING NALOXONE-  
INDUCED MORPHINE WITHDRAWAL**

[Activation of the ERK signalling pathway contributes to the adaptive changes in rat hearts during naloxone-induced morphine withdrawal.](#)

Almela P, Milanés MV, Laorden ML.

Br J Pharmacol. 2007 Jul;151(6):787-97. Epub 2007 Jun 4.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2014132/?tool=pubmed>

II.4- IMPLICATION OF PKA AND ERK<sub>1/2</sub> IN  
TYROSINE HYDROXYLASE PHOSPHORYLATION AT  
SERINE 40 AND 31 DURING MORPHINE  
WITHDRAWAL IN THE HEART

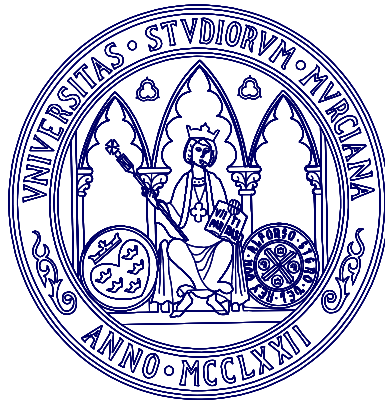
[The PKs PKA and ERK 1/2 are involved in phosphorylation of TH at Serine 40 and 31 during morphine withdrawal in rat hearts.](#)

Almela P, Milanés M, Laorden M.

Br J Pharmacol. 2008 Sep;155(1):73-83. Epub 2008 Jun 9.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2527841/?tool=pubmed>





## *III - OBJETIVOS*

La dependencia a drogas de abuso sigue siendo uno de los problemas sanitarios más importantes con los que se enfrenta la sociedad actual. Sin embargo, y a pesar de las numerosas investigaciones realizadas en este campo, el mecanismo exacto implicado en la tolerancia/dependencia de morfina continúa sin establecerse. Actualmente es conocido que durante estos procesos se producen una serie de cambios adaptativos en SNC y SNP que se traducen en un gran número de modificaciones en los sistemas de neurotransmisión y cambios en numerosas vías de señalización intracelular cuyas dianas nucleares son los factores de transcripción, responsables a su vez de la transcripción de muchos genes.

Estudios recientes realizados en nuestro laboratorio han demostrado que durante el síndrome de abstinencia a morfina se producen una serie de cambios adaptativos en neuronas cardiacas caracterizados por un aumento de la actividad noradrenérgica (Milanés y Laorden, 2000). En paralelo al aumento del turnover de NA, se ha observado expresión de c-Fos en diferentes tejidos cardiacos (González-Cuello y cols., 2003, 2007). La expresión de esta proteína refleja la activación de diferentes cascadas de segundos mensajeros y es un indicador de la actividad celular a diferentes estímulos.

En base a los antecedentes expuestos, y teniendo en cuenta que la mayoría de estudios de tolerancia/dependencia a morfina se han realizado en SNC, el objetivo general de este trabajo ha sido estudiar la posible implicación de diferentes cascadas de PK en las modificaciones cardiacas (hiperactividad noradrenérgica, expresión de c-Fos, etc.) que se producen tras la administración de naloxona a ratas dependientes de morfina.

Los objetivos concretos han sido:

**1-** En primer lugar hemos tratado de comprobar y establecer algunos de los mecanismos neuroquímicos, celulares y moleculares que se ponen en marcha durante la dependencia de morfina. Para ello:

a) Valoramos si, paralelamente al aumento del turnover de NA, se observan cambios en la actividad TH.

b) Una vez comprobado que el síndrome de abstinencia a morfina cursa con una hiperactividad noradrenérgica cardíaca, estudiamos las posibles modificaciones en la expresión de la proteína TH, enzima limitante de la síntesis de NA, y en la fosforilación, y por tanto activación, de TH en serina 40 y serina 31.

c) Para finalizar este primer objetivo, evaluamos los cambios en la expresión de PKA, c-Fos, p-CREB, ERK total y ERK fosforilada.

Una vez comprobadas y establecidas las modificaciones cardíacas que se producen durante el síndrome de abstinencia a morfina, nuestros siguientes objetivos tienen como finalidad el estudio de los diferentes mecanismos implicados en las mismas.

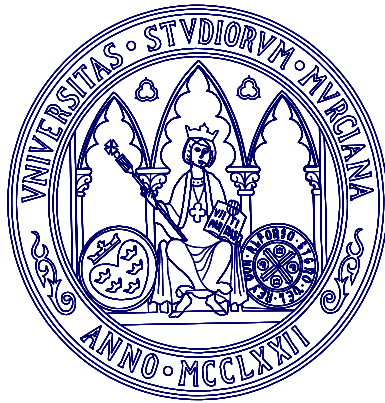
**2-** Estudiar la implicación de diferentes cascadas de transducción de señales (PKA, PKC) en la hiperactividad noradrenérgica observada durante el síndrome de abstinencia a morfina. Para ello, se administraron inhibidores de PKA (N-2' guanidinoetil-5-isoquinolinasulfonamida, HA-1004) y PKC (calfostín C).

**3-** Como continuación del objetivo anterior y con el fin de establecer qué cascada de señalización estaría implicada en la expresión y fosforilación de TH, administramos HA-1004 y calfofostín C concomitantemente con morfina y evaluamos la expresión de TH no fosforilada y TH total. Asimismo estudiamos la expresión de TH fosforilada

en serina 40 tras la administración de naloxona a ratas tratadas con HA-1004 concomitantemente con morfina.

**4-** Con el fin de profundizar en los mecanismos implicados en las modificaciones de la expresión génica, concretamente en la expresión de c-Fos observada en corazón tras la administración de naloxona a ratas dependientes de morfina, estudiamos la participación de PKA y PKC en estos cambios mediante la administración de HA1004 o calfofostín C.

**5-** En relación con los objetivos anteriores y para tratar de valorar otras cascadas de transducción de señales que podrían estar implicadas en los cambios adaptativos que se producen durante el síndrome de abstinencia a morfina, estudiamos la vía de las MAPK, ya que estas proteínas se comportan como puente de unión de las señales extracelulares y los factores de transcripción nuclear. Para ello se administró SL-327, inhibidor selectivo de MAP/ERK (MEK), y se valoró la expresión de c-Fos y la fosforilación de TH en serina 31.



# *IV- MATERIAL Y MÉTODOS*

## **IV.1- ANIMALES**

Se han utilizado ratas macho de 220-240 g al inicio del tratamiento de la cepa Sprague-Dawley. Los animales fueron mantenidos en cajas transparentes en una habitación a  $22\pm 2^\circ$  C, humedad del  $50 \pm 10\%$  y con un ciclo de luz/oscuridad de 12 h (8:00-20 h). Las ratas fueron manipuladas de acuerdo con las normas éticas vigentes (Directiva de la Comunidad Europea de 24 de noviembre de 1986, 86/609/EEC), teniendo libre acceso a la comida y al agua hasta el momento de comenzar el experimento.

## **IV.2- PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL**

La inducción de tolerancia/dependencia de morfina se realizó mediante la implantación s.c. de pellets de morfina base (75 mg), uno el día 1, dos el día 3 y tres el día 5, bajo ligera anestesia con éter. Los animales control fueron implantados con pellets de placebo (lactosa) en lugar de morfina, con la misma secuencia de implantación. El octavo día, las ratas tratadas con placebo y con morfina recibieron una inyección de salino s.c. (controles) o de naloxona (2 mg/kg, s.c.). El peso de las ratas fue controlado durante todo el tratamiento para comprobar que la morfina era liberada correctamente, ya que es conocido que el tratamiento crónico con morfina produce una disminución en la ganancia de peso debido a una menor ingesta calórica (Berhow y cols., 1995). También se determinó la pérdida de peso de los animales durante el síndrome de abstinencia. Se valoró como la diferencia entre el peso inmediatamente antes de la inyección de salino o naloxona y el peso 60 o 90 min después. Asimismo se observó si aparecían los siguientes signos de comportamiento típicos de la abstinencia de morfina: escape, castaño de dientes, ptosis, lagrimeo, cromodacriorrea, salivación, secreción nasal, sacudidas, etc.

Para determinar la posible implicación de PKA y PKC en los cambios adaptativos cardiacos que se producen durante el síndrome de abstinencia a morfina, las ratas recibieron una infusión continua de HA-1004 (40 nmol/día), inhibidor selectivo de la PKA (Hidaka y cols, 1984); de calfofistilina C (40 pmol/día), inhibidor selectivo de PKC (Kobayashi y cols, 1989); o de agua procedente del Milli-Q (vehículo) durante siete días, vía minibombas osmóticas que liberan fármaco a una velocidad de 1 µl/h (Alzet mod. 2001, USA). Las minibombas se implantaron al mismo tiempo que los pellets y previamente se atemperaron a 37°C durante 5 horas para obtener el flujo óptimo de 1 µl/h.

El antagonista selectivo de MEK, SL-327 (Atkins y cols., 1998) se administró el día 8 del experimento, 1 hora antes de la administración de salino o naloxona. Se disolvió en dimetilsulfóxido (DMSO) 100% y se inyectó i.p. a las dosis de 50 y 100 mg/kg. En base a los resultados de experimentos preliminares, se eligió la dosis de 100 mg/kg.

#### **IV.2.1.- Grupos experimentales**

Se realizaron los siguientes grupos experimentales:

- ◆ placebo s.c./7 días + salino s.c.
- ◆ placebo/7 días + naloxona s.c.
- ◆ morfina s.c./7 días + salino s.c.
- ◆ morfina s.c./7 días + naloxona s.c.
- ◆ placebo s.c./7 días + agua del Milli-Q (vehículo) s.c. + salino s.c.
- ◆ placebo s.c./7 días + agua del Milli-Q (vehículo) s.c. + naloxona s.c.
- ◆ morfina s.c./7 días + agua del Milli-Q (vehículo) s.c. + salino s.c.
- ◆ morfina s.c./7 días + agua del Milli-Q (vehículo) s.c. + naloxona s.c.
- ◆ placebo s.c./7 días + HA-1004 s.c. + salino s.c.

- ◆ placebo/7 días + HA-1004 s.c. + naloxona s.c.
- ◆ morfina/7 días + HA-1004 s.c. + salino s.c.
- ◆ morfina/7 días + HA-1004 s.c. + naloxona s.c.
- ◆ placebo/7 días + calfofostín C s.c. + salino s.c.
- ◆ placebo/7 días + calfofostín C s.c. + naloxona s.c.
- ◆ morfina/7 días + calfofostín C s.c. + salino s.c.
- ◆ morfina/7 días + calfofostín C s.c. + naloxona s.c.
- ◆ placebo/7 días + DMSO i.p. + salino s.c.
- ◆ placebo/7 días + DMSO i.p. + naloxona s.c.
- ◆ morfina/7 días + DMSO i.p. + naloxona s.c.
- ◆ placebo/7 días + SL-327 i.p. + salino s.c.
- ◆ placebo/7 días + SL-327 i.p. + naloxona s.c.
- ◆ morfina/7 días + SL-327 i.p. + naloxona s.c.

### **IV.3- CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)**

Los animales fueron decapitados 60 o 90 min después de la administración de salino o naloxona, se procedió a la apertura del tórax, se separaron el VD y VI, y se almacenaron inmediatamente a -80°C. La NA y su metabolito NMN se determinaron por HPLC con detector electroquímico. Cada tejido fue pesado, depositado en un vial de polipropileno mantenido en frío que contenía 1.5 ml de una solución de ácido perclórico (0.1 M)-EDTA (2.7 mM), y homogeneizado en un homogeneizador Polytron (Kinematica, Suiza; velocidad 3-4). A continuación los tejidos se centrifugaron a 20000 r.p.m. durante 15 min a 4°C, se aspiró el sobrenadante mediante una jeringa y se filtró a través de un filtro de 0.45 µm (Millipore, USA), filtrándose de nuevo a través de un filtro Ultrafree MC 0.2 (Millipore) mediante centrifuga refrigerada (15000



r.p.m., 20 min, 4°C). Por último, se recogió el sobrenadante y se almacenó a -30°C hasta el momento del análisis cromatográfico. Se inyectaron 10 µl de cada muestra en una columna de fase reversa C<sub>18</sub> (Waters, USA). Para la determinación de NA y NMN se empleó un detector electroquímico, fijando una diferencia de potencial entre el electrodo de trabajo (carbón vitrificado) y un electrodo de referencia de Ag/AgCl (Waters) de +0.65 V. La fase móvil consistió en una mezcla al 95% (v/v) de agua y metanol con acetato de sodio (50 mM), ácido cítrico (20 mM), L-octil-sodio sulfonato (3.75 mM), di-*n*-butilamina (1 mM) y ácido etilendiamnotetraacético (0.135 mM), y se ajustó el pH a 4.3. La velocidad del flujo fue de 0.9 ml/min y los datos cromatográficos se analizaron mediante un programa informático Millennium 2010 (Millipore). NA y NMN se detectaron simultáneamente a unos tiempos de elución de 4.25 y 7.32 min, respectivamente, y se cuantificaron por referencia a patrones de calibración inyectados al inicio y final de cada serie de análisis. Se observaron las referencias lineales entre la cantidad de estándar inyectado y la altura de pico medida. El contenido de NA y NMN en VD y VI se expresó en nanogramos por gramo de peso del tejido.

#### **IV.4- INMUNOCITOQUÍMICA**

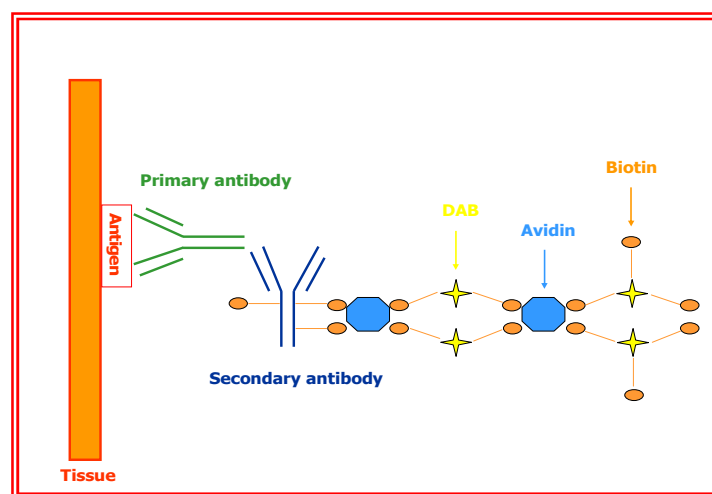
Los animales fueron anestesiados con una dosis subletal de pentobarbital sódico (100 mg/kg i.p.) 90 min después de la administración de salino o naloxona para determinar la expresión de c-Fos y p-ERK<sub>1/2</sub>. Seguidamente se procedió a la apertura del tórax y a la perfusión retrógrada mediante canulación de la aorta descendente. Las ratas se perfundieron con 300 ml de tampón fosfato salino (PBS, pH 7.4) y, a continuación, con 500 ml de paraformaldehído (4% en PBS, pH 7.4) a 4° C. Una vez finalizada la perfusión, se extrajo el corazón y se postfijó en paraformaldehído, durante toda la noche, a 4° C.

Una vez descartadas ambas aurículas, se realizaron cortes transversales de 0.5 cm de grosor que contenían VD y VI a una distancia de 0.4 cm del ápex. A continuación, estas piezas de 0.5 cm de grosor se procesaron para su inclusión en parafina mediante un procesador (Citadler 1000, España) durante 15 h. Se obtuvieron secciones de 5  $\mu\text{m}$  de grosor que contenían ambos ventrículos mediante un microtomo (HM310, Microm, España) y fueron montadas en portas impregnados con poli-L-lisina (dilución 1:10 en agua destilada). Las secciones se desparafinaron en xilol, se hidrataron en alcoholes decrecientes y se preincubaron durante 20 min en metanol absoluto que contenía  $\text{H}_2\text{O}_2$  al 3%, con el fin de bloquear la actividad peroxidasa endógena del tejido. Los cortes fueron lavados dos veces en PBS y a continuación incubados durante 30 min en una mezcla que contenía PBS, suero de cerdo (NSS) al 1% y Tritón X-100 al 0.5% (NSS-PBS).

Las cortes fueron incubados, con el primer anticuerpo policlonal específico frente a c-Fos (sc-52, Santa Cruz, USA), dilución 1:3000 durante 36 h a 4°C o con el anticuerpo monoclonal específico frente a p-ERK<sub>1/2</sub> (sc-7383, Santa Cruz), dilución 1:1500 durante toda la noche a 4°C. A continuación se procedió a realizar un doble lavado de 15 min con PBS, y los cortes se incubaron a temperatura ambiente durante 1 h con el segundo anticuerpo, que consistía en una IgG biotinilada anti-conejo (Vector, USA), dilución 1:200, en el caso de c-Fos y en una IgG biotinilada anti-ratón (Vector), dilución 1:400, para el estudio de p-ERK<sub>1/2</sub>.

Posteriormente, las secciones fueron incubadas con el complejo macromolecular avidina-biotina (1 h, temperatura ambiente), diluido 1:100 en NSS-PBS. Tras un doble lavado con PBS, los cortes fueron expuestos durante 10 min al tampón Tris-HCl (0.05M). Dicho tampón fue también utilizado para diluir al 0.033% el tetrahidrocloreto de 3,3'-diaminobencidina (DAB), sustrato cromógeno de la peroxidasa, al cual se añadió, una vez disuelto,  $\text{H}_2\text{O}_2$  al 0.014 %. Esta solución permite

visualizar la reacción antígeno-anticuerpo, y por tanto la expresión de c-Fos y p-ERK<sub>1/2</sub>. Los cortes fueron incubados en esa solución durante 5-7 min en oscuridad, y la reacción de oxidación del DAB por el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se detuvo, cuando la tinción fue adecuada, mediante un último lavado con PBS (figura 6). Para evaluar la inmunorreactividad a c-Fos y p-ERK<sub>1/2</sub> en VD y VI, las preparaciones fueron examinadas mediante un microscopio óptico (DMLB, Leica, España).



**Figura 6.** Esquema del método inmunocitoquímico.

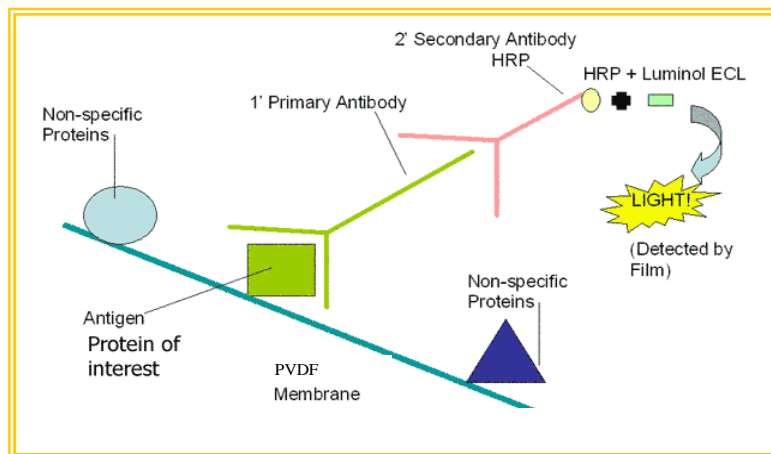
#### IV.5- WESTERN BLOT

Después de la administración de salino o naloxona, las ratas fueron decapitadas a los 60 min (para determinar p-ERK<sub>1/2</sub>, ERK total, TH total, TH fosforilada en serina 40 y en serina 31) y a los 90 min (para determinar c-Fos, TH no fosforilada, PKA, p-CREB, TH total, p-ERK<sub>1/2</sub>, ERK total, TH fosforilada en serina 40 y en serina 31), siendo extraído el corazón, separados VD y VI, y congelados a -80°C.

Las muestras de VD y VI resultantes fueron introducidas en viales de polipropileno mantenidos en frío, que contenían, en el caso del VD: 594 µl de PBS 1X, 6 µl de inhibidores de fosfatasa, 150 µl de SDS (dodecil

sulfato sódico, 10%) y 187.5 µl de inhibidores proteolíticos; y en el caso del VI: 784 µl de PBS 1X, 8 µl de inhibidores de fosfatasas, 198 µl de SDS (10%) y 247.5 µl de inhibidores proteolíticos. A continuación, las muestras se homogenizaron en homogenizador Polytron durante 30-40 s, se introdujeron en un baño de ultrasonidos (Selecta, España) durante 30 s y se centrifugaron a 15000 r.p.m., 10 min a 4°C en centrifuga refrigerada (Beckman, Alemania). El sobrenadante se colocó en tubos Eppendorf y éstos se almacenaron a -80°C para la posterior determinación de proteínas.

La determinación de la concentración de proteínas totales de cada muestra se realizó siguiendo el método del ácido bicinonínico descrito por Wiechelman (Wiechelman y cols., 1988). El volumen máximo de muestra que se cargó en cada calle fue de 25 µl. Las muestras diluidas empleadas en este trabajo, tuvieron una concentración de proteínas de 50 µg por calle. En cada uno de los geles se introdujeron dos controles de proteínas estándar BenchMark™ Prestained (Invitrogen, España) y Kaleidoscope Prestained Standards (Bio-Rad, USA), con pesos moleculares conocidos, para tener una referencia correcta a la hora de identificar la proteína problema. Se realizaron controles de carga, con el fin de comprobar que en todas las calles la concentración de proteínas era la misma. Una vez cargadas todas las muestras en sus respectivas calles, se llevó a cabo una electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970). Posteriormente se realizó la transferencia de proteínas a membranas de fluoruro de polivinildieno (PVDF) mediante una cubeta. El proceso consta de cinco etapas (figura 7):



**Figura 7.** Esquema donde se representan las diferentes etapas de que consta la inmunodetección por western blot (tomado de Reina, 2001).

El control de proteínas estándar utilizado durante la electroforesis nos sirvió en la transferencia al ser coloreado, para comprobar que toda la gama de proteínas con diferentes pesos moleculares se había transferido. Como control de carga se cortó la parte final de toda la membrana y se llevó a cabo una tinción con Amido black durante 15 min, lavándola después con un destintor de esta misma disolución. Una vez realizada la transferencia, la membrana se puede analizar inmediatamente o bien conservarla en frío durante meses en tampón de bloqueo.

Una vez bloqueada la membrana con TBS-T (tris buffer salino-tween 20) en BSA (albúmina de suero bovino al 1%) durante 1 h agitando, se llevó a cabo la incubación con un anticuerpo primario para localizar la proteína de interés. En nuestro caso se utilizaron los siguientes anticuerpos en TBS-T con BSA:

- Anticuerpo policlonal frente a c-Fos (sc-211, Santa Cruz), dilución 1:2000.
- Anticuerpo policlonal frente a c-Fos (sc-52, Santa Cruz), dilución 1:2000.
- Anticuerpo monoclonal frente a TH (Diasorin, USA), que reconoce la forma no fosforilada de la enzima, dilución 1:4000.

- Anticuerpo policlonal frente a TH (Chemicon, USA), que reconoce la forma fosforilada y no fosforilada de la enzima, dilución 1:1000.
- Anticuerpo policlonal frente a TH fosforilada en la serina 31 (Chemicon), dilución 1:500.
- Anticuerpo policlonal frente a TH fosforilada en la serina 40 (Chemicon), dilución 1:500.
- Anticuerpo policlonal frente a PKA $\alpha$  (sc-903, Santa Cruz), dilución 1:2000.
- Anticuerpo monoclonal frente a CREB fosforilado en la serina 133 (Upstate, USA), dilución 1:1000.
- Anticuerpo policlonal frente a ERK (sc-154, Santa Cruz), dilución 1:1000.
- Anticuerpo monoclonal frente a ERK<sub>1/2</sub> fosforilada (sc-7383, Santa Cruz), dilución 1:1000.

Las membranas se dejaron incubar durante toda la noche a 4°C, previa agitación a temperatura ambiente. A continuación se lavó la membrana tres veces con la disolución TBS-T y posteriormente se incubó con un segundo anticuerpo, marcado con la enzima peroxidasa y contra la especie en la que se ha producido el primero. Se emplearon los siguientes anticuerpos secundarios:

- Anticuerpo anti-ratón (AP308P, Chemicon).
- Anticuerpo anti-ratón (sc-2005, Santa Cruz).
- Anticuerpo anti-conejo (sc-2004, Santa Cruz).

El segundo anticuerpo se incubó en el mismo tampón de bloqueo a una dilución 1:5000 durante 60 min con agitación. Una vez terminada la incubación con el segundo anticuerpo, se procedió a lavar de nuevo la membrana tres veces con TBS-T con el fin de eliminar posibles restos del mismo.

Para la visualización de la proteína de interés, se utilizó el Kit ECL (Amersham, UK), el cual, mediante un sistema de oxidación de la enzima peroxidasa, emite una luz que posteriormente es recogida en una película (Hiperfilm ECL, Amersham) dentro de los chasis de revelado (Amersham). Seguidamente, la película es expuesta en primer lugar a líquido revelador y posteriormente a líquido fijador bajo la exposición de una bombilla roja tras un filtro de luz (Kodak, USA).

Posteriormente se procedió al desnudamiento de la membrana en tampón de desnudamiento (glicina 25 mM, SDS 1%, pH 2) y a su incubación con el anticuerpo monoclonal frente a actina (monoclone 5C5, Sigma, USA), dilución 1:8000, o  $\beta$ -actina (Cell Signalling, USA), dilución 1:1000, los cuales se emplearon como control de carga.

La intensidad de las bandas correspondientes a la proteína de interés (c-Fos: 62 kDa, TH: 60 kDa, PKA: 42 kDa; CREB fosforilado: 46 kDa; ERK total: 42 kDa; ERK<sub>1/2</sub>: 42 y 44 kDa) fue cuantificada por densitometría, mediante un analizador de imágenes Alpha Innotech conectado a un ordenador con software AlphaImager 2200 (Nucliber, España). La variación entre las bandas problema y las controles fue calculada en la misma imagen, el background fue corregido automáticamente por el analizador. Los resultados son expresados como el % de cambio de densidad óptica respecto al valor del control respectivo (definido como el 100 % del valor).

#### **IV.6- MEDIDA DE LA ACTIVIDAD TH**

Después de la administración de salino o naloxona, las ratas fueron decapitadas a los 90 min, siendo extraído el corazón, separados VD y VI, y congelados a -80°C.

La TH cataliza la hidroxilación de tirosina para generar L-DOPA y agua, usando como cofactor tetrahidrobiopterina (BH<sub>4</sub>). La actividad TH se midió mediante la cuantificación del agua tritiada producida por la 3,5-[<sup>3</sup>H]L-tirosina. Las muestras de VD y VI se homogenizaron en un vial que contenía tampón de homogenización, tras lo cual se centrifugaron a 10000 rpm durante 10 min a 4°C. Se incubaron 25 µl de sobrenadante a 37°C, en un volumen final de 50 µl de una mezcla reactiva compuesta de: Tris HCl 0.2 M (pH, 7), BH<sub>4</sub> 1 mM, β-mercaptoetanol 10 mM, catalasa 0.02%, L-[3,5-<sup>3</sup>H] tirosina diluída isotópicamente 50 µM.

Tras 4 h de incubación, la reacción se paró mediante la adición de ácido tricloroacético al 1% y los compuestos orgánicos radioactivos se separaron del agua tritiada mediante absorción en una resina. Tras la centrifugación (12000 rpm, 4°C, 5 min), en el sobrenadante solo quedó prácticamente agua tritiada. En tubos de plástico se añadieron 2 ml de líquido de centelleo y 100 µl de sobrenadante y se realizó la medida en un contador de centelleo (Wallac 1409, Suecia). Para los tubos en blanco, las muestras fueron reemplazadas por PBS-ortovanadato sódico y se siguió el mismo protocolo.

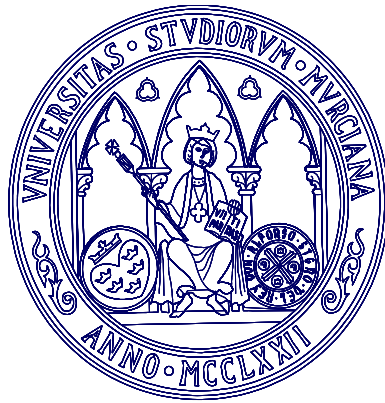
La actividad TH se determinó como <sup>3</sup>H<sub>2</sub>O producida por min/µg de proteína.

#### **IV.7- ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS**

En cada grupo experimental se calculó la media aritmética y su correspondiente error estándar (S.E.M), para realizar el análisis estadístico de los resultados. En el caso del western blot, de las unidades arbitrarias obtenidas en el analizador de imágenes, al grupo control se le dio un valor de 100, y en los grupos experimentales se calculó el porcentaje de cambio



respecto al control. Las comparaciones entre los diferentes grupos se realizaron mediante un análisis de varianza (ANOVA) de una vía, seguido de un test de Newman-Keuls o de un test de Dunnett, mediante el programa Prism 4.0 (GraphPadPrism, USA). En los casos en los que solamente se compararon dos grupos experimentales, el análisis estadístico de los datos se realizó mediante el test de la t de Student no pareada. Las diferencias se consideraron significativas para un valor de  $p < 0.05$ .



# *V- RESULTADOS*

Antes de la realización de los diferentes experimentos de que consta este trabajo, se valoró en primer lugar la eficacia del tratamiento crónico con morfina mediante implantación subcutánea de pellets, técnica que previamente ha demostrado ser eficaz para inducir tolerancia y dependencia (González-Cuello y cols., 2004a; Martínez y cols., 2003). Con este fin, se controló el peso de los animales los días de la implantación de pellets y el día del sacrificio (día 8), antes de recibir las inyecciones agudas de salino o naloxona. Las ratas tratadas crónicamente con morfina mostraron una ganancia de peso significativamente menor que los animales tratados con pellets de placebo, lo que demuestra que la morfina era liberada correctamente de los pellets. Por otra parte, la administración de naloxona a ratas control no produjo cambios significativos en el peso corporal, el cual se midió a los 60 o 90 min de la inyección aguda del antagonista opioide, comparado con el grupo control que recibió salino en lugar de naloxona. Sin embargo, y de acuerdo con resultados previos de este laboratorio (Laorden y cols., 2002a), los animales tratados crónicamente con morfina mostraron una pérdida de peso significativamente mayor a los 60 y a los 90 min de la inyección de naloxona, en comparación con los animales implantados con pellets de placebo que recibieron naloxona de forma aguda (véase trabajo 3, figura 1). Junto con la pérdida de peso se observó si aparecían los siguientes signos de comportamiento típicos del síndrome de abstinencia a morfina y a otros opioides: sacudidas, castaño, saltos, ptosis, rinorrea, piloerección, cromodacriorrea, temblor, salivación y fenómenos de escape. La administración de naloxona a ratas tratadas crónicamente con morfina desencadenó los signos citados, lo que indica la presencia de dependencia física.

En el presente estudio se valoró la influencia del tratamiento crónico con HA-1004 y calfofostín C o del tratamiento agudo con SL-327 sobre la pérdida de peso y los signos de comportamiento. En este sentido no se observaron cambios en ninguno de los parámetros estudiados.

## **V.1- MECANISMOS CELULARES Y MOLECULARES QUE SE PONEN EN MARCHA DURANTE LA DEPENDENCIA DE MORFINA**

### **a) Evaluación del turnover de NA y de la actividad de TH durante el síndrome de abstinencia a morfina**

Se determinaron mediante HPLC las posibles modificaciones en el turnover de NA, medido como la ratio NMN/NA. Los resultados obtenidos mostraron que 60 o 90 min después de la administración de naloxona a ratas dependientes de morfina se produjo un incremento significativo ( $p < 0.001$ ) de este turnover en VD ( $0.058 \pm 0.009$ ;  $0.065 \pm 0.009$ , respectivamente) y VI ( $0.070 \pm 0.009$ ;  $0.080 \pm 0.009$ , respectivamente) cuando se comparó con el grupo dependiente que recibió salino y con el grupo placebo inyectado con naloxona (véase trabajo 1, figura 1; trabajo 2, figura 3; trabajo 4, figura 1). Estos resultados están de acuerdo con resultados previos de este laboratorio (Martínez y cols., 2003; González-Cuello y cols., 2004c) que también mostraron un aumento del turnover de NA durante el síndrome de abstinencia a morfina en corazón.

En paralelo al aumento del turnover de NA, nuestros resultados demuestran un aumento de la actividad TH 90 min después de la administración de naloxona a ratas dependientes de morfina (VD:  $51.0 \pm 2.3$  dpm/ $\mu$ g de proteína; VI:  $61.0 \pm 1.2$  dpm/ $\mu$ g de proteína cuando se comparó con el grupo control tratado con naloxona (VD:  $6.10 \pm 1.2$ ; VI:  $6.8 \pm 1.5$ ,  $p < 0.001$ ) (véase trabajo 4, figura 7).

## **b) Valoración de las modificaciones que se producen en los niveles de la proteína TH y de TH fosforilada en serina 40 y 31 durante el síndrome de abstinencia a morfina**

En la primera parte de este estudio investigamos las posibles modificaciones que se producen en los niveles de la enzima TH no fosforilada y de TH total mediante western blot. Para ello, los animales fueron sacrificados 60 o 90 min después de la administración de salino o naloxona. Los resultados muestran que 90 min después de la instauración del síndrome de abstinencia a morfina se produjo un incremento significativo de los niveles de TH no fosforilada en VD ( $140.0 \pm 1.8$ ,  $p < 0.01$ ) y VI ( $136.0 \pm 1.2$ ,  $p < 0.01$ ) (véase trabajo 1, figura 2; trabajo 2, figura 4). La inmunoreactividad a TH total fue estudiada 60 o 90 min después de la administración de naloxona a ratas dependientes de morfina. La administración del antagonista opioide produjo un aumento significativo de los niveles de esta proteína en VD ( $118.3 \pm 2.0$ ,  $p < 0.01$ ;  $118.1 \pm 5.0$ ,  $p < 0.01$ , respectivamente) y VI ( $114.4 \pm 4.6$ ,  $p < 0.05$ ;  $115.1 \pm 3.8$ ,  $p < 0.05$ , respectivamente). Dicho incremento no se observó en los grupos controles que recibieron naloxona (VD:  $91.1 \pm 2.9$ ,  $92.5 \pm 4.0$ ; VI:  $88.3 \pm 4.1$ ,  $88.3 \pm 4.1$ ) ni en las ratas tratadas con morfina inyectadas con salino (VD:  $98.3 \pm 1.1$ ,  $98.9 \pm 7.5$ ; VI:  $85.3 \pm 6.0$ ,  $84.9 \pm 5.3$ ) (véase trabajo 2, figura 4; trabajo 4, figuras 2 y 3).

Con respecto a los niveles de TH fosforilada en serina 40, se obtuvieron los mismos resultados que con TH no fosforilada y total, es decir, un aumento de los niveles de dicha enzima 60 (VD:  $141.0 \pm 4.9$ ,  $p < 0.05$ ; VI:  $130.9 \pm 6.4$ ,  $p < 0.05$ ) y 90 (VD:  $145.1 \pm 8.1$ ,  $p < 0.05$ ; VI:  $139.0 \pm 13.0$ ,  $p < 0.05$ ) min después de la administración de naloxona a ratas dependientes de morfina, en comparación con el grupo de morfina inyectado con salino y con el grupo control que recibió naloxona (véase trabajo 4 figura 4) .

También estudiamos la fosforilación de TH en serina 31 a diferentes tiempos, observando que a los 60 min de la administración de naloxona a ratas dependientes de morfina no existieron cambios en los niveles de esta proteína ni en VD ni en VI. Sin embargo, a los 90 min de la administración del antagonista opioide se observó un claro aumento (VD:  $134.8 \pm 9.8$ ; VI:  $135.5 \pm 11.7$ ) en la expresión de esta proteína, en relación con el grupo control que recibió naloxona (VD:  $89.6 \pm 8.4$ ,  $p < 0.05$ ; VI:  $99.6 \pm 3.9$ ,  $p < 0.01$ ) y con el grupo dependiente que recibió salino en lugar de naloxona (VD:  $102.9 \pm 8.3$ ,  $p < 0.05$ ; VI:  $100.0 \pm 4.1$ ,  $p < 0.05$ ) (véase trabajo 4, figura 5).

### **c) Evaluación de los cambios en la expresión de c-Fos, PKA, p-CREB, ERK total y p-ERK<sub>1/2</sub> durante el síndrome de abstinencia a morfina**

Entre los cambios moleculares que se producen tras la administración de muchas drogas de abuso se encuentra la expresión de IEG como c-Fos. Se sabe que el factor de transcripción c-Fos se modifica en distintas áreas cerebrales durante el síndrome de abstinencia a morfina (Curran y cols., 1996; Laorden y cols., 2002b) y es ampliamente usado como indicador de la activación celular (Morgan y Curran, 1991). Las células cardíacas presentan características de excitación-despolarización similares a las células neuronales, por lo que los IEG podrían ser empleados para monitorizar la actividad cardíaca.

En este estudio determinamos el contenido de la proteína c-Fos en VD y VI mediante western blot e inmunocitoquímica en ratas tratadas crónicamente con morfina. Nuestros resultados obtenidos mediante western blot muestran que 90 min después de la administración de naloxona a ratas dependientes de morfina se produjo un aumento significativo ( $p < 0.001$ ) de la inmunoreactividad a c-Fos tanto en VD

(169.7±11.9) como en VI (171.6±12.2), respecto a la observada en el grupo control al que se le administró naloxona (111.2±5.1; 113.7±9.9, respectivamente). No se observaron diferencias significativas entre el grupo control que recibió una inyección de salino versus el grupo control inyectado con naloxona (véase trabajo 1, figura 3; trabajo 2, figura 5; trabajo 3, figura 6).

El análisis inmunocitoquímico mostró que durante el síndrome de abstinencia a morfina se produjo un aumento de la expresión de c-Fos tanto en VD como VI, mientras que no se observó expresión de esta proteína en los grupos controles (véase trabajo 1, figura 3; trabajo 2, figura 5; trabajo 3, figura 6).

La influencia de la dependencia y síndrome de abstinencia a morfina sobre la inmunorreactividad de PKA fue evaluada mediante western blot. Los resultados muestran un aumento de la subunidad catalítica de la PKA ( $p < 0.05$ ) en VD (120.7±3.7) y VI (129.4±4.5) 90 min después de la administración de naloxona a ratas dependientes de morfina, en comparación con el grupo control que recibió naloxona y con el grupo tratado crónicamente con morfina que recibió salino en lugar de naloxona (véase trabajo 2, figura 1).

Con respecto a los posibles cambios en la expresión de p-CREB, se observó un incremento significativo ( $p < 0.001$ ) en los niveles del mismo 90 min después de la inducción del síndrome de abstinencia a morfina en VD (180.0±3.1) y VI (230.0±37.0), cuando se comparó con el grupo control que recibió naloxona (110.0±3.6; 95.8±6.2, respectivamente) y con el grupo de morfina que recibió una inyección de salino (97.5±5.2; 102.2±8.3, respectivamente) (véase trabajo 2, figura 2).

Otro de nuestros objetivos fue estudiar la posible influencia de la dependencia y síndrome de abstinencia a morfina sobre la inmunorreactividad de p-ERK<sub>1/2</sub> y ERK total, a diferentes tiempos, tras la administración de naloxona a ratas tratadas crónicamente con morfina. Nuestros resultados muestran un aumento de los niveles de p-ERK<sub>1</sub> y p-ERK<sub>2</sub> 60 min después de la administración del antagonista opioide a ratas dependientes de morfina tanto en VD (215.2±27.7, p<0.05; 198.2±13.1, p<0.01, respectivamente) como en VI (177.4±11.5, p<0.01; 180.7±11.1, p<0.001, respectivamente). Idénticos resultados se obtuvieron después de la administración 90 min después de la administración de naloxona. Sin embargo, la inmunorreactividad a p-ERK<sub>1</sub> y p-ERK<sub>2</sub> no se modificó en los grupos controles. Por otra parte, la expresión de ERK total no varió en ninguno de los grupos estudiados (véase trabajo 3, figuras 2, 3 y 4). Estos resultados indican que durante el síndrome de abstinencia se produce un aumento de la cantidad de proteína activada pero no de la proteína total.

Paralelamente y con el fin de obtener más información de la localización celular de las p-ERK en corazón, se realizó un estudio inmunocitoquímico usando el mismo anticuerpo empleado en el western blot. Los animales fueron sacrificados 90 min después de la inyección de salino o naloxona y los resultados mostraron niveles elevados de p-ERK en VD y VI tras la administración de naloxona a ratas dependientes de morfina. El marcaje fue principalmente citoplasmático, sugiriendo una activación local de la proteína aunque también se observó marcaje nuclear en algunos miocitos cardiacos, indicando la translocación nuclear de algunas de estas proteínas activadas. Por el contrario, no se observó marcaje en las ratas control que recibieron naloxona ni en las ratas dependientes de morfina inyectadas con salino (véase trabajo 3, figura 5). Estos datos obtenidos mediante inmunocitoquímica nos sirvieron para confirmar los resultados observados cuando realizamos la técnica de western blot.



## **V.2- IMPLICACIÓN DE LAS CASCADAS DE TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES PKA Y PKC EN LA HIPERACTIVIDAD NORADRENÉRGICA OBSERVADA DURANTE EL SÍNDROME DE ABSTINENCIA A MORFINA**

Con el fin de establecer la relación entre las rutas de la PKA y de la PKC y las adaptaciones bioquímicas inducidas por la administración crónica de morfina a nivel cardiaco, examinamos la capacidad del HA-1004 y de calfofostín C, administrados vía minibombas osmóticas, para modificar el turnover de NA en VD y VI. Nuestros resultados muestran que la administración crónica de HA-1004 concomitantemente con morfina antagonizó ( $p < 0.001$ ) el incremento del turnover de NA observado durante el síndrome de abstinencia a morfina en VD y VI, tanto a los 60 ( $0.0189 \pm 0.003$ ;  $0.0170 \pm 0.003$ ) como a los 90 min ( $0.0189 \pm 0.003$ ;  $0.019 \pm 0.003$ ) de su inducción. Sin embargo, la administración de calfofostín C no alteró el incremento del turnover observado durante dicho síndrome, a ninguno de los tiempos estudiados, cuando se comparó con los grupos tratados con vehículo en lugar del inhibidor de PKC (véase trabajo 1, figura 1; trabajo 2, figura 3; trabajo 4, figura 1).

## **V.3- EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE TH NO FOSFORILADA, TH TOTAL Y TH FOSFORILADA EN LA SERINA 40 EN PRESENCIA DE INHIBIDORES DE PKA Y PKC**

Se determinaron en primer lugar las posibles modificaciones en los niveles de TH no fosforilada tras la administración crónica de HA-1004 y calfofostín C concomitantemente con morfina. Los resultados muestran que 90 min después de la administración de naloxona a ratas dependientes de morfina ambos inhibidores no fueron capaces de antagonizar el aumento

de TH no fosforilada que se observaba en ratas que recibieron vehículo en lugar de HA-1004 o de calfofostín C (véase trabajo 1, figura 2; trabajo 2, figura 4).

A continuación realizamos el estudio de TH total, comprobando que el HA-1004 fue capaz de abolir el aumento de la expresión de esta proteína observado 60 o 90 min después de la administración de naloxona a ratas tratadas crónicamente con morfina tanto en VD ( $93.3 \pm 4.2$ ,  $97.9 \pm 5.8$ , respectivamente,  $p < 0.01$ ) como en VI ( $95.7 \pm 4.1$ ,  $96.2 \pm 3.5$ , respectivamente,  $p < 0.01$ ) (véase trabajo 2, figura 4; trabajo 4, figuras 2 y 3). Sin embargo, el inhibidor de la PKC, calfofostín C, no modificó el incremento de la expresión de TH total observado en VD ( $119.1 \pm 0.1$ ,  $108.0 \pm 2.3$ , respectivamente) o en VI ( $133.4 \pm 11.6$ ,  $134.4 \pm 12.7$ , respectivamente) durante el síndrome de abstinencia a morfina a ninguno de los tiempos estudiados (véase trabajo 4, figuras 2 y 3).

Respecto a los niveles de TH fosforilada en serina 40, se observó que el antagonista de la PKA, HA-1004, bloqueó el aumento de la expresión de la misma observada en ratas tratadas con vehículo en lugar del inhibidor, 60 (VD:  $115.0 \pm 9.4$ ,  $p < 0.05$ ; VI:  $108.1 \pm 10.1$ ,  $p < 0.05$ ) o 90 (VD:  $105.4$ ,  $p < 0.05$ ; VI:  $85.5 \pm 11.0$ ,  $p < 0.01$ ) min después de la administración de naloxona a ratas dependientes de morfina (véase trabajo 4, figura 4).

#### **V.4- ESTUDIO DE LA IMPLICACIÓN DE PKA Y PKC EN EL AUMENTO DE LA EXPRESIÓN GÉNICA (c-FOS) QUE SE PRODUCE DURANTE EL SÍNDROME DE ABSTINENCIA A MORFINA**

Otro de los objetivos de este estudio fue valorar mediante western blot e inmunocitoquímica qué tipo de PK estaba implicado en el aumento

de la expresión de c-Fos observado durante el síndrome de abstinencia a morfina a nivel cardiaco. Los resultados obtenidos demuestran que la administración de HA-1004 no alteró el aumento en la expresión de c-Fos observada en VD ( $165.0 \pm 4.2$ ) o en VI ( $169.0 \pm 3.2$ ) (véase trabajo 2, figuras 5 y 6). Sin embargo, el calfofostín C sí antagonizó ( $p < 0.001$ ) la inducción en la expresión de c-Fos tanto en VD ( $74.5 \pm 1.8$ ) como en VI ( $74.2 \pm 1.8$ ) (véase trabajo 1, figuras 3 y 4).

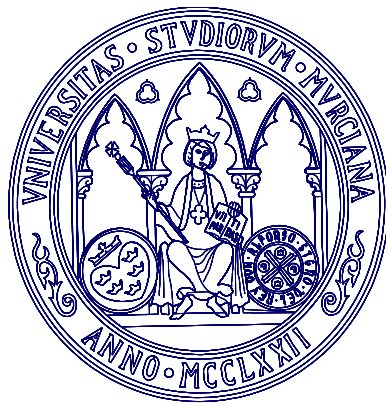
## **V.5- IMPLICACIÓN DE LA VÍA DE LAS MAPKs EN LA EXPRESIÓN DE c-FOS Y TH FOSFORILADA EN LA SERINA 31**

En esta parte del estudio se determinaron los niveles de p-ERK<sub>1/2</sub>, c-Fos y TH fosforilada en serina 31 tras la inhibición de la activación de ERK provocada por el antagonista selectivo de MEK, SL-327.

En primer lugar estudiamos si la dosis de SL-327 (100 mg/kg) era adecuada para impedir la fosforilación y por tanto activación de p-ERK<sub>1/2</sub>. Una vez comprobado que esta dosis era efectiva, se determinaron los posibles cambios en la expresión de c-Fos tras la administración de SL-327 a ratas dependientes de morfina. La administración del antagonista de MEK, 1 h antes de la administración de naloxona a ratas tratadas crónicamente con morfina, redujo significativamente el aumento en la expresión de c-Fos tanto en VD ( $130.1 \pm 6.5$ ,  $p < 0.01$ ) como en VI ( $90.7 \pm 1.4$ ,  $p < 0.001$ ) respecto al grupo tratado con vehículo en lugar de SL-327 ( $191.2 \pm 3.8$ ;  $170.5 \pm 7.2$ , respectivamente) (véase trabajo 3, figura 8).

Por último, y debido a que la fosforilación de TH en serina 31 depende de ERK<sub>1/2</sub>, investigamos si la administración de SL-327 produciría algún cambio en el aumento de la expresión de TH fosforilada

en serina 31 observado en corazón durante el síndrome de abstinencia a morfina. Nuestros resultados muestran que este inhibidor fue capaz de atenuar dicho aumento tanto en VD ( $98.07 \pm 6.15$ ,  $p < 0.01$ ) como en VI ( $101.7 \pm 7.7$ ,  $p < 0.05$ ) 90 min después de la administración de naloxona a ratas dependientes de morfina versus al grupo tratado con vehículo (VD:  $138.8 \pm 13.8$ ; VI:  $124.6 \pm 4.0$ ) (véase trabajo 4, figura 6).



## *VI - DISCUSIÓN*

La exposición crónica a opioides produce importantes cambios adaptativos en diferentes sistemas de neurotransmisión tales como el sistema noradrenérgico, dopaminérgico, gabaérgico, glutamatérgico, etc. (Nestler y Aghajanian, 1997; Nestler, 1992; Maldonado, 1997; Boundy y cols., 1998; Kauer y Malenka, 2007). En esta línea, diferentes estudios de nuestro laboratorio han demostrado que durante el síndrome de abstinencia a morfina se producen numerosas modificaciones en el sistema noradrenérgico cardiaco (Rabadán y cols., 1998; Milanés y cols., 2000; Milanés y Laorden, 2000; Milanés y cols., 2001) y en el núcleo paraventricular del hipotálamo (Milanés y cols., 1998; Fuertes y cols., 2000a; Núñez y cols., 2007; Laorden y cols., 2000a). Estos cambios incluyen aumento del turnover de NA y de la expresión de TH. Los resultados del presente trabajo demuestran que durante el síndrome de abstinencia a morfina se produce un aumento del turnover de NA en paralelo con un incremento en la expresión de TH. Esta regulación al alza de TH incrementaría la capacidad de las neuronas noradrenérgicas para sintetizar NA, lo que se traduciría en un aumento del turnover de NA. En consonancia con resultados previos (Martínez y cols., 2003), en este trabajo se demuestra que HA-1004, pero no calfostin C, bloquea significativamente el aumento del turnover de NA y la expresión de TH durante el síndrome de abstinencia a morfina en VD y VI. Estos datos sugieren que la activación de la PKA es necesaria para el aumento de la actividad noradrenérgica que observamos en corazón tras la administración de naloxona a ratas dependientes de morfina. En este sentido observamos que durante el síndrome de abstinencia a morfina se produce un aumento de la expresión de PKA, junto con una fosforilación de CREB, diana de la cascada AMPc/PKA (Nestler, 2004).

En la actualidad es conocido que uno de los sistemas de neurotransmisión mejor caracterizado, como potencialmente responsable en el desarrollo de tolerancia/dependencia a opioides a nivel del SNC y SNP, es la cascada de AC/AMPc/PKA. Se ha propuesto que la activación

al alza de esta vía tras el tratamiento crónico con morfina sería crítica para el desarrollo de dependencia de morfina (Nestler y Aghajanian, 1997; Milanés y cols., 2000; Nestler, 2004). En base a estos datos, parece posible que la regulación al alza del AMPc produzca una activación de PKA que a su vez active a CREB. Entre los genes regulados por CREB se encuentra el gen de la AC tipo VIII y el de TH, cuya expresión se ve aumentada por la administración crónica de morfina vía un mecanismo CREB dependiente (Chao y Nestler, 2004). Por tanto, PKA podría fosforilar el residuo serina 133 de CREB (Waltereit, 2003) y como consecuencia aumentar la síntesis de TH.

Por otra parte, la fosforilación de TH está implicada en la regulación de la síntesis de catecolaminas y en su función. Concretamente, los incrementos en la fosforilación de serina 40 y 31 aceleran la actividad TH y por tanto estimulan la síntesis del neurotransmisor en las terminaciones noradrenérgicas (Kumer y Vrana, 1996; Dunkley y cols., 2004). En este estudio hemos investigado los cambios en la fosforilación de TH en las terminaciones noradrenérgicas cardiacas durante el síndrome de abstinencia a morfina utilizando anticuerpos que detectan directamente la serina 40 y la serina 31. Nuestros resultados demuestran que tras la administración de naloxona a ratas dependientes de morfina se produce un aumento de la fosforilación de TH en serina 40 y 31, concomitantemente con un aumento en la actividad TH. Todos estos datos sugieren que la fosforilación de TH puede ser un importante modulador de su actividad y puede estar directamente implicada en la regulación del turnover de NA y en el incremento de la fuerza y la frecuencia de contracción observada durante el síndrome de abstinencia a morfina (Rabadán y cols., 1997, 1998).

Es bien conocido que la fosforilación en serina 40 resulta en un considerable incremento en la actividad TH (Dunkley y cols., 2004). A nivel del núcleo estriado se ha demostrado una asociación de la

fosforilación en serina 40 con un aumento de la actividad TH y la síntesis de catecolaminas (Haycock y Haycock, 1991). Nuestros resultados demuestran que los niveles de fosforilación de TH en serina 40 eran incrementados en el VD y en el VI 60 o 90 min después de la administración de naloxona a ratas tratadas crónicamente con morfina. Sin embargo, 60 min después de la administración del antagonista opioide no se producen cambios en la fosforilación de TH en serina 31. Un aumento en la fosforilación de serina 31 se observa 90 min después de la administración de naloxona a ratas dependientes de morfina. Ya que la fosforilación de TH está íntimamente asociada con la activación de la enzima, este resultado está en consonancia con el aumento de la actividad TH que se observa 90 min después de inducir un síndrome de abstinencia por la administración de naloxona.

Estudios previos de nuestro laboratorio han demostrado que el síndrome de abstinencia a morfina se caracteriza por un marcado incremento en los niveles de AMPc y PKA en VD y VI, en paralelo con un aumento del turnover de NA (Milanés y cols., 2000; Cerezo y cols., 2005). Nuestros resultados demuestran un aumento del turnover de NA, un incremento en los niveles de TH y en la fosforilación de la enzima en serina 40. Estos datos sugieren que durante el síndrome de abstinencia a morfina se produce un incremento de TH fosforilada en las terminaciones noradrenérgicas cardiacas. La forma fosforilada de la enzima tiene una alta afinidad por la pteridina, acelerando la síntesis de NA (Kumer y Vrana, 1996) lo que indica que la fosforilación en serina 40 podría estar implicada en el aumento del turnover de NA. Es conocido que la activación de la vía AMPc/PKA incrementa la fosforilación de TH en serina 40 (Haycock, 1990; Dunkley y cols., 2004). Por tanto, y con el fin de examinar el papel que desempeñaría la PKA en la regulación de TH, hemos estudiado la fosforilación de TH en serina 40 en animales tratados con HA-1004 (inhibidor selectivo de PKA) concomitantemente con morfina. Este inhibidor selectivo ha sido utilizado en estudios previos de nuestro



grupo (Martínez y cols., 2003; Benavides y cols., 2005). En estos experimentos hemos observado que la infusión de HA-1004 concomitantemente con pellets de morfina inhibe el aumento del turnover de NA, el incremento en TH total y en la fosforilación y por tanto activación de TH en serina 40 en las terminaciones noadrenérgicas cardiacas. Estos resultados indican que la vía de la PKA está directamente implicada en los cambios adaptativos cardiacos (aumento del turnover de NA, expresión y activación de TH) que se observan durante el síndrome de abstinencia a morfina.

En los últimos años, numerosos estudios han sugerido que las alteraciones persistentes que producen los opioides serían debidas a modificaciones en la expresión génica (Nestler y Aghajanian, 1997; Nestler, 2000; Blendy y Maldonado, 1998). Se ha podido comprobar que la morfina y otros opiáceos producen perturbaciones en la transmisión sináptica, causando cambios en numerosas vías de señalización intracelular, cuyas dianas nucleares son los factores de transcripción, responsables a su vez de la transcripción de muchos genes. En particular, se ha demostrado tanto *in vitro* como *in vivo*, que CREB es uno de los factores de transcripción que se modifica en muchas áreas cerebrales en respuesta a diferentes drogas de abuso, incluidos los opioides (Blendy y Maldonado, 1998; Nestler, 2004). Algunos de los genes que juegan un importante papel en el proceso de la adicción, como los genes que codifican para CRF, TH o c-Fos, contienen en su región promotora la secuencia CRE, por lo que podrían ser diana del factor de transcripción CREB.

Estudios previos de nuestro laboratorio han demostrado un incremento en la expresión de c-Fos en el síndrome de abstinencia a morfina tanto a nivel del SNC (Laorden y cols., 2002b; Benavides y cols., 2003; Núñez y cols., 2007) como en periferia, y más concretamente en tejido cardiaco (González-Cuello y cols., 2003, 2004a,b). En concordancia

con estos datos, en el presente estudio observamos un aumento en la expresión de c-Fos en tejido cardiaco de ratas tratadas crónicamente con morfina e inyectadas con naloxona. Para estudiar la posible implicación de PKA en la regulación de este gen de expresión inmediata, en este estudio administramos HA-1004 concomitantemente con morfina. La administración crónica de HA-1004 no fue capaz de modificar la expresión de c-Fos en tejido cardiaco durante el síndrome de abstinencia a morfina, lo que sugiere que la regulación al alza de c-Fos no requiere la activación de PKA. Estos resultados están en contraposición con estudios previos realizados en SNC (Benavides y cols., 2005) que demuestran que la administración de inhibidores de PKA bloquean parcialmente la expresión de c-Fos. En base a estos datos parece posible que diferentes mecanismos estén implicados en el aumento de c-Fos a nivel cardiaco y sugieren que otras vías distintas a AMPc/PKA podrían estar implicadas en la expresión de este factor de transcripción.

Actualmente está bien establecido que la cascada de PKC estaría involucrada en los procesos de tolerancia/dependencia de morfina (Narita y cols., 1994; Smart y Lambert, 1996; Tokuyama y cols., 1995). También se ha demostrado que durante el síndrome de abstinencia a morfina se produce un aumento en la expresión de diferentes isoformas de PKC (Cerezo y cols., 2005). Por tanto, y con el fin de estudiar la posible implicación de esta vía de señalización en el aumento en la expresión de c-Fos que observamos en tejido cardiaco, utilizamos calfostin C (inhibidor selectivo de PKC). Este estudio demuestra que la administración de calfostin C concomitantemente con morfina bloquea la expresión de c-Fos que se observa en tejido cardiaco tras la administración de naloxona a ratas dependientes de morfina, indicando que la regulación al alza de c-Fos requiere la activación de PKC. Es conocido que la PKC puede fosforilar a SRF o a CREB, los cuales se acoplarían a SER o a CRE, presentes ambos en el gen c-fos, induciendo la expresión de c-Fos (Haasteren y cols., 1999; Liu y Anand, 2001). La inhibición de las unidades reguladoras de

PKC por calfostin C impediría la separación de las unidades catalíticas y por tanto la fosforilación de CREB o de SER, lo que inhibiría la expresión de c-Fos. Los resultados del presente estudio están de acuerdo con los obtenidos en SNC (Benavides y cols., 2005) y sugieren que el gen c-fos es una diana para PKC en tejido cardiaco.

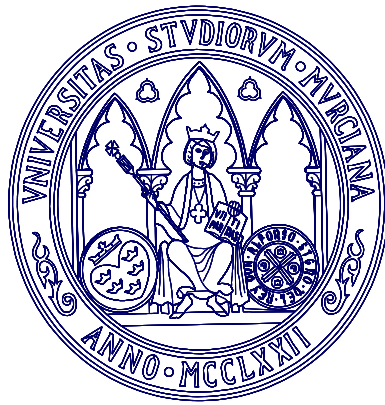
Tratando de profundizar en las vías que podrían estar implicadas en el aumento en la expresión de c-Fos y, teniendo en cuenta que se ha propuesto que durante la administración crónica de morfina no sólo se activan las cascadas de la PKA o de la PKC, sino que otras cascadas intracelulares como las de las MAPK también pueden estar modificadas, estudiamos la posible implicación de las MAPK en los cambios adaptativos cardiacos observados durante el síndrome de abstinencia a morfina. Recientemente, se ha demostrado que el tratamiento crónico con morfina lleva a un incremento en la actividad de las ERK en diferentes núcleos y áreas del SNC (Narita y cols., 2002; Eitan y cols., 2003; Ren y cols., 2004; Cao y cols., 2005). Los resultados del presente estudio demuestran que la administración de naloxona a ratas dependientes de morfina produce un incremento en la fosforilación de ERK<sub>1/2</sub>, sin cambios en la inmunoreactividad de ERK totales. Estos datos sugieren que las ERK estarían implicadas en los cambios adaptativos cardiacos que se observan durante el síndrome de abstinencia a morfina. Las ERK son capaces de fosforilar diferentes substratos, incluyendo enzimas, factores de transcripción y proteínas. En este estudio observamos que las ERK fosforiladas aparecen tanto en el citoplasma como en el núcleo de los miocitos cardiacos. Se ha demostrado que las ERK fosforiladas pueden actuar sobre diferentes enzimas citosólicos, entre otros TH (Haycock, 1993). Su localización nuclear sugiere una acción sobre los genes de expresión inmediata. Así, se ha comprobado que la vía de señalización Ras/ERK es una cascada que lleva a la fosforilación de CREB (Lonze y Ginty, 2002) y por tanto puede estar implicada en el aumento de la expresión de c-Fos que se observa durante el síndrome de abstinencia a

morfina. En este sentido nuestros resultados demuestran que la administración de SL-327, inhibidor de la activación de las ERK, bloquea la expresión de c-Fos que se observa en tejidos cardiacos. Estos resultados están en consonancia con trabajos previos que demuestran que el aumento de la expresión de c-Fos durante el síndrome de abstinencia a morfina es debido fundamentalmente a la activación de la cascada de las ERK (Monje y cols., 2005). Teniendo en cuenta los resultados comentados anteriormente con el inhibidor de PKC, podemos sugerir que la regulación de c-Fos en el corazón parece depender de diferentes cascadas de transducción de señales, incluidas ERK y PKC.

La localización citoplasmática de las ERK fosforiladas sugiere que esta cascada activaría la fosforilación de TH. Ha sido demostrado que ERK<sub>1/2</sub> fosforilan TH en serina 31, incrementando su actividad y la síntesis de catecolaminas (Haycock y cols., 1992; Lindgren y cols., 2002; Dunkley y cols., 2004). Para estudiar la implicación de ERK<sub>1/2</sub> en la fosforilación de TH en serina 31 observada durante el síndrome de abstinencia a morfina, hemos utilizado SL-327, inhibidor de MEK. Los resultados del presente estudio demuestran que el tratamiento con 100 mg/kg (una dosis que selectivamente bloquea MEK) (Pozzi y cols., 2003) disminuye la fosforilación de TH en serina 31 en el VD y en el VI. Estos datos están de acuerdo con los obtenidos en un estudio previo realizado en el SNC (Núñez y cols., 2007) y sugieren que la administración de naloxona a ratas dependientes de morfina produce una activación de las ERK lo que resulta en un aumento de la fosforilación de TH en serina 31.

En resumen, nuestros resultados demuestran un incremento en el turnover de NA, en la fosforilación de TH y en su actividad junto con un aumento en la expresión de c-Fos en corazón durante el síndrome de abstinencia a morfina. Este aumento podría ser debido a la activación de diferentes cascadas de transducción de señales. Es conocido que las vías de mensajeros intracelulares confluyen formando redes complejas de

interacción a múltiples niveles. De hecho, se podría afirmar que una determinada señal intracelular puede suscitar modificaciones en prácticamente cada una de las demás cascadas. Por tanto, los cambios adaptativos cardíacos que observamos durante el síndrome de abstinencia a morfina serían el resultado complejo de las acciones coordinadas de múltiples mensajeros celulares que intervienen a su vez en múltiples vías moleculares. Los resultados del presente estudio pueden ser una importante aportación para entender los desórdenes cardíacos que se producen en los sujetos adictos a morfina y podrían contribuir a establecer nuevas estrategias de prevención y tratamiento.



## *VII - CONCLUSIONES*

En base a los resultados de este estudio, hemos llegado a las siguientes conclusiones:

**1-** Durante el síndrome de abstinencia a morfina se produce un aumento del turnover de NA en paralelo con un incremento en la actividad de TH. Asimismo observamos un aumento en la expresión de la proteína TH y en la fosforilación de la misma en serina 40 y serina 31. Estos últimos resultados podrían indicar la puesta en marcha de mecanismos post-transcripcionales que podrían ser los responsables del incremento de la actividad TH y de la activación de la neurotransmisión noradrenérgica cardiaca que se observa durante dicho síndrome.

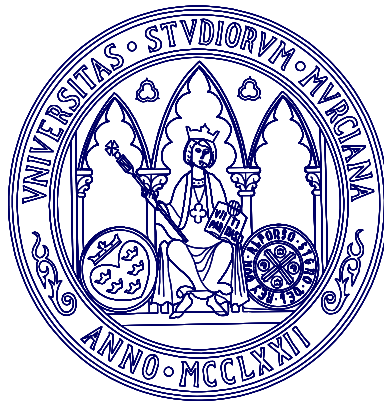
**2-** El tratamiento crónico con HA-1004, inhibidor selectivo de PKA, bloqueó el aumento del turnover de NA, la expresión de TH total y su fosforilación y por tanto, activación de TH en serina 40 observado tras la administración de naloxona a ratas dependientes de morfina, lo que sugiere que estos cambios adaptativos cardiacos estén mediados por la cascada AC/AMPc/PKA. Los resultados del presente estudio descartan la participación de PKC.

**3-** La administración de calfostin C, inhibidor selectivo de PKC, bloquea la expresión de c-Fos observada en nuestro estudio. Estos datos indican que la PKC podría ser una de las vías responsables de la fosforilación de CREB y por este mecanismo inducir la expresión de c-Fos. La ruta de la PKA no estaría implicada en el aumento en la expresión de este factor de transcripción nuclear observado en tejido cardiaco durante el síndrome de abstinencia a morfina.

**4-** Los resultados obtenidos con SL-327, inhibidor selectivo de MEK, sugieren que junto con la cascada de la PKC, otras vías de transducción de señales y, concretamente las MAPK, podrían estar implicadas en el aumento en la expresión de c-Fos. Es conocido que la vía de señalización Ras/ERK fosforila a CREB.

**5-** La localización citoplasmática de ERK<sub>1/2</sub> sugiere que estas kinasas serían las responsables de la fosforilación de TH en serina 31. Esta hipótesis se confirmó con la administración de SL-327. El inhibidor de MEK bloqueó el incremento en la fosforilación de TH en serina 31 observado durante el síndrome de abstinencia a morfina.





# *VIII - BIBLIOGRAFÍA*

- Ardell JL (2001) Neurohumoral control of cardiac function, in *Heart Physiology and Pathophysiology* (Sperelakis N, Kurachi Y, Terzic A and Cohen MV eds) pp 45-60, Academic Press, San Diego.
- Atkins CM, Selcher JC, Petraitis JJ, Trzaskos JM, Sweatt JD (1998) The MAPK cascade is required for mammalian associative learning. *Nat Neurosci* **1**: 602-609
- Benavides M, Laorden ML, Milanés MV (2003) Regulation of tyrosine hydroxylase levels and activity and fos expression during opioid withdrawal in the hypothalamic PVN and medulla oblongata catecholaminergic cell groups innervating the PVN. *Eur J Neurosci* **17**: 103-112.
- Benavides M, Laorden ML, Milanés MV (2005) Involvement of 3',5'-cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase in regulation of Fos expression and tyrosine hydroxylase levels during morphine withdrawal in the hypothalamic paraventricular nucleus and medulla oblongata catecholaminergic cell groups. *J Neurochem* **92**: 246-254.
- Berhow MT, Russel DS, Terwilliger RZ, Beitner-Johnson D, Self DW, Lindsay RM, Nestler EJ (1995) Influence of neurotrophic factors on morphine- and cocaine-induced biochemical changes in the mesolimbic dopamine system. *Neurosci* **68**: 969-979.
- Berhow MT, Hiroi N, Nestler EJ (1996) Regulation of ERK (extra-cellular signal regulated kinase), part of the neurotrophin signal transduction cascade, in the rat mesolimbic dopamine system by chronic exposure to morphine or cocaine. *J Neurosci* **16**: 4707-4715.
- Bian JS, Wang HX, Zhang WM, Wong TM (1998) Effects of kappa-opioid receptor stimulation in the heart and the involvement of PKC. *Br J Pharmacol* **124**: 600-606.
- Blendy JA and Maldonado R (1998) Genetic analysis of drug addiction: The role of cAMP response element binding proteins. *J Mol Med* **76**: 104-110.
- Bonci A and Williams J (1997) Increase probability of GABA release during withdrawal from morphine. *J Neurosci* **17**: 796-803.
- Boundy VA, Gold SJ, Messer CJ, Chen J, Son JH, Hoh TH, Nestler EJ (1998) Regulation of tyrosine hydroxylase promoter activity by chronic morphine in TH9.0-LacZ transgenic mice. *J Neurosci* **18**: 9989-9995.
- Bryant ES, Salimininejad N, Yang YC, Vojdani E, Keith DJr, Polakiewicz R, Evans CJ (2003) Brain region-specific mechanisms for acute morphine-induced mitogen-activated protein kinase modulation and

- distinct patterns of activation during analgesic tolerance and locomotor sensitization. *J Neurosci* **23**: 8360-8369.
- Cami J and Farre M (2003) Drug addiction. *N Engl J Med* **349**: 975-986.
- Cao JL, He JH, Ding HL, Zeng YM (2005) Activation of the spinal ERK signalling pathway contributes naloxone-precipitated withdrawal in morphine-dependent rats. *Pain* **118**: 336-349.
- Cerezo M, Milanés MV, Laorden ML (2005) Alterations in protein kinase A and different protein kinase C isoforms in the heart during morphine withdrawal. *Eur J Pharmacol* **522**: 9-19.
- Chang APL and Dixon WR (1990) Role of plasma catecholamines in eliciting cardiovascular changes seen during naloxone-precipitated withdrawal in conscious, unrestrained morphine-dependent rats. *J Pharmacol Exp Ther* **254**: 857-863.
- Chang SL and Harlan RE (1990) The Fos proto-oncogene protein: Regulation by morphine in the rat hypothalamus. *Life Sci* **46**: 1825-1832.
- Chang SL, Patel NA, Romero AA, Thompson J, Zadina JE (1996) Fos expression induced by interleukin-1 or acute morphine treatment in the rat hypothalamus is attenuated by chronic exposure to morphine. *Brain Res* **736**: 227-236.
- Chao J and Nestler EJ (2004) Molecular neurobiology of drug addiction. *Annu Rev Med* **55**: 113-132.
- Cruz SL and Villarreal JE (1993) Acute opioid dependence in the cardiovascular system of the spinal rat. *J Pharmacol Exp Ther* **265**: 128-133.
- Curran E, Akil H, Watson S (1996) Psychomotor stimulant-and opiate-induced c-Fos mRNA expression patterns in the rat forebrain: Comparisons between acute drug treatment and a drug challenge in sensitized animals. *Neurochem Res* **21**: 1425-1435.
- Dixon WR and Chandra A (1987) The effect of naloxone on blood catecholamine levels in conscious unrestrained morphine dependent rats. *Proc West Pharmacol Soc* **30**: 167-170.
- Duman RS, Adams DH, Simen BB (2005) Transcription factors as modulators of stress responsivity. In: Hand book of stress and the brain. Steckler T, Kalin NH, Reul JM, eds. Elsevier, Amsterdam pp 679-698.

- Dunkley P, Bobrovskaya L, Graham ME, von Nagy-Felsobuki EI, Dickson PW (2004) Tyrosine hydroxylase phosphorylation: Regulation and consequences. *J Neurochem* **91**: 1025-1043.
- Eitan S, Bryant CD, Saliminejad N, Yang YC, Vojdani E, Keith D, Polakiewicz R, Evans CJ (2003) Brain region-specific mechanisms for acute morphine-induced mitogen-activated protein kinase modulation and distinct patterns of activation during analgesic tolerance and locomotor sensitization. *J Neurosci* **23**: 8360-8369.
- Fuertes G, Laorden ML, Milanés MV (2000a) Noradrenergic and dopaminergic activity in the hypothalamic paraventricular nucleus after naloxone-induced morphine withdrawal. *Neuroendocrinology* **71**: 60-67.
- Fuertes G, Milanés MV, Rodríguez-Gago M, Marín MT, Laorden ML (2000b). Changes in hypothalamic paraventricular nucleus catecholaminergic activity after acute and chronic morphine administration. *Eur J Pharmacol* **388**: 49-56.
- Fundyus ME and Coderre TJ (1996) Chronic inhibition of intracellular  $Ca^{2+}$  release or protein kinase C activation significantly reduces the development of morphine dependence. *Eur J Pharmacol* **300**: 173-181.
- Garaulet JV, Laorden ML, Milanés MV (1994) Cross tolerance between mu-and kappa-opioid agonists in the guinea-pig ileum myenteric plexus. *J Pharmacol Exp Ther* **269**: 993-999.
- García MM, Brown HE, Harlan RE (1995) Alterations in immediate-early gene proteins in the rat forebrain induced by acute morphine injection. *Brain Res* **692**: 23-40.
- González-Cuello A, Milanés MV, Castells MT, Laorden ML (2003) Activation c-Fos expression in the heart after morphine but not U-50,488H withdrawal. *Br J Pharmacol* **138** : 626-633.
- González-Cuello A, Milanés MV, Avilés M, Laorden ML (2004a) Changes in c-Fos expression in the rat heart during morphine withdrawal. Involvement of  $\alpha_2$ -Adrenoceptors. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **370**: 17-25.
- González-Cuello A, Milanés MV, Castells MT, Laorden ML (2004b) Morphine-withdrawal induced c-Fos expression in the heart: A peripheral mechanism. *Eur J Pharmacol* **487**: 117-124.
- González-Cuello A, Milanés MV, Laorden ML (2004c) Increase of tyrosine hydroxylase levels and activity during morphine withdrawal in the heart. *Eur J Pharmacol* **506**: 119-128.

- González-Cuello A, Sánchez L, Hernández J, Castells MT, Milanés MV, Laorden ML (2007) Phosphodiesterase 4 inhibitors, rolipram and diazepam blocks the adaptive changes observed during morphine in the heart. *Eur J Pharmacol* **570**: 1-9.
- Goodman A (2008) Neurobiology of addiction. *Biochem Pharmacol* **75**: 266-322.
- Guitart X, Thompson MA, Mirante CK, Greenberg ME, Nestler EJ (1992) Regulation of cyclic AMP response element-binding protein (CREB) phosphorylation by acute and chronic morphine in the rat locus ceruleus. *Neurochem* **58**: 1168-1171.
- Haasteren GV, Li S, Muda M, Sucini S, Schlegel W (1999) Calcium signalling and genes expression. *J Recep Signal Trends Res* **19**: 481-492.
- Haycock JW (1990) Phosphorylation of tyrosine hydroxylase in situ at serine 8, 19, 31 and 40. *J Biol Chem* **265**: 682-691.
- Haycock JW and Haycock DA (1991) Tyrosine hydroxylase in rat brain dopaminergic nerve terminals. Multiple-site phosphorylation in vivo and in synaptosomes. *J Biol Chem* **266**: 5650-5657.
- Haycock JW, Ahn NG, Cobbe MH, Krebs EG (1992) ERK 1 and ERK 2, two microtubule-associated protein 2 kinases, mediate the phosphorylation of tyrosine hydroxylase at serine-31 in situ. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 2365-2369.
- Haycock JW (1993) Multiple signalling pathways in bovine chromaffin cells regulate tyrosine hydroxylase phosphorylation at Ser19, Ser31, Ser40. *Neurochem Res* **18**: 15-26.
- Hemby SE (2004). Morphine-induced alterations in gene expression of calbindin immunopositive neurons in nucleus accumbens shell and core. *Neurosci* **126**: 689-703.
- Hidaka H, Imagaki M, Kawamoto S, Sasaki V (1984) Isoquinolinesulfonamides, novel and potent inhibitors of cyclic nucleotide dependent protein kinase and protein kinase C. *Biochemistry* **23**: 5036-5041.
- Hool LC (2005) Protein kinase C isozyme selective peptides: A current view. What they tell us about localization and function of isozymes in the heart. *Curr Pharm Des* **11**: 549-559.
- Hyman S and Malenka R (2001) Addiction and the brain: The neurobiology of compulsion and its persistence. *Nat Rev Neurosci* **2**: 695-703.

- Johnson SM and Fleming WW (1989) Mechanisms of cellular adaptive sensitivity changes: Application to opioid tolerance and dependence. *Pharmacol Rev* **41**: 435-488.
- Johnson SW and North RA (1992) Opioids excite dopamine neurons by hyperpolarization of local interneurons. *J Neurosci* **12**: 483-488.
- Kauer JA and Malenka RC (2007) Synaptic plasticity and addiction. *Nature Rev* **8**: 844-858.
- Keef KD, Hume J, Zhong J (2001) Regulation of cardiac and smooth muscle Ca<sup>2+</sup> channels (cav1-2 a,b) by protein kinases. *Am J Physiol Cell Physiol* **281**: C1743-C1756.
- Kobayashi E, Nakano H, Morimoto M, Tamaoki T (1989) Calphostin C (UCN), a novel microbial compound, is a highly potent and specific inhibitor of protein kinase C. *Biochem Biophys Res Commun* **159**: 548-553.
- Koob GF and Bloom FE (1988) Cellular and molecular mechanisms of drug dependence. *Science* **242**: 715-723.
- Koob GF (1992) Neuronal mechanisms of drug reinforcement. *Ann N Y Acad Sci* **654**: 171-191.
- Koob GF, Maldonado R, Stinus L (1992) Neural substrate of opiate withdrawal. *TINS* **15**: 186-191.
- Koob GF and Le Moal M (2001) Drug abuse: Hedonic homeostatic dysregulation. *Science* **278**: 52-58.
- Kovacs K (1998) C-fos as a transcription factor: A stressful review from a functional map. *Neurochem Int* **33**: 287-297.
- Kumer SC and Vrana KE (1996) Intricate regulation of tyrosine hydroxylase activity and gene expression. *J Neurochem* **67**: 443-462.
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Laorden ML, Castells MT, Martínez MD, Martínez PJ, Milanés MV (2000a) Activation of c-Fos expression in hypothalamic nuclei by mu- and kappa-receptor agonists. Correlation with catecholaminergic activity in the hypothalamic paraventricular nucleus. *Endocrinology* **141**: 1366-1376.
- Laorden ML, Fuertes G, González-Cuello A, Milanés MV (2000b) Changes in catecholaminergic pathways innervating paraventricular nucleus and pituitary-adrenal axis response during morphine dependence:

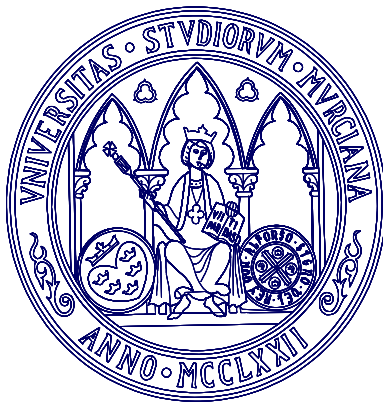
- Implication of alpha1-and alpha2-adrenoceptors. *J Pharmacol Exp Ther* **293**: 578-584.
- Laorden ML, Castells MT, Milanés MV (2002a) Effects of morphine and morphine withdrawal on brainstem neurons innervating hypothalamic nuclei that control the pituitary-adrenocortical axis in rats. *Br J Pharmacol* **136**: 67-75.
- Laorden ML, Núñez C, Almela P, Milanés MV (2002b) Morphine withdrawal-induced c-Fos expression in the hypothalamic paraventricular nucleus is dependent on the activation of catecholaminergic neurones. *J Neurochemistry* **83**: 132-140.
- Limbird LE (2004) The receptor concept: A continuing evolution. *Mol Interv* **4**: 326-366.
- Lindgren N, Goiny M, Herrera-Marschitz M, Haycock JW, Hökfelt T, Fisone G (2002) Activation of extracellular signal-regulated kinases 1 and 2 by depolarization stimulates tyrosine hydroxylase phosphorylation and dopamine synthesis in rat Brain. *Eur J Neurosci* **15**: 769-773.
- Liu JG and Anand KJ (2001) Protein kinases modulate the cellular adaptations associated with opioid tolerance and dependence. *Brain Res Brain Res Rev* **38**: 1-19.
- Lonze BE and Ginty DD (2002) Function and regulation of CREB family transcription factors in the nervous system. *Neuron* **35**: 605-623.
- Mackenzie FR and Milligan G (1990) Delta-opioid receptor mediated inhibition of adenylate cyclase is transduced specifically by the guanine-nucleotide-binding protein Gi/o. *Biochem J* **267**: 391-398.
- Maldonado R, Blendy JA, Tzavara E, Gass P, Roques BP, Haoune J, Schütz G (1996) Reduction of morphine abstinence in mice with a mutation in the gene encoding CREB. *Science* **273**: 657-659.
- Maldonado R (1997) Participation of noradrenergic pathways in the expression of opiate withdrawal: Biochemical and pharmacological evidence. *Neurosci Biobehav Rev* **1**: 91-104.
- Martínez MD, Milanés MV, Laorden ML (2003) Implication of the signal transduction pathways in the enhancement of noradrenaline turnover induced by morphine withdrawal in the heart. *Eur J Pharmacol* **471**: 113-119.
- Mazzucchelli C, Vantaggiato C, Ciamei A, Fasano S, Pakhotin P, Krezel W, Welzl H, Wolfer DP, Pages G, Valverde O, Marowsky A, Porrazzo A, Orban PC, Maldonado R, Ehrenguber MU, Cestari V, Lipp HP,

- Chapman PF, Pouyssegur J, Brambilla R (2002) Knockout of ERK1 MAP kinase enhances synaptic plasticity in the striatum and facilitates striatal-mediated learning and memory. *Neuron* **34**: 807-820.
- Milanés MV, Laorden ML, Chapleur-Chateau M, Burlet A (1998) Alterations in corticotropin-releasing factor and vasopressin content in rat brain during morphine withdrawal. Correlation with hypothalamic noradrenergic activity and pituitary-adrenal response. *J Pharmacol Exp Ther* **285**: 700-706.
- Milanés MV, Fuente T, Marín MT, Laorden ML (1999) Catecholaminergic activity and 3', 5'-cyclic adenosine monophosphate concentration in the right ventricle after acute and chronic morphine administration in the rat. *Br J Anaesth* **83**: 784-788.
- Milanés MV and Laorden M L (2000) Changes in catecholaminergic pathways innervating the rat heart ventricle during morphine dependence. Involvement of  $\alpha_1$  and  $\alpha_2$  adrenoreceptors. *Eur J Pharmacol* **397**: 311-318.
- Milanés MV, Fuente T, Laorden ML (2000) Catecholaminergic activity and 3',5'-cyclic adenosine monophosphate levels in heart right ventricle after naloxone induced withdrawal. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **361**: 61-66.
- Milanés MV, Martínez MD, González-Cuello A, Laorden ML (2001) Evidence for a peripheral mechanism in cardiac opioid withdrawal. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **364**: 193-198.
- Monje P, Hernández-Losa J, Lyons RJ, Castellone MD, Gutkind JS (2005) Regulation of the transcriptional activity of c-Fos y ERK: A novel role for the prolyl isomerase Pin1. *J Biol Chem* **280**: 35081-35084.
- Morgan JI and Curran T (1991) Stimulus transcription coupling in the nervous system: Involvement of the inducible proto-oncogenes Fos and Jun. *Ann Rev Neurosci* **14**: 421-451.
- Narita M, Makimura M, Feng Y, Hoskins B, Ho IK (1994) Influence of chronic morphine treatment on protein kinase C activity: Comparison with butorphanol and implication for opioid tolerance. *Brain Res* **650**: 175-179.
- Narita M, Ioka M, Suzuki M, Suzuki T (2002) Effect of repeated administration of morphine on the activity of extracellular signal regulated kinase in the mouse brain. *Neurosci Lett* **324**: 97-100.
- Nestler EJ (1992) Molecular mechanisms of drug addiction. *J Neurosci* **12**: 2439-2450.



- Nestler EJ, Hope BT, Widnell KL (1993) Drug addiction: A model for molecular basis of neural plasticity. *Neuron* **11**: 995-1006.
- Nestler E, Greengard P (1994) Protein phosphorylation and the regulation of neuronal function in basic neurochemistry: Molecular, cellular and medical aspects. Siegel G ed. Raven Press, New York. Pp 449-474.
- Nestler E (1996) Under siege: The brain on opiates. *Neuron* **16**: 897-900.
- Nestler EJ and Aghajanian CK (1997) Molecular and cellular basis of addiction. *Science* **278**: 58-63.
- Nestler EJ (2000) Genes and addiction. *Nature Genetics* **26**: 277-281.
- Nestler E (2001) Molecular basis of long-term plasticity underlying addiction. *Nat Rev Neurosci* **2**: 119-128.
- Nestler EJ (2004) Molecular mechanisms of drug addiction. *Neuropharmacology* **47**: 24-32.
- Nishizuka Y (1995) Protein kinase C and lipid signalling for sustained cellular responses. *FASEB J* **9**:484-496.
- Noble F and Cox BM (1996) Differential desensitization of mu- and delta-opioid receptors in selected neural pathways following chronic morphine treatment. *Br J Pharmacol* **117**: 161-169.
- Núñez C, Laorden ML, Milanés MV (2007) Regulation of serine (Ser)-31 and ser40 tyrosine hydroxylase phosphorylation during morphine withdrawal in the hypothalamic paraventricular nucleus and nucleus Tractus Solitarius-A2 Cell Group: Role of ERK 1/2. *Endocrinology* **148**: 5780-5793.
- Pepe S, Xiao RP, Hohl CH, Altschuld R, Lakatta EG (1997) Cross-talk between opioid peptide and adrenergic receptor signalling in isolated rat heart. *Circulation* **95**: 2122-2129.
- Pozzi L, Häkansson K, Usiello A, Borgkvist A, Lindskog M, Greengard P, Fisone G (2003) Opposite regulation by typical and atypical antipsychotics of ERK1/2, CREB and Elk-1 phosphorylation in mouse dorsal striatum. *J Neurochem* **86**: 451-459.
- Prather PL, Tsai AW, Law PY (1994) Mu and delta opioid receptor desensitization in undifferentiated human neuroblastoma SHSYSY cells. *J Pharmacol Exp Ther* **270**: 177-184.
- Rabadán JV, Milanés MV, Laorden ML (1997) Effects of chronic morphine treatment on catecholamines content and mechanical response in the rat heart. *J Pharmacol Exp Ther* **280**: 32-37.

- Rabadán JV, Milanés MV, Laorden ML (1998) Changes in right atria catecholamines content in naive rats and after naloxone-induced withdrawal. *Br J Anaesth* **80**: 354-359.
- Reina M (2001) Métodos de transferencia a filtros. Prácticas de Biología Celular. Facultades de Bioquímica y Biología. Universidad de Barcelona.
- Ren X, Noda Y, Mamiya T, Nagai T, Nabeshima T (2004) A neuroactive steroid, dehydroepiandrosterone sulfate, prevents the development of morphine dependence and tolerance via c-Fos expression linked to the extracellular signal-regulated protein kinase. *Beh Brain Res* **152**: 243-250.
- Schulz S, Höllt V (1998). Opioid withdrawal activates MAP kinase in locus coeruleus neurons in morphine-dependent rats in vivo. *Eur J Neurosci* **10**: 1196-1201.
- Self DW and Nestler EJ (1995) Molecular mechanisms of drug reinforcement and addiction. *Ann Rev Neurosci* **18**: 463-495.
- Selley DE, Nestler EJ, Breivogel CS, Childers SL (1997) Opioid-receptor coupled G-proteins in rat locus coeruleus membranes: Decrease in activity after chronic morphine treatment. *Brain Res* **746**: 10-18.
- Sheng M and Greenberg ME (1990) The regulation and function of c-fos and other immediate early genes in the nervous system. *Neuron* **4**: 477-485.
- Smart D and Lambert DG (1996) The stimulatory effects of opioids and their possible role in the development of tolerance. *Trends in Pharmacol Sci* **17**: 264-269.
- Tokuyama S, Feng Y, Wakabayashi H, Ho IK (1995) Possible involvement of protein kinases in physical dependence on opioids: Studies using protein kinase inhibitors, H-7 and H-8. *Eur J Pharmacol* **284**: 101-107.
- Vargas ML, Martínez-Piñero MG, Milanés MV (1997) Neurochemical activity of noradrenergic neurons and pituitary-adrenal response after naloxone-induced withdrawal: The role of calcium channels. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **355**: 501-506.
- Waltereit R and Weller M (2003) Signalling from cAMP/PKA to MAPK and synaptic plasticity. *Mol Neurobiol* **27**: 99-106.
- Wiechelmann KJ, Braund RD, Fitzpatrick JD (1988) Investigation of the bicinchoninic acid protein assay: Identification of the groups responsible for colour formation. *Anal Biochem* **175**: 231-237.



# *IX - RESUMEN EN INGLÉS*



**UNIVERSIDAD DE MURCIA**

**Facultad de Medicina**

**Departamento de Farmacología**



**Involvement of different intracellular signalling pathways in the adaptive changes observed during morphine dependence**

**Resumen en inglés de la memoria presentada para optar al grado de doctor con “Mención de Doctorado Europeo”**

**PILAR ALMELA ROJO  
2008**

## **IX.1- INTRODUCTION**

### **IX.1.1- Neurobiology of addiction**

Drug addiction is a chronic neurobiological disease produced by repeated exposure to an addictive drug and characterized by loss of control over drug use (Koob and Le Moal, 2001; Nestler, 2004). Neuronal pathways that form the so-called “reward circuits” play a central role in compulsive drug taking and addiction and are found within mesocorticolimbic dopamine systems originating in the ventral tegmental area and projecting to the nucleus accumbens, amygdala, and prefrontal cortex (Nestler, 2001).

Complex neuroadaptations do not come about simply because of continued drug use, but as a result of complex interactions between drugs themselves and the circumstances in which they are taken. Thus, in vulnerable individuals, interaction between the drugs themselves and genetic, environmental, psychosocial, behavioral, etc., produces long-lived adaptations in selected groups of neurons in the brain which explain the enduring effects of addiction.

Opioids are known to be intensely addictive. The cellular distribution of opioid receptors in neurons seems to be largely along the plasma membrane, both at somata as well as dendrites and nerve terminals. Activation of opioid receptors produces common cellular actions such as a changes in: transmitter release, ionic conductance, phosphorylation state of proteins and gene expression.

All addictive drugs act on the mesocorticolimbic dopamine systems through different mechanisms. Specifically, opioids induce dopamine release indirectly by decreasing GABA-inhibition via  $\mu$ -opioid receptors in

the ventral tegmental area (Johnson and North, 1992; Bonci and Williams, 1997; Cami and Farre, 2003), as well as directly by interacting with opioid receptors in the nucleus accumbens (Nestler, 1996; Hyman and Malenka, 2001).

Activation of reward circuits by addictive drugs produces a marked dopamine release that causes euphoria and reinforcement of drug-seeking behaviours.

Adaptive changes induced by addictive drugs occur not only in the central nervous system but also in the peripheral nervous system and, specifically, in cardiac tissue. Opioid peptides are known to be involved in the control of cardiac function through reflex mechanisms involving the central nervous system, or by modulation of neurotransmitter release from neurons located within the heart.

### **IX.1.2- Mechanisms involved in tolerance/dependence to opioids**

Opioids are the most potent analgesic drugs used not only for pain relief but also for treatment of diarrhoea or cough. However, their prolonged administration for chronic pain produces tolerance to the analgesic effects and dependence, and thus limiting their therapeutical potential.

Opioids tolerance is manifest as a need for increasing doses to achieve the same effect. A withdrawal syndrome appears after drug consumption cessation or after an opioid antagonist administration.

Although the cellular and molecular mechanisms involved in tolerance/dependence to opioids are not well established, those processes

represent adaptive phenomena that try to compensate the chronic activation of opioid receptors (Koob and Bloom, 1988; Johnson and Fleming, 1989; Self and Nestler, 1995).

Different mechanisms are proposed:

#### **IX.1.2.1- Neurochemical mechanisms**

Chronic opioid treatment produces several adaptive changes in different transduction signals that lead to changes in the sensitivity of central nervous system neurons to neurotransmitters, changes that play an important role in the acquisition and maintenance of dependence (Nestler, 1992, 2000; Nestler et al., 1993).

Although there are a lot of studies about the involvement of catecholaminergic pathways in the tolerance/dependence to opioids in the central nervous system, the adaptive changes that occur at heart level have been less studied. Several studies of this laboratory showed a decrease in the DOPAC/dopamine turnover after an acute injection of morphine while chronic treatment with this opioid induced an enhancement of this turnover, in right and left atria (Rabadán et al., 1997).

Previous studies (Dixon and Chandra, 1987; Chang and Dixon, 1990; Cruz and Villarreal, 1993) have demonstrated an enhancement in plasmatic noradrenaline and dopamine levels during morphine withdrawal, in parallel with an increase in the force and rate of contraction in cardiac tissues. Furthermore, different studies of this laboratory have shown an enhancement in the normetanephrine/noradrenaline and DOPAC/dopamine turnover in different cardiac tissues (Rabadán et al., 1998; Milanés and Laorden, 2000).

One of the most consistent biochemical changes in response to morphine exposure is an up-regulation of tyrosine hydroxylase (TH: the rate-limiting enzyme in the synthesis of catecholamines) which is evident after naloxone administration in several brain areas (Boundy et al., 1998; Nestler and Aghajanian, 1997). TH activity can be modulated by two mechanisms: medium to long-term regulation of gene expression (transcriptional regulation) and short-term regulation of enzyme activity (phosphorylation) (Kumer and Vrana, 1996). TH can be phosphorylated at serine residues 8, 19, 31 and 40 by a variety of protein kinases (Dunkley et al., 2004). TH is phosphorylated at serine 19 by CaMK, at serine 40 by PKA and PKC, at serine 31 by ERK<sub>1/2</sub> and at serine 8 by PDPK.

Different studies have shown that chronic exposure to opioids leads to an enhancement of TH in the locus ceruleus and in the ventral tegmental area (Nestler and Aghajanian, 1997). This up-regulation of TH would be expected to increase the capacity of those neurons to synthesize noradrenaline or dopamine, which could contribute to the increase in the release of these neurotransmitters in those regions during morphine withdrawal (Koob et al., Nestler et al., 1993).

Recent results from this laboratory have shown an increase in TH activity in the heart in rats withdrawn from morphine, concomitantly with an increase in TH levels in the right and left ventricle (González-Cuello et al., 2004c). These changes could contribute to the noradrenergic hiperactivity observed at heart level during morphine withdrawal.

#### **IX.1.2.2- Receptorial mechanisms**

A lot of work has been dedicated to identify the molecular mechanisms of tolerance and now it is well admitted that opioid receptor desensitization, that is defined as a decrease of receptor signalling after sustained agonist activation, is closely connected to this phenomenon.



Two kinds of desensitization can be described: homologous (Prather et al., 1994) and heterologous (Noble and Cox, 1996).

Homologous desensitization involves phosphorylation of the agonist activated-receptor by the GRK family. Once phosphorylated, the receptor is uncoupled from its G protein and then internalized by  $\beta$ -arrestins in clathrin-coated pits. In the case of heterologous desensitization, agonist-activated and non-activated receptors are phosphorylated by second messengers-dependent kinases.

### **IX.1.2.3- Post-receptorial mechanisms**

Among the adaptive changes that occur at post-receptorial level, we can mention: changes in adenylylase or phospholipase C activity; changes in the content and flux of calcium; and changes in genetic expression through modifications in transcription factors.

Alterations in PKA pathway have been suggested as one of the molecular mechanisms of opioid tolerance and dependence (Nestler and Aghajanian, 1997). Different studies performed in the central and peripheral nervous system have shown that acute activation of the opioid receptor induces an inhibition of the adenylylase and guanylylase and, consequently, a decrease in cAMP and cGMP content (Mackenzie and Milligan, 1990; Pepe et al., 1997). However, chronic opioid treatment produces a compensatory enhancement in cAMP and cGMP content (Guitart et al., 1992; Nestler et al., 1993; Maldonado et al., 1996; Selley et al., 1997; Milanés et al., 1999), indicating an activation of PKA pathway. In this sense, this laboratory demonstrated an elevation of cAMP concentration in right ventricle in rats withdrawn from morphine (Milanés et al., 2000). All these results suggest that alterations in PKA pathway

could be one of the molecular mechanisms of opioid tolerance and dependence.

More recently, several studies have demonstrated that PKC is an important modulator of opioid signalling and that it plays a critical role in the process of tolerance/dependence (Liu and Anand, 2001; Fundytus and Coderre, 1996). In addition, PKC has been considered to play a crucial role in signal transduction and to control numerous signalling cascades through its ability to phosphorylate target proteins (Nishizuka, 1995). Recent results from this laboratory (Benavides et al., 2005) showed that administration of an inhibitor of PKC, calphostin C, concomitantly with morphine, produced a decrease in c-Fos expression that was observed during morphine withdrawal in the paraventricular nucleus and nucleus tractus solitarius/ventrolateral medulla and also, TH levels were modified. In addition, another study demonstrated that protein levels of PKC $\gamma$  and PKC $\xi$  were significantly up-regulated in the right and left ventricle after naloxone- induced withdrawal. By contrast, morphine withdrawal induced down-regulation of PKC $\alpha$  (Cerezo et al., 2005). Since PKC has been reported to be involved in morphine dependence, it is possible that activation of this kinase may be part of the long-term intracellular mechanisms that underlie opioid dependence.

ERK, members of the MAPK family, transduce a broad range of extracellular stimuli into diverse intracellular responses and are involved in various processes in the central nervous system, including drug addiction (Berhow et al., 1996; Eitan et al., 2003; Mazzucchelli et al., 2002). The ERK pathway is among numerous signal transduction pathways that could alter gene expression in distinct brain regions in response to repeated opioid exposure. Recently, several studies have shown that this pathway contributes to naloxone-precipitated withdrawal in morphine-dependent rats (Ren et al., 2004; Cao et al., 2005). Although the involvement of ERK in morphine dependence has been reported, no

data are available on the characteristic and functional disturbances of ERK in the heart after chronic treatment and upon drug withdrawal.

Nowadays, it is well known that PKA regulates a lot of cellular processes by phosphorylating proteins, including transcription factors (Schulz and Höllt, 1998). CREB and Fos are two of the best characterised families of transcription factors. Chronic opioid administration induces alterations in CREB through the cAMP/PKA pathway, which has been reported to be involved in the expression of opioid dependence (Nestler and Aghajanian 1997; Blendy and Maldonado, 1998). CREB could regulate other immediate-early genes expression such as c-fos because this gene contains the sequence CRE in its promoter site (Sheng and Greenberg, 1990). Several studies made in the central nervous system showed that acute administration of morphine induces c-Fos expression in different brain areas (Chang and Harlan, 1990; García et al., 1995; Laorden et al., 2000) while chronic administration leads to a decrease in the cellular response to morphine (a decrease in c-Fos levels) (Hemby, 2005; Laorden et al., 2002b).

There are other transcription factors like SRF and p62 that can be phosphorylated by different protein kinases (CaMK, MAPK PKA, PKC) and thus induce c-Fos expression (Bian et al., 1998; Haasteren et al., 1999; Kovacs, 1998). Previous studies of this laboratory have shown an increase in c-Fos expression in the heart during morphine withdrawal (González-Cuello et al., 2003). Then, chronic opioid administration could lead to long-term adaptive changes, including changes in gene expression in the central and peripheral nervous system.

## **IX.2- AIMS**

The main aim of this work was to study the possible involvement of different protein kinases pathways in the cardiac changes (noradrenergic hiperactivity, c-Fos expression, etc.) produced after naloxone administration to rats dependent on morphine.

The specific aims were:

**1-** To check and establish some of the neurochemical, cellular and molecular pathways that are activated during morphine dependence. For this purpose:

- a) We measured TH activity.
- b) We studied the possible changes in TH expression and in its phosphorylation, and activation, in serine 40 and 31.
- c) We evaluated changes in PKA, c-Fos, phosphorylated CREB, total ERK and phosphorylated ERK.

Once checked and established the cardiac changes that occur during morphine withdrawal, our next aims studied different mechanisms involved in these changes.

**2-** To study the possible involvement of different signal transduction pathways (PKA, PKC) in the noradrenergic hyperactivity observed during morphine withdrawal. To this end, inhibitors of PKA (HA-1004) and PKC (calphostin C) were administered.

**3-** We evaluated non-phosphorylated TH and TH phosphorylated at serine 40 in the presence of HA-1004 and calphostin C. We also studied

TH phosphorylated at serine 40 in rats treated with HA-1004, concomitantly with morphine.

**4-** To investigate whether the pharmacological inhibition of PKA and PKC would block c-Fos expression during morphine withdrawal.

**5-** To investigate if the activation of ERK during morphine withdrawal induces c-Fos and TH phosphorylated at serine 31 expression. For this purpose, we used SL-327, a drug that prevents ERK activation.

## **IX.3- MATERIAL AND METHODS**

### **IX.3.1- Animals**

Male Sprague-Dawley rats (220-240 g at the beginning of the experiments) were housed under a 12-h light/dark cycle (light: 8:00-20:00 h) in a room with controlled temperature ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ), humidity ( $50 \pm 10\%$ ), food and water available *ad libitum*. All surgical and experimental procedures were performed in accordance with the European Communities Council Directive of 24 November 1986 (86/609/EEC) and the local Committee.

### **IX.3.2- Experimental procedure**

Rats were rendered tolerant/dependent on morphine by s.c. implantation of morphine base pellets (75 mg), one on day 1, two on day 3 and three on day 5, under light ether anaesthesia. Control animals were implanted with placebo pellets containing lactose instead of morphine, on the same time schedule. On day 8, the animals pretreated with morphine or placebo pellets were injected with saline s.c. or naloxone (2 mg/kg s.c.). The weight gain of the rats was checked during treatment to ensure that

the morphine was liberated correctly from the pellets because it is known that chronic morphine treatment induces a decrease in body weight gain due to lower caloric intake (Berhow *et al.*, 1995). In addition, body weight loss was determined as the difference between the weight determined immediately before saline or naloxone injection and a second determination made 60 and 90 min later. Moreover, it was observed if the animals undergoing morphine withdrawal displayed characteristic abstinence symptoms like: wet-dog shakes, teeth chattering, ptosis, tremor, piloerection, lacrimation, rhinorrhea, chromodiacryorrhea and spontaneous jumping.

In order to determine the effects of PKA and PKC on the morphine withdrawal-induced adaptive changes, animals were continuously infused with HA-1004 (40 nmol/day), a PKA selective inhibitor (Hidaka *et al.*, 1984); calphostin C (40 pmol/day), a PKC selective inhibitor (Kobayashi *et al.*, 1989), or MilliQ-water (vehicle), for 7 days, via s.c. osmotic minipumps (Alzet mod. 2001), which deliver at 1 $\mu$ L/h (Alza, USA). Minipumps were implanted simultaneously with the chronic morphine or placebo pellets and were primed for 5 h before implantation at 37°C in sterile saline in order to obtain an optimal flow rate.

SL-327, a selective inhibitor of mitogen-activated extracellular protein kinase (MEK) (Atkins *et al.*, 1998) was administered on day 8, 1h before the injection of naloxone or saline. This inhibitor was dissolved in DMSO 100% and injected intraperitoneally at doses of 50 and 100 mg/kg. On the basis of our previous experiments, the 100 mg/kg dose was chosen for our experiments.

### **IX.3.2.1- Experimental groups**

- ◆ placebo s.c./7 days + saline s.c.

- ◆ placebo/7 days + naloxone s.c.
- ◆ morphine s.c./7 days + saline s.c.
- ◆ morphine s.c./7 days + naloxone s.c.
- ◆ placebo s.c./7 days + MilliQ-water (vehicle) s.c. + saline s.c.
- ◆ placebo s.c./7 days + MilliQ-water (vehicle) s.c. + naloxone s.c.
- ◆ morphine s.c./7 days + MilliQ-water (vehicle) s.c. + saline s.c.
- ◆ morphine s.c./7 days + MilliQ-water (vehicle) s.c. + naloxone s.c.
- ◆ placebo s.c./7 days + HA-1004 s.c. + saline s.c.
- ◆ placebo/7 days + HA-1004 s.c. + naloxone s.c.
- ◆ morphine/7 days + HA-1004 s.c. + saline s.c.
- ◆ morphine/7 days + HA-1004 s.c. + naloxone s.c.
- ◆ placebo/7 days + calphostin C s.c. + saline s.c.
- ◆ placebo/7 days + calphostin C s.c. + naloxone s.c.
- ◆ morphine/7 days + calphostin C s.c. + saline s.c.
- ◆ morphine/7 days + calphostin C s.c. + naloxone s.c.
- ◆ placebo/7 days + DMSO i.p. + saline s.c.
- ◆ placebo/7 days + DMSO i.p. + naloxone s.c.
- ◆ morphine/7 days + DMSO i.p. + naloxone s.c.
- ◆ placebo/7 days + SL-327 i.p. + saline s.c.
- ◆ placebo/7 days + SL-327 i.p. + naloxone s.c.
- ◆ morphine/7 days + SL-327 i.p. + naloxone s.c.

### **IX.3.3- High-performance liquid chromatography (HPLC)**

Rats were decapitated 60 or 90 min after saline s.c. or naloxone (2 mg/kg s.c.), the chest was opened with a midsternal incision and the right and left ventricle were dissected and stored immediately at -80°C. NA and its metabolite normetanephrine were determined by HPLC with electrochemical detection. Each tissue was weighed, placed in a dry-cooled propylene vial and homogenized with a Polytron-Type homogenizer

(Kinematica, Switzerland; speed 3-4) in 1.5 ml perchloric acid (0.1 M)-EDTA (2.7 mM). The homogenates were then centrifuged (20000 rpm, 4°C, 15 min), the supernatant layer was removed into a 1-ml syringe and filtered through a 0.45 µm filter (Millipore, USA) and centrifuged (15000 rpm, 4°C, 20 min) again through Ultra free MC 0.2 (Millipore). From each sample, 10 µl was injected into a 5-µm C<sub>18</sub> reverse phase column (Waters, USA) through a Rheodyne syringe-loading injector 200 µl loop. Electrochemical detection was accomplished with a glass carbon electrode set at a potential of +0.65 with respect to the Ag/AgCl reference electrode (Waters). The mobile phase consisted of a 95% (v/v) mixture of water and methanol with sodium acetate (50 mM), citric acid (20 mM), L-octyl-sodium sulfonate (3.75 mM), di-n-butylamine (1 mM) and EDTA (0.135 mM), adjusted to pH 4.3. The flow rate was 0.9 ml/min, and chromatographic data were analysed with Millennium 2010 Chromatography Manager Equipment (Millipore). NA and normetanephrine were simultaneously detected by the described HPLC method at an elution time of 4.25 and 7.32 min, respectively. NA and normetanephrine were quantified by reference to calibration curves run at the beginning and at the end of each series of assays. Linear relationships were observed between the amount of standard injected and the peak height measured. The content of NA and normetanephrine in the right and left ventricle was expressed as nanogram per gram of tissue weight.

### **IX.3.4- Immunohistochemistry**

Rats were sacrificed with an overdose of pentobarbital (100 mg/kg, i.p.) 90 min after naloxone or saline administration. Following anaesthesia, rats were perfused through the descending aorta with 300 ml of phosphate buffered saline (PBS; pH 7.4) followed by 500 ml of cold, 4% paraformaldehyde in PBS. Following perfusion, hearts were removed, postfixed in the same fixative and stored at 4°C overnight. The samples were then processed routinely and embedded in paraffin wax. The sections



(5  $\mu\text{m}$  thick) were obtained on a microtome (HM310, Microm, Spain) and were immunostained. The sections were desparaffined in xylene and hydrated in a graded ethanol series. Endogenous peroxidase activity was destroyed by 30 min treatment with 0.3% hydrogen peroxide in PBS. Sections were washed in three 5-min changes of PBS and treated with NSS-PBS (PBS containing 1% normal swine serum and 0.5% Triton X-100) for 30 min. All sections were incubated in the primary polyclonal anti-(c-Fos) (1:3000 dilution; sc-52, Santa Cruz, USA) for 36 h at 4°C or primary monoclonal anti-(p-ERK<sub>1/2</sub>) (1:1500 dilution; sc-7383, Santa Cruz), for 24 h at 4°C. Then the bound primary antibody was localized by biotinylated anti-rabbit IgG (1:200 dilution in NSS-PBS, Vector, USA) for c-Fos and biotinylated anti-mouse IgG (1:400 dilution) for p-ERK<sub>1/2</sub> and subsequently with the avidin-biotin complex at room temperature for 1 h each. Visualization of antigen-antibody reaction sites used 0.033% 3',3'-diaminobenzidine (DAB) and 0.014% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in 0.05 M Tris-HCl buffer for 7 min. The reaction was stopped in PBS. Immunoreactivity was measured by an optic microscopy (DMLB, Leica, Spain).

### **IX.3.5- Western blot**

Animals were killed by decapitation 60 (for phosphorylated ERK, total ERK, total TH, TH phosphorylated at serine 40 and 31) or 90 min (for c-Fos, non-phosphorylated TH, PKA, phosphorylated CREB, total TH, phosphorylated ERK, total ERK, TH phosphorylated at serine 40 and 31) after administration of naloxone or saline. The hearts were rapidly removed, and the right and left ventricles were dissected, fresh-frozen, and stored immediately at -80°C until use. Samples were placed in homogenization buffer [PBS, 2 % sodium dodecylsulfate (SDS) plus protease and phosphatase inhibitors], and homogenized for 30-40 s prior to centrifugation at 15000 rpm for 10 min at 4°C. Total protein concentrations were determined spectrophotometrically using the bicinchoninic acid

method (Wiechelman *et al.*, 1988). The optimal amount of protein to be loaded was determined in preliminary experiments by loading gels with increasing protein contents (25 to 100 µg) from samples of each experimental group. Equal amounts of protein (50 µg/lane) from each sample were loaded on a 10% SDS-polyacrilamide gel (SDS-PAGE), electrophoresed, and transferred onto poly vinylidene difluoride (PVDF) membrane. Non-specific binding of antibodies was prevented by incubating membranes in 1% bovine serum albumin (BSA) in tris buffer saline tween (TBST: 10 mM Tris-HCl, pH 7.6, 150 mM NaCl, 0.05% Tween 20). The blots were incubated overnight at 4°C with the primary antibodies in TBST with BSA. After extensive washings with TBST, the membranes were incubated for 1h, at room temperature, with peroxidase-labeled secondary antibodies at 1:5000 dilution. After washing, immunoreactivity was detected with an enhanced chemiluminescence western blot detection system (ECL, Amersham, UK) and visualised by Amersham Hyperfilm-ECL. Antibodies were stripped from the blots by incubation with stripping buffer (glycine 25mM and SDS 1%) pH2, for 1h at 37°C. Blots were subsequently reblocked and probed with 1:8000 anti-actin (monoclonal 5C5, Sigma, USA) or 1:1000 anti-Beta actin (Cell Signalling, USA). Quantification of immunoreactivity corresponding to bands was carried out by densitometry. The integrated optical density of the bands was carried normalised to the background values. Relative variations between the bands of the experimental samples and the control samples were calculated in the same image.

### **IX.3.6- Measurement of TH activity**

Ninety min after saline or naloxone injection to placebo- or morphine-pelleted animals, rats were killed by decapitation, the heart removed and the right and left ventricles were dissected, fresh-frozen and stored immediately at -80°C until use. TH catalyzes the hydroxylation of tyrosine

to generate L-DOPA and water using tetrahydropterine as a cofactor. TH activity is measured by quantifying tritiated water production from 3,5-<sup>[3H]</sup>L-tyrosine. Right or left ventricle samples were placed in homogenization buffer and homogenized prior to centrifugation at 10000 rpm for 10 min at 4°C. 25 µl of the supernatants were incubated at 37° C in a final volume of 50 µl of a reaction mixture containing the following components: 0.2 M Tris HCl (pH, 7), 1 mM tetrahydrobiopterin, 10 mM β-mercapto-ethanol, 0.02 % catalase, 50 µM isotopically diluted L-[3,5-<sup>3H</sup>] tyrosine. For the blank reaction, samples were replaced by sodium orthovanadate. After 4 h of incubation, the reaction was stopped by the addition of 1% trichloroacetic acid and the radioactive organic compounds were separated from tritiated water by absorption onto activated charcoal. After centrifugation (12000 rpm, 4°C, 5 min), tritiated water was quantified in the supernatant by scintillation counting in a Wallac 1409 liquid scintillation counter. The assays were performed in duplicate.

### **IX.3.7- Statistical analysis**

The results are expressed as the mean±S.E.M. Data were analysed by analysis of variance (ANOVA) followed by the Newman-Keuls post-hoc test. One way ANOVA followed by Dunett's multiple comparison test or unpaired Student's *t*-test were used when required. Differences with a *p* value less than 0.05 were considered significant.

## **IX.4- RESULTS**

Before performing the immunodetection assays, we assessed the efficacy of chronic treatment with implanted morphine pellets, which has been previously shown to induce tolerance and dependence to the effects of morphine (Martínez et al., 2003; González-Cuello et al., 2004a). For this

purpose, the weight of the animals was recorded on the day of pellet implantation and on the day of killing (day 8), before receiving any injections. Rats treated with morphine showed a significantly lower body weight gain than that observed in animals receiving placebo pellets. Administration of naloxone to control rats resulted in no significant changes in body weight when measured 60 or 90 min after drug injection, as compared to control rats receiving saline. However, and in agreement with our previous results (Laorden et al., 2002a), chronically morphine-treated animals showed a significant weight loss 60 or 90 min after naloxone injection, when compared with placebo-pelleted group also receiving naloxone (article 3, figure 1). All the animals undergoing morphine withdrawal displayed characteristic abstinence symptoms: wet-dog shakes, teeth chattering, ptosis, tremor, piloerection, lacrimation, rhinorrhea, chromodiacryorrhea and spontaneous jumping. The injection of naloxone in rats pretreated with HA-1004, calphostin C or SL-327 induced a weight loss similar to that described in the group chronically pretreated with vehicle plus morphine. In addition, these inhibitors did not significantly modify the abstinence symptoms observed after naloxone administration to rats chronically treated with morphine pellets.

#### **IX.4.1- Cellular and molecular mechanisms during morphine withdrawal**

##### **a) Evaluation of NA turnover and TH activity during morphine withdrawal**

In agreement with our previous investigations (Martínez et al., 2003; González-Cuello et al., 2004c), the present study shows that 60 or 90 min after the administration of naloxone to morphine-dependent rats induced an increase ( $p < 0.001$ ) of NA turnover in the right and left ventricle when compared with dependent rats receiving saline instead of naloxone or

naive rats injected with naloxone (article 1, figure 1; article 2, figure 3; article 4, figure 1).

In parallel with the increase of NA turnover, our results show that TH activity was significantly augmented during morphine withdrawal compared with the placebo group receiving naloxone ( $p < 0.001$ ) (article 4, figure 7).

### **b) Changes in TH and TH phosphorylated at serine 40 and 31 during morphine withdrawal**

Since TH is one of the most robust findings in different areas with chronic morphine exposure, we studied TH protein levels by western blot analysis in the left and right ventricle. Non-phosphorylated TH immunoreactivity was elevated ( $p < 0.01$ ) in both ventricles 90 min after naloxone injection to morphine-dependent rats compared with the control group receiving naloxone, or the dependent group receiving saline instead of naloxone (article 1, figure 2; article 2, figure 4). Total TH immunoreactivity was elevated in the right ( $p < 0.01$ ) and left ( $p < 0.05$ ) ventricle 60 or 90 min after naloxone injection to morphine-dependent rats compared with the control group receiving naloxone or the dependent group receiving saline instead of naloxone (article 2, figure 4; article 4, figures 2 and 3).

Additional experiments were performed in the right and left ventricle to determine whether naloxone-induced morphine withdrawal would activate phosphorylation of TH at serine 40. These experiments demonstrated that rats chronically treated with morphine and given naloxone showed significant increases in TH phosphorylated at serine 40 in the right ( $p < 0.05$ ) and left ( $p < 0.05$ ) ventricle 60 or 90 min after the opioid antagonist injection compared with the corresponding control group

receiving naloxone and with the morphine-dependent animals receiving saline (article 4, figure 4).

We also studied the phosphorylation of TH at serine 31 at different time point. 60 min after naloxone-precipitated morphine withdrawal, there were not changes in the levels of TH phosphorylated at serine 31 in the right or left ventricle. However, rats chronically treated with morphine and given naloxone showed significant increases in this phosphorylated protein in the right and left ventricles 90 min after the opioid antagonist injection compared with the corresponding control group receiving naloxone (right ventricle:  $p < 0.05$ , left:  $p < 0.01$ ) and with the morphine dependent animals receiving saline ( $p < 0.05$ ) (article 4, figure 5).

### **c) Evaluation of changes in c-Fos, PKA, p-CREB, total ERK and p-ERK<sub>1/2</sub> expression during morphine withdrawal**

One of the molecular effects of many drugs of abuse is activation of expression of immediate-early genes such as c-fos. The transcription factor c-Fos has been shown to be altered in several brain areas after morphine withdrawal (Curran et al., 1996; Laorden et al., 2002) and has been widely used as an indicator of cellular activity (Morgan and Curran, 1991). Cardiac cells have excitation-depolarization characteristics similar to those of neuronal cells, suggesting that the immediate-early genes may be markers for monitoring cardiac activity.

In this study, c-Fos immunoreactivity was examined by western blot and immunohistochemistry. Western blot analysis showed that, 90 min after the injection of naloxone to rats chronically treated with morphine, there was a significant ( $p < 0.001$ ) induction of c-Fos immunoreactivity in the right and left ventricle when compared with the control group injected with the opioid antagonist (article 1, figure 3; article 2, figure 5; article 3,

figure 6). Immunohistochemical analysis corroborated these results (article 1, figure 3; article 2, figure 5; article 3, figure 6).

The influence of morphine dependence and withdrawal on the immunoreactivity of PKA was examined by western blot analysis. Our results showed that there was an induction of PKA catalytic subunit ( $p < 0.05$ ) in the right and left ventricle 90 min after naloxone administration to morphine-dependent rats when compared with the group treated with morphine and saline or the placebo group injected with saline (article 2, figure 1).

Regarding the changes in phosphorylated CREB, the present study shows a significant ( $p < 0.001$ ) increase of this transcription factor levels in the right and left ventricle versus the placebo group treated with naloxone or the morphine group injected with saline (article 2, figure 2).

Another aim of this study was to test the influence of morphine dependence and withdrawal on the immunoreactivity of total and phospho-ERK<sub>1/2</sub> in the right ( $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$ ) and left ( $p < 0.01$ ,  $p < 0.001$ ) ventricle at different time points after s.c. injection of naloxone to animals considered dependent on morphine. Our time course study shows that rats chronically treated with morphine and given naloxone showed a significant elevation of phospho-ERK<sub>1</sub> and phospho-ERK<sub>2</sub> levels in the right and left ventricle 60 or 90 min after administration of the opioid antagonist. Identical results were obtained 90 min after naloxone administration to morphine-pelleted rats. However, total ERK proteins remained unchanged in all the groups studies, indicating that the amount of activated protein, but not total protein was increased after naloxone-induced morphine withdrawal (article 3, figures 2, 3 and 4).

To gain more information concerning the cellular localization of phospho-ERK<sub>1/2</sub> in the heart, we studied the distribution of these proteins by immunohistochemical procedures using the same phospho-ERK<sub>1/2</sub>

antibody. Rats were killed 90 min after saline or naloxone injection. High levels of phospho-ERK<sub>1/2</sub> immunoreactivity were observed in the right and left ventricle after naloxone administration to morphine-dependent rats. The immunolabelling was mainly present in cytoplasmic compartments, suggesting a local activation of the protein. A nuclear staining was also observed in some myocytes, supporting a nuclear translocation of activated ERK proteins. By contrast, there was no staining in the right and left ventricle from control rats given naloxone or dependent rats injected with saline (article 3, figure 5). These immunohistochemistry results were consistent with western blot analysis.

#### **IX.4.2- Implication of PKA and PKC signalling pathways in the noradrenergic hyperactivity observed during morphine withdrawal**

In order to assess the relationships between PKA and PKC and morphine-induced biochemical adaptations in the heart, we examined the ability of HA-1004 and calphostin C, infused chronically via osmotic minipumps, to modify NA turnover in the right and left ventricle. Our results showed that chronic administration of HA-1004 concomitantly with morphine antagonized ( $p < 0.001$ ) the morphine withdrawal-induced NA turnover in the right and left ventricle 60 or 90 min after administration of naloxone to rats dependent on morphine. However, calphostin C administration did not alter this turnover at any of the times studied, when compared with the groups treated with vehicle instead of the PKC inhibitor (article 1, figure 1; article 2, figure 3; article 4, figure 1).



### **IX.4.3- Evaluation of non-phosphorylated TH, total TH and TH phosphorylated at serine 40 in the presence of PKA and PKC inhibitors**

Firstly, we evaluated the possible changes in non-phosphorylated TH after chronic administration of HA-1004 and calphostin C, concomitantly with morphine. This study demonstrated that 90 min after the injection of naloxone to rats chronically treated with morphine, these inhibitors were not able to antagonize the enhancement in non-phosphorylated TH levels that was observed in rats receiving vehicle instead of HA-1004 or calphostin C (article 1, figure 2; article 2, figure 4).

Next, we studied total TH levels, checking that HA-1004 abolished the increase in this protein level that was observed 60 or 90 min after administration of naloxone to morphine-pelleted rats in the right ( $p < 0.01$ ) and left ( $p < 0.01$ ) ventricle (article 2, figure 4). However, calphostin C did not modify the enhancement in this protein levels in any of the ventricles and at any time studied (article 4, figures 2 and 3).

Regarding TH phosphorylated at serine 40, HA-1004 blocked the increase in these phosphorylated protein levels that was observed 60 ( $p < 0.05$ ) or 90 (right ventricle:  $p < 0.05$ ; left ventricle:  $p < 0.01$ ) min after the induction of the withdrawal to morphine-dependent rats, in comparison to the animals that received vehicle instead of HA-1004 (article 4, figure 4).

### **IX.4.4- Implication of PKA and PKC in the increase in genetic expression (c-fos) during morphine withdrawal**

Another aim of this work was to check by western blot and immunohistochemistry which protein kinase was involved in the increase in c-Fos expression observed during morphine withdrawal in the heart.

Our results show that HA-1004 did not alter the enhanced levels of c-Fos in the right and left ventricle (article 2, figures 5 and 6). However, calphostin C could block this increase ( $p < 0.001$ ) in both ventricles (article 1, figures 3 and 4).

#### **IX.4.5- Implication of MAPK pathway in c-Fos and TH phosphorylated at serine 31 expression**

We determined p-ERK<sub>1/2</sub>, c-Fos and TH phosphorylated at serine 31 levels after ERK activation inhibition by SL-327.

Firstly, we studied if a 100 mg/kg dose of SL-327 was able to block the phosphorylation and then activation of ERK. Once checked that this dose was correct, we determined the possible changes in c-Fos expression after acute administration of the MEK inhibitor to rats dependent on morphine. The administration of SL-327 1h before naloxone to rats chronically treated with morphine significantly diminished the increase in c-Fos levels in both ventricles with respect to the group receiving vehicle instead of SL-327 (right ventricle:  $p < 0.01$ ; left ventricle:  $p < 0.05$ ) (article 3, figures 7 and 8).

Finally, and due to phosphorylation of TH at serine 31 depends on p-ERK<sub>1/2</sub>, we investigated if SL-327 could alter the enhanced TH phosphorylated at serine 31 levels observed in the heart during morphine withdrawal. Our results showed that this inhibitor could block this increase in the right and left ventricle 90 min after an acute injection of naloxone to morphine-pelleted rats, versus the group receiving vehicle (right ventricle:  $p < 0.01$ ; left ventricle:  $p < 0.05$ ) (article 4, figure 6).

## **IX.5- DISCUSSION**

Chronic opiate exposure induces important neurochemical adaptations in the noradrenergic, dopaminergic, gabaergic, glutamatergic, etc. systems (Nestler and Aghajanian, 1997; Nestler, 1992; Maldonado, 1997; Boundy et al., 1998; Kauer and Malenka, 2007). Previous findings of this group have shown numerous modifications during morphine withdrawal in the cardiac noradrenergic system (Rabadán et al., 1998; Milanés et al., 2000; Milanés and Laorden, 2000; Milanés et al., 2001) and in the paraventricular nucleus (Milanés et al., 1998; Fuertes et al., 2000; Núñez et al., 2007; Laorden et al., 2000). These changes include increased NA turnover and expression of TH. The present results show that naloxone-induced morphine withdrawal resulted in an increase in NA turnover in parallel with an increase in TH expression. This up-regulation of TH would be expected to increase the capacity of noradrenergic neurons to synthesize NA, which could contribute to the increase in NA turnover seen in the heart during morphine dependence. According with previous results (Martínez et al., 2003), the present data demonstrated that HA-1004 but not calphostin C significantly blocks the enhancement of NA turnover and TH expression during morphine withdrawal in both the right and left ventricle. Our finding suggests that PKA activity is necessary for the enhancement of NA turnover observed during morphine withdrawal in the heart. In this sense, we have observed an induction of PKA and CREB phosphorylation during morphine withdrawal.

Alterations in PKA pathway have been suggested as one of the molecular mechanisms of opioid tolerance and dependence (Nestler and Aghajanian, 1997). Thus, it could be possible that up-regulation of cAMP during morphine withdrawal could activate PKA and CREB, target of the cAMP/PKA signalling pathway (Nestler, 2004). CREB can regulate several genes such as genes for adenylate cyclase type VIII and TH, which

expression is enhanced during morphine administration through a mechanism CREB-dependent (Chao and Nestler, 2004). Therefore, PKA could phosphorylate CREB at serine 133 (Waltereit, 2003) and then increase TH synthesis.

On the other hand, changes in the state of phosphorylation of TH are critically involved in the regulation of catecholamines synthesis and function. In particular, increases in the phosphorylation of serine 40 and 31 accelerate TH activity, thereby stimulating production of neurotransmitter in catecholamines terminals (Kumer and Vrana, 1996; Dunkley et al., 2004). In this study we have investigated changes in TH phosphorylation in the cardiac noradrenergic terminals during morphine withdrawal using antibodies that detect serine 40 and 31 directly. Our results show that naloxone-induced morphine withdrawal induces an enhancement in phosphorylation of TH at serine 40 and 31, concomitantly with an increase in TH activity. All these data suggest that TH phosphorylation could be an important modulator of its activity and be directly involved in NA turnover regulation and in the enhanced force and rate of contraction observed during morphine withdrawal (Rabadán et al., 1997, 1998).

It is well known that phosphorylation at serine 40 results in a considerable increase of TH activity (Dunkley et al., 2004). Striatal serine 40 phosphorylation is increased concomitantly with enhanced TH activity and catecholamines synthesis (Haycock and Haycock, 1991). Our results show that the levels of TH phosphorylation at serine 40 in the right and left ventricle were increased 60 or 90 min after naloxone administration to morphine dependent rats. However, 60 min after naloxone administration to morphine dependent rats there was not change in the levels of TH phosphorylation at serine 31. In contrast, there was an enhancement of TH phosphorylation at serine 31, 90 min after naloxone injection to morphine dependent rats. Since phosphorylation of TH is closely

associated with the activation of the enzyme, present data are in agreement with the finding showing an increase in TH activity 90 min after naloxone-induced morphine withdrawal.

Previous studies from our laboratory have demonstrated that withdrawal from morphine is associated with a marked increase in the ventricular cAMP and PKA levels, in parallel with an enhancement of NA turnover (Milanés et al., 2000; Cerezo et al., 2005). Present results show an increase of NA turnover, TH levels and phosphorylation of TH at serine 40. These data suggest that naloxone-induced withdrawal increases the phosphorylated form of the enzyme in NA terminals innervating the heart. The phosphorylated enzyme has a higher affinity for the pteridine cofactor, accelerating the synthesis of NA (Kumer and Vrana, 1996), so the phosphorylation of serine 40 could be involved in the enhancement of NA turnover. It is known that agents that increase the cAMP/PKA pathway increase phosphorylation of TH at serine 40 (Haycock, 1990; Dunkley et al., 2004). To assess the contribution of PKA to the regulation of TH, we have examined TH phosphorylation at serine 40 during morphine withdrawal in animals receiving the selective inhibitor of PKA, HA-1004, concomitantly with morphine. This inhibitor has been previously used in different studies from our laboratory (Martínez et al., 2003; Benavides et al., 2005). We have found that concurrent infusion of HA-1004 with morphine inhibited the enhancement of NA turnover, the increase in total TH and the phosphorylation (activation) of TH at serine 40 in the NA terminals innervating the heart. These results suggest that PKA pathway is directly involved in the cardiac adaptive changes (enhanced NA turnover, expression and activation of TH) that occur after naloxone precipitated morphine withdrawal.

Recently, numerous studies have suggested that persistent alterations produced by opioids would be due to changes in genetic expression (Nestler and Aghajanian, 1997; Nestler, 2000; Blendy and

Maldonado, 1998). It has been probed that morphine and other opioids cause alterations in synaptic transmission, causing changes in numerous intracellular signalling pathways which nuclear targets are the transcription factors, responsible of gene transcription. In particular, CREB has been shown (in vivo and in vitro) to be altered in different brain areas in response to many drugs of abuse, including opioids (Blendy and Maldonado, 1998; Nestler, 2004). Some genes that play an important role in addiction, such as genes that encode CRF, TH or c-Fos, contain the sequence CRE in its promoter site and therefore could be CREB targets.

Previous studies of our laboratory have shown an enhancement in c-Fos expression in the central nervous system (Laorden et al., 2002b; Benavides et al., 2003; Núñez et al., 2007) and peripherally, and specifically, in the heart (González-Cuello et al., 2003, 2004a,b). According with these data, the present study shows an increase in c-Fos expression in the heart in rats withdrawn from morphine. To assess the relative contribution of PKA to the regulation of this immediate-early gene, we have examined c-Fos expression during morphine withdrawal in animals receiving the selective inhibitor of PKA, HA-1004. Chronic administration of HA-1004 did not modify c-Fos induction during morphine withdrawal in both right and left ventricle, indicating that up-regulation of c-Fos does not require activation of PKA. In contrast, a previous study from our laboratory indicated that chronic inhibition of PKA concurrently with morphine treatment significantly blocks c-Fos induction during morphine withdrawal in both paraventricular nucleus and nucleus tractus solitarius/ventrolateral medulla (Benavides et al., 2005). It is possible that different mechanisms are implicated in the cardiac c-Fos response to morphine withdrawal.

Nowadays, it is well established that PKC pathway would be involved in the process of morphine tolerance/dependence (Narita et al., 1994; Smart and Lambert, 1996; Tokuyama et al., 1995). Furthermore, it

has been confirmed that there is an increase in different PKC isoforms expression during morphine withdrawal (Cerezo et al., 2005). Therefore, and to assess the relative contribution of this signalling pathway in the enhanced c-Fos expression observed at heart level, we used calphostin C, a selective inhibitor of PKC. This study showed that the chronic inhibition of PKC concomitantly with morphine treatment significantly blocked c-Fos induction during morphine withdrawal in both right and left ventricle, indicating that up-regulation of c-Fos requires activation of PKC. It is known that PKC can phosphorylate SRF or CREB, which get coupled to SER or CRE, regions that are present in c-fos gene, and thus induce c-Fos expression (Haasteren et al., 1999; Liu and Anand, 2001). The inhibition of PKC regulating subunits by calphostin C would prevent the separation of catalytic subunits and thus the phosphorylation of CREB or SER, phenomenon that would inhibit c-Fos expression. Present results are consistent with the ones obtained in central nervous system (Benavides et al., 2005) and suggest that c-fos is a target for PKC at heart level.

It has been proposed that during chronic treatment with morphine not only PKA or PKC pathways are activated but also other signalling pathways like MAPK could be altered. In this work, we have studied the involvement of MAPK in the cardiac adaptive changes observed during morphine withdrawal. Recently, it has been demonstrated that chronic treatment with morphine leads to an enhancement in ERK activity in different areas of the central nervous system (Narita et al., 2002; Eitan et al., 2003; Ren et al., 2004; Cao et al., 2005). Present results show that naloxone-induced morphine withdrawal increases ERK<sub>1/2</sub> phosphorylation, without changes in total ERK. These data suggest that ERK would be involved in the cardiac adaptive changes observed during morphine withdrawal. ERK can phosphorylate different substrates, including enzymes, transcription factors and proteins. We have observed in this study that phosphorylated ERK appear in cytoplasm as well as in cardiac myocytes nuclei. Previous studies have demonstrated that

activated ERK can target a number of cytosolic proteins, including many enzymes such as TH (Haycock, 1993). Its nuclear location suggests an effect in immediate early genes. So, it has been shown that Ras/ERK cascade leads to CREB phosphorylation (Lonze y Ginty, 2002) and thus could be involved in the increased c-Fos expression observed during morphine withdrawal. In this sense, our results show that administration of SL-327, a drug that prevents ERK activation, blocks c-Fos expression in cardiac tissue. These results are in accordance with previous works that demonstrated that the enhancement in c-Fos expression observed during morphine withdrawal is mainly due to the activation of the ERK cascade (Monje et al., 2005). Taking into account previously commented results with the PKC inhibitor, we can suggest that c-Fos regulation in the heart seems to be under a combined control of different cascades such as ERK and PKC.

Cytoplasmic location of ERK suggests that this cascade could activate TH phosphorylation. It has been demonstrated that ERK<sub>1/2</sub> phosphorylate TH at serine 31, increasing TH activity and catecholamines synthesis (Haycock et al., 1992; Lindgren et al., 2002; Dunkley et al., 2004). In order to study the involvement of ERK<sub>1/2</sub> in TH phosphorylation at serine 31, we have used SL-327, a MEK inhibitor. Present results demonstrate that a 100 mg/kg dose of SL-327, a dose that selectively blocks MEK (Pozzi et al., 2003) diminishes TH phosphorylation at serine 31 in the right and left ventricle. These data are consistent with the ones obtained in a previous study in the central nervous system (Núñez et al., 2007) and suggest that naloxone administration to rats dependent on morphine produces an ERK activation which is traduced in an enhancement of TH phosphorylation at serine 31.

In summary, our results show an enhancement in NA turnover, in TH phosphorylation and activity as well as an increase in c-Fos expression in the heart during morphine withdrawal. This increase could be due to



activation of different signalling transduction pathways. It is known that second messenger cascades join creating complex interaction nets at multiple levels. Indeed, it could be affirmed that a single intracellular signal could induce changes in each of the rest cascades. So, cardiac adaptive changes observed during morphine withdrawal would be the complex result of coordinated second messenger actions that in turn participate in multiple molecular pathways. Present results could be an important contribution to further understand cardiac changes that occur in morphine addicts and could contribute to establish new strategies of prevention and treatment.

## **IX.6- CONCLUSIONS**

**1-** During morphine withdrawal there is an increase in NA turnover in parallel with an enhanced TH activity. There is also an increase in TH expression and in its phosphorylation at serine 40 and 31. These results could indicate starting post-transcriptional mechanisms that could be responsible for the enhanced TH activity and cardiac noradrenergic neurotransmission activation during this syndrome.

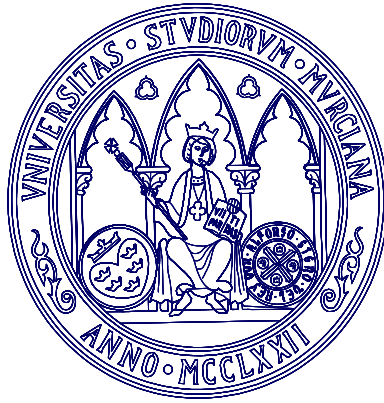
**2-** Chronic treatment with HA-1004 blocked the increase in NA turnover, total TH and the phosphorylation and therefore activation of TH at serine 40, observed during morphine withdrawal, suggesting that this adaptive changes are mediated by adenylate cyclase/cAMP/PKA transduction system. The results of this study rule out the participation of PKC.

**3-** Administration of calphostin C blocks the induced c-Fos expression observed in this study. These data indicate that PKC could be one of the cascades responsible for CREB phosphorylation and thus

induce c-Fos expression. Our results also show that up-regulation of c-Fos does not require activation of PKA pathway.

**4-** The results obtained with SL-327, a selective MEK inhibitor, suggest that the transcriptional regulation of c-Fos in the heart seems to be under a combined control of an ERK-dependent and independent-(PKC) pathway.

**5-** Cytoplasmic location of ERK suggests that these kinases could be responsible for TH phosphorylation at serine 31. This hypothesis was confirmed by administration of SL-327. This MEK inhibitor blocked the enhancement in TH phosphorylation at serine 31 observed during morphine withdrawal in the heart.



*X - ANEXO*



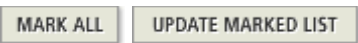
**Journal Summary List**

[Journal Title Changes](#)

Journals from: search Full Journal Title for 'NAUNYN-SCHMIEDEBERGS ARCHIVES OF PHARMACOLOGY'

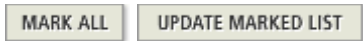
Sorted by:

Journals 1 - 1 (of 1) Page 1 of 1



*Ranking is based on your journal and sort selections.*

Mark	Rank	Abbreviated Journal Title <i>(linked to journal information)</i>	ISSN	JCR Data					
				Total Cites	Impact Factor	5-Year Impact Factor	Immediacy Index	Articles	Cited Half-life
<input type="checkbox"/>	1	<a href="#">N-S ARCH PHARMACOL</a>	0028-1298	4579	2.830	2.389	0.362	130	9.6



Journals 1 - 1 (of 1) Page 1 of 1

[Acceptable Use Policy](#)

Copyright © 2010 [Thomson Reuters](#).





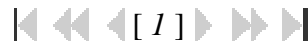
**Journal Summary List**

[Journal Title Changes](#)

Journals from: search Full Journal Title for 'BRITISH JOURNAL OF PHARMACOLOGY'

Sorted by:

Journals 1 - 1 (of 1)

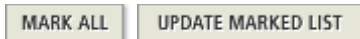


Page 1 of 1

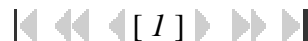


*Ranking is based on your journal and sort selections.*

Mark	Rank	Abbreviated Journal Title <i>(linked to journal information)</i>	ISSN	JCR Data					
				Total Cites	Impact Factor	5-Year Impact Factor	Immediacy Index	Articles	Cited Half-life
<input type="checkbox"/>	1	<a href="#">BRIT J PHARMACOL</a>	0007-1188	23987	4.902	4.214	1.297	536	7.8



Journals 1 - 1 (of 1)



Page 1 of 1

[Acceptable Use Policy](#)

Copyright © 2010 [Thomson Reuters](#).



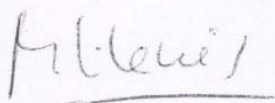
*Published by Thomson Reuters*

Los abajo firmantes M.Victoria Milanés, M. Luisa Laorden, Ana González-Cuello y Manuela Cerezo, coautores de los trabajos presentados por Pilar Almela Rojo para solicitar la defensa de su Tesis Doctoral como compendio de publicaciones

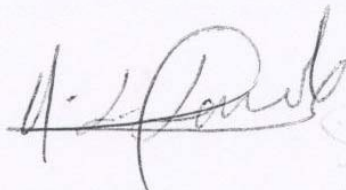
### DECLARAN

Su conformidad con la presentación de los siguientes artículos: **1.** Role of PKC in regulation of Fos and TH expression after naloxone induced morphine withdrawal in the heart (P. Almela, M. Cerezo, M.V. Milanés, M.L. Laorden); **2.** Differential involvement of 3',5'-cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase in regulation of Fos and tyrosine hydroxylase expression in the heart after naloxone induced morphine withdrawal (P. Almela, M. Cerezo, A. González-Cuello, M.V. Milanés, M.L. Laorden); **3.** Activation of the ERK signalling pathway contributes to the adaptive changes observed during naloxone-induced morphine withdrawal in the heart (P. Almela, M.V. Milanés, M.L. Laorden) y su compromiso de no presentar estos artículos como parte de otra Tesis Doctoral.

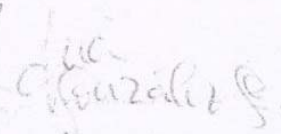
Y para que así conste donde proceda firmamos la presente en Murcia a 18 de abril de 2007.



M.V. Milanés



M.L. Laorden



A. González



M. Cerezo