



Universitat de les Illes Balears

Facultat de Ciències – Departament de Biologia
Institut Universitari d'Investigació en Ciències de la Salut
Laboratori de Neurofarmacologia

**La fosforilación de la proteína FADD
como nueva diana en la neuroplasticidad
inducida por fármacos opiáceos**

**Tesis doctoral presentada por
ALFREDO RAMOS MIGUEL**

Director
Dr. JESÚS A. GARCÍA SEVILLA
Catedrático de Farmacología, UIB

Palma de Mallorca, Septiembre 2010

UNIVERSITAT DE LES ILLES BALEARS
FACULTAT DE CIÈNCIES – DEPARTAMENT DE BIOLOGIA
INSTITUT UNIVERSITARI D'INVESTIGACIÓ EN CIÈNCIES DE LA SALUT (IUNICS)
LABORATORI DE NEUROFARMACOLOGIA

La fosforilación de la proteína FADD como nueva diana en la neuroplasticidad inducida por fármacos opiáceos

Tesis presentada por ALFREDO RAMOS MIGUEL para optar al grado de Doctor en Biología por la Universitat de les Illes Balears (UIB), en el programa de doctorado de Biología (Departament de Biologia, Facultat de Ciències, UIB). Trabajo realizado en el Laboratorio de Neurofarmacología, IUNICS, UIB.

El Director de la Tesis,

El autor de la Tesis,

Dr. Jesús A. García Sevilla
Catedrático de Farmacología (UIB)

Alfredo Ramos Miguel

Estos trabajos incluidos en la Tesis doctoral han sido financiados por los proyectos de investigación SAF2004-03685: “La vía de señalización del receptor Fas/FADD en la adicción a opiáceos”, y SAF2008-01311: “Acciones anti-apoptóticas mediadas por FADD y su fosforilación en la neuroplasticidad inducida por drogas de abuso y fármacos antidepresivos”, del Programa Nacional de Biomedicina, y RD06/001/0003: “Mecanismos moleculares y adicción a drogas”, dentro del marco de las Redes Temáticas de Investigación Cooperativa en Salud – Red de Trastornos Adictivos (RETICS – RTA), del Ministerio de Ciencia e Innovación (Madrid). Ambos proyectos contaron con Jesús A. García Sevilla como Investigador Principal.

Estos proyectos permitieron la contratación de Alfredo Ramos Miguel, inicialmente, con una beca predoctoral de Formación de Personal Investigador (BES-2005-11265) durante 27 meses (del 03/10/2005 al 31/12/2007) y, posteriormente hasta la fecha, con un contrato vinculado al Instituto de Salud Carlos III-UIB (RETICS-RTA). Laboratorio de Neurofarmacología, IUNICS, UIB.

Quisiera expresar mi agradecimiento al Dr. Jesús A. García Sevilla, no sólo por su gran labor como Director de esta Tesis doctoral, sino también por su constante apoyo y por la confianza que ha depositado en mí durante todos estos años.

Asimismo, me gustaría agradecer la colaboración de todos los co-autores que han hecho posible la elaboración de los artículos que componen esta Tesis doctoral, en especial a la Dra. Susana Esteban y al Dr. Antoni Miralles, por su cercanía y afecto.

Tampoco puedo olvidar el trabajo y la dedicación de los compañeros del Laboratorio de Neurofarmacología de la UIB, a quienes debo señalar, al menos en parte, como responsables de que este trabajo se haya hecho realidad.

Finalmente, quisiera agradecer la paciencia y el apoyo de todas las personas que han estado cerca de mí y, en particular, el de mis padres, sin ellos no sería quien soy.

TABLA DE CONTENIDOS

TABLA DE CONTENIDOS	9
INTRODUCCIÓN	19
OPIÁCEOS Y RECEPTORES OPIOIDES	21
Receptores opioides y los ligandos endógenos	23
<i>Tipos y subtipos de receptores opioides</i>	23
<i>Péptidos opioides</i>	25
<i>Distribución de los receptores opioides en el SNC</i>	26
<i>Estructura de los receptores opioides</i>	27
Transducción de la señal	29
<i>Señalización dependiente de proteína G</i>	29
<i>Desensibilización del receptor y señalización independiente de proteína G</i>	33
LA ADICCIÓN A OPIÁCEOS	35
Substratos biológicos de la adicción	37
Evidencias neurofisiológicas y teoría dopaminérgica de la recompensa	39
Evidencias morfológicas y estructurales	43
Evidencias moleculares	44
<i>Receptores y otras dianas farmacológicas</i>	45
<i>Vía del AMP cíclico</i>	45
<i>Señalización del Ca²⁺</i>	47
<i>Los fosfoinosítidos</i>	47
<i>Vías mitogénicas</i>	48
<i>Integración de señales: papel de DARPP-32</i>	50
<i>Consecuencias en la expresión de genes</i>	51

SEÑALIZACIÓN APOPTÓTICA EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL.....	53
La vía apoptótica extrínseca	55
La vía apoptótica intrínseca o mitocondrial	56
Mecanismos efectores de muerte neuronal	57
Apoptosis en la adicción a drogas de abuso	57
<i>Muerte neuronal y patología adictiva</i>	<i>57</i>
<i>Proteínas apoptóticas asociadas a los mecanismos de neuroplasticidad: FADD como diana en la adicción a opiáceos</i>	<i>58</i>
OBJETIVOS.....	63
MATERIALES Y MÉTODOS.....	69
MATERIALES.....	71
Fármacos	71
<i>Agonistas de receptores opioides</i>	<i>71</i>
<i>Antagonistas de receptores opioides</i>	<i>71</i>
<i>Otras herramientas y fármacos</i>	<i>72</i>
Anticuerpos	72
Otros reactivos y kits.....	75
<i>Kits</i>	<i>75</i>
<i>Proteínas, controles positivos y péptidos antigénicos</i>	<i>75</i>
<i>Otros reactivos empleados en Western blotting</i>	<i>75</i>
<i>Reactivos empleados para el ensayo de actividad enzimática</i>	<i>76</i>
<i>Reactivos empleados en HPLC-ED</i>	<i>76</i>
<i>Reactivos genéricos</i>	<i>76</i>
Materiales empleados para Western blotting.....	76
Aparatos	77

MODELOS DE EXPERIMENTACIÓN.....	77
Estudios en cerebro de rata.....	77
Estudios en cerebro humano.....	78
TRATAMIENTOS FARMACOLÓGICOS EN RATAS	79
Tratamientos agudos con fármacos opiáceos	79
Otros tratamientos agudos	80
1. <i>Efecto de la toxina de pertusis sobre la modulación de FADD y p-FADD inducida por SNC-80</i>	<i>80</i>
2. <i>Efecto de la inhibición de MEK sobre los contenidos basales de FADD, p-FADD y otras dianas de interés</i>	<i>81</i>
3. <i>Efecto de la inhibición de MEK sobre los cambios en los contenidos basales de FADD, p-FADD y CKIα inducidos por SNC-80</i>	<i>81</i>
Inducción de la sensibilización a la morfina: efecto del bloqueo de la vía MAPK/ERK	82
Desarrollo de dependencia a la morfina e inducción del síndrome de abstinencia: influencia del adrenoceptor α_2 y de la vía de MAPK/ERK	84
Otros tratamientos crónicos con fármacos opioides	85
ENSAYOS CONDUCTUALES EN ANIMALES DE LABORATORIO	86
Sensibilización locomotora inducida por morfina	86
<i>Descripción del activímetro</i>	<i>86</i>
<i>Procedimiento estándar y cuantificación de la actividad locomotora.....</i>	<i>88</i>
Cuantificación de la severidad del síndrome de abstinencia a la morfina	89
EXPERIMENTOS EN CEREBRO HUMANO POST MÓRTEM	91
Selección de sujetos y toxicología forense	91
Efecto del PMD, la edad y el sexo sobre las proteínas diana	95
PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS DE CEREBRO.....	96
Preparación rutinaria de muestras cerebrales para <i>Western blotting</i>: homogenado total.....	96

Defosforilación enzimática de las muestras cerebrales.....	97
Ruptura físico-química de agregados proteicos e inducción de oligomerización de FADD.....	97
Localización subcelular de las proteínas diana	98
Preparación de muestras cerebrales para ensayos enzimáticos.....	99
Preparación de muestras cerebrales para HPLC-ED	99
Determinación de la concentración de proteínas.....	99
<i>Método del ácido bicinonónico (BCA)</i>	<i>99</i>
<i>Método de precipitación de proteínas</i>	<i>100</i>
DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS DIANA MEDIANTE TÉCNICAS INMUNOLÓGICAS	
(WESTERN BLOTTING)	101
Separación electroforética	102
Electrotransferencia	103
Incubación con anticuerpos: <i>immunoblotting</i>	104
Sistema de detección por quimioluminiscencia.....	105
Cuantificación de las proteínas diana.....	106
<i>Cuantificación en cerebro de rata</i>	<i>106</i>
<i>Cuantificación en cerebro humano.....</i>	<i>108</i>
Reciclaje de las membranas (<i>stripping</i>) y normalización.....	108
Caracterización de anticuerpos en tejido cerebral.....	109
<i>Inmunodetección de FADD y p-Ser191/194 FADD en cerebro de rata, ratón y humano</i>	<i>111</i>
<i>Inmunodetección de una proteína recombinante de FADD</i>	<i>112</i>
<i>Defosforilación enzimática de las muestras cerebrales</i>	<i>113</i>
<i>Disociación de formas agregadas e inducción de oligomerización de FADD.....</i>	<i>115</i>
<i>Preabsorción de anticuerpos contra p-FADD y CK1α.....</i>	<i>116</i>

<i>Inmunodetección de alteraciones funcionales</i>	117
<i>Cuantificación de las modulaciones de p-FADD en cerebro de rata y humano</i>	117
DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA CK1α	118
CUANTIFICACIÓN DE DOPAMINA Y METABOLITOS MEDIANTE HPLC-ED	120
ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS	120
Análisis de datos en los experimentos con ratas	121
Análisis de datos en los experimentos con cerebro humano	121
RESULTADOS	123
ARTÍCULO I	125
Material complementario (Artículo I)	141
<i>Efecto de la administración aguda, crónica y abstinencia de agonistas μ-, δ-, y κ-opioides sobre el contenido de CK1α en la corteza cerebral de rata</i>	141
<i>Efecto de la inhibición de MEK1/2 sobre los contenidos basales de FADD, p-FADD y CK1α en la corteza cerebral de rata</i>	142
ARTÍCULO II	143
Material complementario (Artículo II)	159
<i>Variables potencialmente conflictivas en estudios post mórtem</i>	159
<i>Variabilidad entre los controles</i>	159
ARTÍCULO III	160
Material complementario (Artículo III)	178
<i>Regulación de CK1α en la corteza prefrontal de consumidores de opiáceos de corto (ST) y largo (LT) plazo</i>	178
<i>Análisis de variables potencialmente conflictivas en estudios post mórtem</i>	178
ARTÍCULO IV	181
Material complementario (Artículo IV)	198

<i>Regulación de la maquinaria apoptótica durante el desarrollo y la expresión de la sensibilización a la morfina</i>	198
<i>Regulación de ERK a nivel subcelular y expresión de genes tempranos durante la expresión de la sensibilización a la morfina</i>	199
<i>Regulación de statmina durante el desarrollo y la expresión de la sensibilización a la morfina</i>	200
ARTÍCULO V	201
DISCUSIÓN	237
REGULACIÓN DE LOS OPIÁCEOS SOBRE LOS MECANISMOS APOPTÓTICOS EN CEREBRO DE RATA Y HUMANO	239
Regulación de la vía extrínseca	239
Regulación de la vía intrínseca	241
Estudios post mórtem versus modelos animales	242
LA FOSFORILACIÓN DE FADD EN LOS MECANISMOS NEUROADAPTATIVOS INDUCIDOS POR LOS OPIÁCEOS	243
Inmunodetección de p-Ser191/194 FADD en tejido cerebral: relevancia de su localización nuclear	243
Los opiáceos regulan inversamente las formas fosforilada y no fosforilada de FADD	244
La fosforilación de FADD es estimulada durante los fenómenos de neuroplasticidad inducidos por opiáceos	246
<i>La adicción a opiáceos está asociada con el incremento de p-FADD en cerebro humano</i>	246
<i>La fosforilación de FADD está incrementada durante la expresión de la sensibilización locomotora inducida por morfina</i>	247
<i>El contenido de p-FADD en la corteza cerebral de rata correlaciona con la severidad del síndrome de abstinencia a la morfina</i>	248
Papel de p-FADD en la plasticidad neuronal	249
INTERACCIÓN DE FADD CON OTRAS VÍAS DE SEÑALIZACIÓN EN LA ACCIÓN DE LOS OPIÁCEOS	250
Dependencia o independencia de la señalización a través de proteína G	250

Vías de las MAPK en los mecanismos de acción de los opiáceos: Interacción de ERK y FADD a través de Akt/PEA-15	250
<i>La activación de ERK es necesaria para la reducción de FADD mediada por el receptor δ.....</i>	<i>250</i>
<i>La inhibición de ERK atenúa la expresión de la sensibilización a la morfina y bloquea la estimulación de p-FADD y Akt/PEA-15</i>	<i>251</i>
<i>El bloqueo de la activación de ERK reduce la severidad del síndrome conductual durante la abstinencia a la morfina.....</i>	<i>252</i>
<i>La adicción a opiáceos está asociada a la reducción de ERK, JNK y Akt/PEA-15 en cerebro humano</i>	<i>254</i>
La eliminación de los adrenoceptores α_2 acentúa la intensidad del síndrome de abstinencia y el incremento de p-FADD cortical.....	257
CONCLUSIONES	259
REFERENCIAS.....	263

INTRODUCCIÓN

OPIÁCEOS Y RECEPTORES OPIOIDES

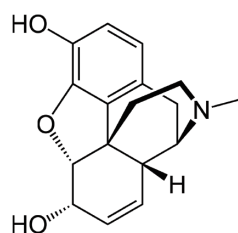
Los opiáceos son una familia de sustancias psicoactivas ligadas a la historia de la humanidad incluso antes de las primeras escrituras, debido al uso terapéutico y lúdico del opio¹, un extracto de la amapola blanca o adormidera (*Papaver somniferum*) enriquecido en varios alcaloides opiáceos (figura 1). Aunque existen algunas referencias anteriores en las culturas sumeria y egipcia (3000 a. C.), la primera reseña bibliográfica sobre la utilización terapéutica del jugo de la adormidera se atribuye al historiador griego Heródoto, en un texto que data del siglo III a. C., y en el cual ya describe las capacidades analgésicas e hipnóticas, así como las propiedades adictivas del *mecone*². Sin embargo, no fue hasta el año 1805 cuando se aisló el principio activo causante de la mayoría de efectos asociados al consumo del opio, un alcaloide al que se denominó morfina, en honor a Morfeo, el dios griego del sueño. Tras la invención de la jeringuilla hipodérmica a mediados del siglo XIX, la morfina comenzó a emplearse en cirugía, en combinación con otros anestésicos generales, así como para el tratamiento del dolor post operatorio y el dolor crónico. Pronto se documentó que este extracto conservaba las mismas propiedades que el opio para inducir a su abuso, lo cual comprometía el uso terapéutico de esta droga. La búsqueda de derivados más eficaces y menos adictivos que la morfina, llevó a la síntesis de la heroína (3,6–diacilmorfina) en 1874, comercializada 23 años más tarde por la compañía farmacéutica Bayer como un antitusivo indicado para el tratamiento de la tuberculosis. No obstante, las propiedades euforizantes (entre otras) de la heroína multiplicaron el potencial adictivo observado para la morfina, lo que condujo a su prohibición en el año 1924 en la mayoría de los países donde se había comercializado. Unos años más tarde, en la búsqueda de fármacos que pudieran reemplazar el uso de la atropina, se dio, de forma casual, con el primer análogo sintético de la morfina, la meperidina (Eisleb y Schaumann, 1939) y, poco después, con la metadona (Scott y Chen, 1946), otro compuesto estructuralmente alejado de la morfina. El síndrome de abstinencia provocado por la retirada de la metadona es diferente del de los alcaloides naturales; su inicio es más lento, se prolonga más en el tiempo y es de menor intensidad. Además, este compuesto es activo administrado de forma oral. Estas observaciones colocaron a la metadona como el fármaco preferido por los clínicos para reemplazar la morfina o la

¹ Opio: del griego antiguo 'ópos', que significa 'jugo'

² Mecone: palabra griega para referirse a la adormidera

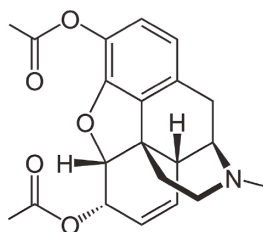
heroína en pacientes con adicción. Así pues, adictos estabilizados en el consumo de metadona pueden llevar una vida razonablemente mejor, y la droga puede ser retirada de forma gradual con menores perjuicios para los pacientes. Aunque con menor éxito del deseado, ésta es hoy día la estrategia más extendida en los países occidentales para el tratamiento de la adicción a opiáceos.

Alcaloides del opio



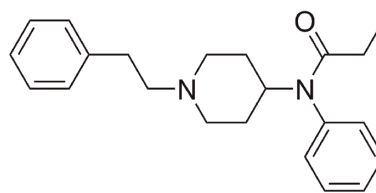
Morfina

Derivados semisintéticos

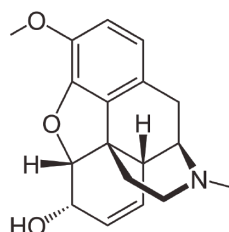


Heroína

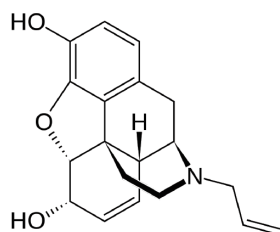
Compuestos sintéticos



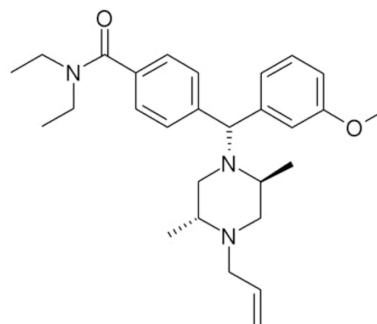
Fentanilo



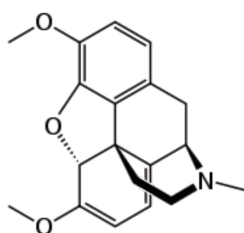
Codeína



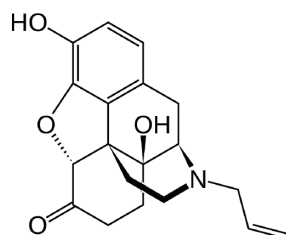
Nalorfina



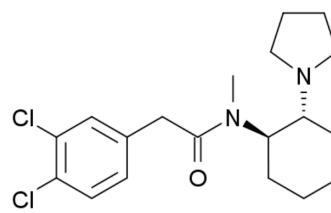
SNC-80



Tebaína



Naloxona



U-50,488-H

Figura 1-1. Estructura química de las principales familias de fármacos opiáceos. Aunque existen más alcaloides en el opio, éstos son los únicos capaces de activar los receptores opioides. La nalorfina y la naloxona son derivados morfínicos.

En 1942 se sintetizó el primer compuesto con propiedades antagonistas opioides, la nalorfina (*N*-alilmorfina; figura 1; Weijlard y Erikson, 1942). Este compuesto era capaz de revertir la depresión respiratoria inducida por la morfina y precipitar el síndrome de abstinencia en adictos. Sorprendentemente, aunque podía atenuar la analgesia inducida por morfina, la nalorfina era efectiva por sí misma en el tratamiento del dolor. Ahora sabemos que este

fenómeno se debe a que pertenece a un grupo de opiáceos llamados agonistas-antagonistas mixtos. A pesar de que su utilidad en el tratamiento del dolor era limitada, pues este compuesto inducía disforia y ansiedad, el descubrimiento de la nalorfina fue muy relevante en el camino de la síntesis de la naloxona y otros antagonistas opiáceos puros.

Receptores opioides y los ligandos endógenos

El concepto de que los distintos fármacos (entre ellos los opiáceos), hormonas o neurotransmisores ejercieran sus actividades mediante la interacción con "substancias receptoras" presentes en las células fue introducido entre finales del siglo XIX y principios del XX, de forma paralela, por Ehrlich y Langley. Más tarde, los trabajos de autores como Hill, Dale, Gaddum o Clark culminarían con la formulación de la primera teoría sobre la acción de los receptores, la Teoría ocupacional del receptor. Paradójicamente, a mediados de siglo, algunos libros de texto de farmacología cuestionaban la existencia de tales substancias como estructuras físicamente comprobables. De hecho, la edición de 1955 de "The Pharmacological Basis of Therapeutics" incluía la siguiente frase:

"... Years ago, Langley named the differentiating substance the 'receptive substance'; this term is still widely employed, but it must be realized that the 'receptor' may not be a morphologically demonstrable structure..."

Las primeras evidencias de la existencia de los receptores como "estructuras morfológicamente demostrables" llegaron tras la síntesis de los primeros radioligandos. La primera publicación en esta línea demostró la presencia de receptores colinérgicos en el diafragma de un ratón empleando [¹⁴C]-calabash curare como radioligando (Waser, 1960). El interés suscitado por esta publicación dio un nuevo vuelco en la farmacología, e investigadores de todo el mundo comenzaron a desarrollar nuevos radioligandos.

Tipos y subtipos de receptores opioides

La divergencia en los efectos de los distintos agonistas, antagonistas y agonistas-antagonistas mixtos ya hacía pensar, a mediados de los '60, la existencia de más de un tipo de receptor opioide (Portoghese, 1965). El primer radioligando diseñado para el estudio de este grupo de receptores fue el [³H]-levorfanol (Goldstein et al., 1971). Sin embargo, el grupo de Goldstein no consiguió sintetizar un ligando suficientemente específico para demostrar la existencia de subtipos de receptores opioides. Fue dos años más tarde cuando, de forma simultánea, varios grupos de investigación mostraron las primeras evidencias de que existen receptores opioides

en el cerebro de mamíferos (Pert y Snyder, 1973; Simon et al., 1973; Terenius, 1973) y que la distribución de los mismos no es homogénea, y depende de la estereoespecificidad del radioligando empleado (Hiller et al., 1973; Kuhar et al., 1973). En 1976 se describen por primera vez, aunque de forma parcialmente errónea, tres subtipos de receptores opioides, a los que denominaron μ (MOP o OP_3), κ (KOP o OP_2) y σ , porque los asociaron a los efectos de sus agonistas prototípicos: morfina, ketociclazocina y SKF-10,047 (o *N*-alilnormetazocina) respectivamente (Martin et al., 1976). Más adelante, se sugirió la existencia de un nuevo receptor opioide responsable de los efectos de las deltorfinas, el receptor δ (en referencia a vas deferens, y más adelante DOP o OP_1 ; Lord et al., 1977). Paralelamente, el receptor σ fue excluyéndose de esta familia por su lejana función como analgésico, la imposibilidad de antagonizar sus efectos con la naloxona, y por la ausencia de otras acciones características de los opiáceos.

En la década de los '80 comenzó la explosión de las técnicas de biología molecular, y con ella, la clonación y secuenciación de los distintos receptores. Estas técnicas confirmaron las observaciones realizadas mediante el empleo de radioligandos veinte años atrás. El clonaje y la caracterización bioquímica de los receptores opioides supuso una ardua tarea. La primera molécula de unión a opiáceos en ser purificada y secuenciada resultó ser un miembro de la familia de proteínas de adhesión celular (OBCAM; "opioid-binding cell adhesion molecule"; Schofield et al., 1989). Sin embargo, basándose en los primeros estudios que demostraban que los opiáceos inhibían la producción de AMP cíclico (cAMP), a la vez que estimulaban la actividad GTPasa celular, se sospechaba que estos receptores podrían pertenecer a la recientemente descrita superfamilia de receptores acoplados a proteínas G (GPCR). Tres años después, el grupo de Goldstein clonó exitosamente un cDNA que codificaba un miembro de la familia de los GPCRs y que presentaba cierta afinidad por algunos ligandos opioides (Xie et al., 1992). Este receptor, no obstante, no mostraba la especificidad farmacológica esperada de ninguno de los tres receptores opioides descritos hasta el momento (μ , δ o κ). En este mismo año, dos grupos independientes consiguieron, finalmente, la clonación y secuenciación del receptor opioide δ de ratón (Evans et al., 1992; Kieffer et al., 1992). La clonación de los receptores κ y μ se obtendría un año más tarde, como resultado de una búsqueda por homología de secuencia (revisado en Kieffer y Evans, 2009). Estas técnicas también permitieron la detección de las isoformas, o variantes de *splicing* alternativo, de los receptores μ -, δ - y κ -opioides, aunque la existencia de estas isoformas está bastante discutida (tabla 1-1; revisado en Dhawan et al., 1996; Wei et al., 2004; Kieffer y Evans, 2009).

Tabla 1-1. Receptores opioides y sus ligandos endógenos en mamíferos^a

Receptor	Abreviatura	Variantes	Ligandos endógenos	Agonistas ^b
Receptor opioide μ	MOP, OP ₃	μ_1 y μ_2	Endorfina-1 Endorfina-2 β -endorfina β -neoendorfina	Morfina <i>DAMGO</i> Metadona Fentanilo Sufentanilo
Receptor opioide δ	DOP, OP ₁	δ_1 y δ_2	Leu ⁵ -Enkefalina Met ⁵ -Enkefalina Met ⁵ -Enkefalina-Arg ⁶ -Phe ⁷ Met ⁵ -Enkefalina-Arg ⁶ -Gly ⁷ -Leu ⁸	SNC-80 <i>DADLE</i> <i>DPDPE</i>
Receptor opioide κ	KOP, OP ₂	κ_1 y κ_2	Dinorfina A Dinorfina B α -neoendorfina	U-50,488-H
Receptor de nociceptina	NOP, OP ₄		Nociceptina/orfanina FQ	Ro646198

^aIndicaciones según la IUPHAR (véase Dhawan et al., 1996; y <http://www.iuphar.org/nciuphar.html>)

^bAlgunos de los agonistas exógenos más empleados; los agonistas peptídicos se muestran en *cursiva*.

La búsqueda por homología de secuencia de nuevos receptores opioides resultó en el hallazgo del receptor de nociceptina (NOP, OP₄). Este receptor, originalmente bautizado como ORL-1 ("opioid receptor-like-1"), también pertenece a la superfamilia de GPCRs, y comparte un alto grado de homología con el resto de receptores opioides. Fue clonado como un receptor huérfano en 1994 por varios grupos de investigación de forma paralela. El receptor de nociceptina permaneció huérfano durante tan solo un año, cuando su ligando endógeno, el neuropéptido conocido como nociceptina u orfanina FQ (N/FQ), fue aislado (tabla 1-1) (Meunier et al., 1995). A pesar de su homología con los receptores opioides μ , δ y κ , el receptor de nociceptina no presenta afinidad por la mayoría de agonistas o antagonistas opiáceos, por lo que muchos autores discuten su pertenencia a este grupo de GPCRs

Péptidos opioides

De forma paralela al descubrimiento y caracterización de los receptores opioides, a mediados de los '70, se aislaron y secuenciaron los primeros ligandos peptídicos endógenos (Hughes et al., 1975; Bradbury et al., 1976; Cox et al., 1976; Li y Chung 1976; Pasternak et al., 1976; Goldstein et al., 1981). Se reconoció también que cada uno de los péptidos opioides activos eran parte de una proteína precursora de mayor tamaño. En mamíferos, existen principalmente tres de estos precursores (véase también la tabla 1-1):

- Proencefalina A, que rinde cuatro Met⁵-encefalinas, una Leu⁵-encefalina, una Met⁵-encefalina-Arg⁶-Phe⁷ y una Met⁵-encefalina-Arg⁶Gly⁷Leu⁸ (Noda et al., 1982).
- Prodinorfina (o proencefalina B), que da lugar a las dinorfinas A y B, así como a las neoendorfinas α y β . (Kakidani et al., 1982).

- Proopiomelanocortina, la cual es procesada en corticotropina, β -lipotropina y melanotropinas, junto con la β -endorfina (Nakanishi et al., 1979).

Distribución de los receptores opioides en el SNC

La localización de los receptores opioides μ , δ y κ en el SNC ha sido evaluada mediante numerosas técnicas. Los radioligandos han sido clásicamente las herramientas más empleadas y fiables para este tipo de estudios. La exposición de un corte cerebral a un radioligando produce el marcaje de los receptores por los cuales tiene afinidad, y la distribución de éstos puede ser visualizada mediante su exposición a una película sensible a la emisión de radiación (autorradiografía). Posteriormente, estudios de inmunohistoquímica con anticuerpos dirigidos contra los receptores, y también mediante hibridación *in situ*, han complementado el conocimiento sobre la distribución de estos receptores en el SNC. También cabe destacar la contribución desde mediados de los '80 de los estudios de neuroimagen *in vivo*, empleando la tomografía por emisión de positrones (PET).

Tabla 1-2. Densidad relativa de los receptores opioides en la corteza cerebral de rata evaluada con [^3H]-DAGO (μ), [^3H]-DPDPE (δ), o [^3H]-(-)-bremazocina (κ)

	μ	δ	κ
Corteza frontal parietal			
Capas I	+++	++	-
II y III	+	+++	++
IV	+++	++	-
V y IV	+	+++	++
Corteza temporal			
Capas I	+++	++	-
II y III	++	+++	-
IV	+++	+	-
V y IV	++	+++	+
Córtex cingulado			
Capas I	++++	+	+
II	+	++	+
III	+++	++	++
V	+++	++++	++
VI	++	++	++
Corteza piriforme			
Capas I	+	+	++
II y III	++	++	++
Corteza entorrinal			
Capas I	+	+	+
II-VI	++	++	++
Córtex estriado			
Capas I	++	-	-
II y III	+	++	-
IV	+++	+	-
V y IV	++	+++	++

++++, densidad muy elevada; +++, densidad elevada; ++, densidad moderada; + densidad baja; -, densidad nula. Datos tomados de Mansour et al., 1987.

Estos estudios han puesto de manifiesto la amplia distribución de los receptores opioides en el SNC de mamíferos. Aunque con algunas diferencias, la localización de los receptores μ , δ y κ es bastante similar (revisado en Dhawan et al., 1996). Por ejemplo, el empleo de diversos redioligandos específicos, ha mostrado que el receptor μ es especialmente abundante en el caudado putamen, seguido de corteza cerebral (tabla 1-2), tálamo, núcleo accumbens, hipocampo, y amígdala; también se expresa de forma más moderada en las capas superficiales del cuerno dorsal de la médula espinal, substancia gris periacueductal, núcleo del rafe, hipotálamo, y globo pálido. En cambio, el receptor δ se localiza con mayor densidad en el bulbo olfatorio, corteza cerebral, caudado putamen y núcleo accumbens, mientras que tálamo, hipotálamo, y tallo cerebral presentan densidades moderadas o pobres. Los resultados obtenidos empleando técnicas inmunológicas concuerdan razonablemente con los estudios de *binding*. La densidad relativa de los tres tipos de receptores opioides en la corteza cerebral de rata se muestra en la tabla 1-2. Para más detalles véase Mansour et al., 1987.

Estructura de los receptores opioides

Desde el punto de vista estructural, los receptores opioides pertenecen a la superfamilia de los GPCRs, la cual se postula como la familia que cuenta con el mayor número de miembros incluidos dentro de un único grupo de proteínas, alcanzando hasta un 3% de los genes presentes en el genoma humano. Los análisis por comparación y alineamiento de las secuencias aminoacídicas de los GPCRs condujeron a la identificación de algunas características clave que son compartidas por todos los miembros de esta familia de receptores (figura 1-2). Los GPCRs contienen siete hélices α , que constituyen los siete dominios transmembrana de naturaleza hidrofóbica, conectados por bucles intra- y extracelulares relativamente cortos. El extremo amino (N)-terminal de los GPCRs se halla en la cara extracelular, y presenta sitios de N-glucosilación, mientras que el dominio carboxi (C)-terminal se localiza en la cara citoplasmática de la membrana celular y, junto con el tercer bucle intracelular, contiene lugares de fosforilación que juegan un papel esencial en la regulación homóloga del receptor.

Los distintos receptores opioides presentan un alto grado de homología, suponiendo un 62% entre los receptores δ y μ , un 61% entre δ y κ , y un 57% entre μ y κ (tabla 1-3). No obstante, esta homología es muy variable si se analizan los distintos dominios por separado (véase tabla 1-3). Los dominios transmembrana (TM), y en especial los TMII y TMIII, se encuentran especialmente conservados, una homología que se presenta en toda la familia de los GPCRs.

Los tres bucles intracelulares también se hallan altamente conservados, una característica que define a los receptores opioides. Por el contrario, tanto los dominios N- y C-terminales como los bucles extracelulares son especialmente variables. En estos dominios destacan dos cisteínas conservadas en los bucles extracelulares II y III que forman un puente disulfuro, una asparagina en el extremo N-terminal, diana de N-glucosilación y, en el dominio C-terminal, una tirosina posiblemente implicada en la regulación homóloga del receptor, y dos cisteínas palmitoiladas (figura 1-2).

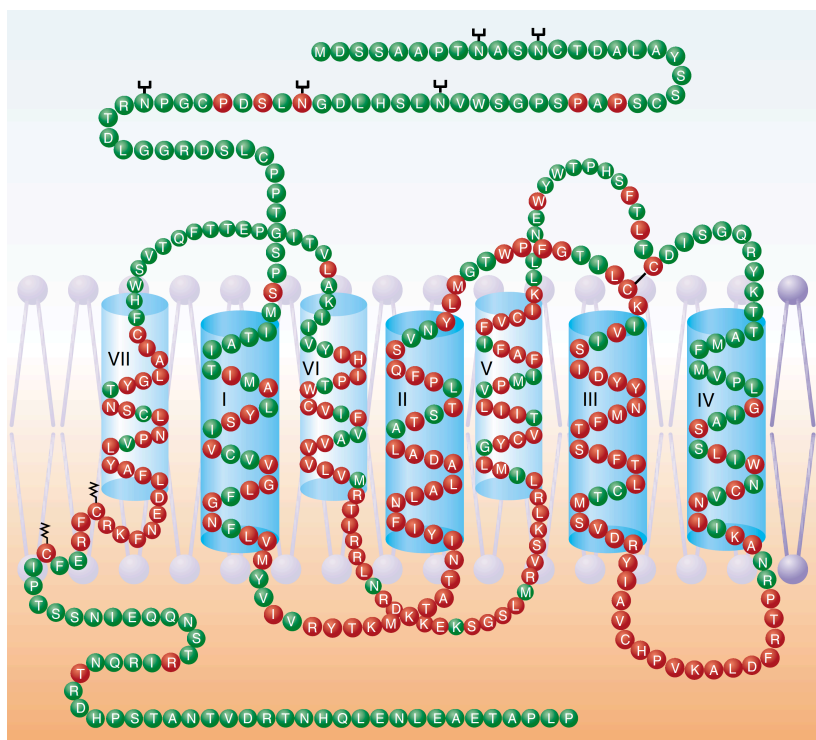


Figura 1-2. Estructura del receptor opioide μ . Los residuos en rojo representan aminoácidos conservados en los receptores μ , δ y κ . Los porcentajes de homología entre estos receptores se encuentran detallados en la tabla 1-3. Las marcas en los residuos de Asn representan posibles sitios de N-glucosilación. También hay dos Cys dianas de palmitoilación y una Tyr diana putativa de la fosforilación conservadas en el extremo C-terminal. Destacan dos Cys conservadas en los bucles extracelulares II y III que forman puentes disulfuro, y que mantienen la estructura del receptor. Tomado de Levac et al., 2002.

Esta estructura heptaélica de los GPCRs fue confirmada mediante la obtención de cristales de rodopsina (Unger et al., 1997; Palczewski et al., 2000), el GPCR más abundante en vertebrados. Recientemente, el adrenoceptor β_2 también ha sido cristalizado, aunque sólo en la conformación inactiva del receptor (Cherezov et al., 2007; Rosenbaum et al., 2007). La obtención de estos cristales ha permitido además determinar los lugares de fijación de los ligandos, así como los estados conformacionales de activación y reposo de los receptores. La computerización de la estructura de la rodopsina ha contribuido en la elaboración de modelos predictivos para el estudio de otros GPCRs. Estos trabajos, combinados con estudios de mutagénesis dirigida, han conseguido definir el lugar de fijación de los distintos opiáceos y neuropéptidos a los receptores opioides. Principalmente, los residuos cargados posicionados en los dominios TMII y TMIII son esenciales en la interacción ligando-receptor

(recientemente revisado en Kieffer y Evans 2009; Provasi et al., 2009). Por otra parte, la especificidad de unión con el ligando viene determinada por los dominios extracelulares, los cuales formarían un túnel que limita o filtra el acceso a las distintas moléculas. Finalmente, los dominios intracelulares se encargan de el acople con las proteínas G, así como con las GRKs (y otras kinasas), β -arrestinas y otras proteínas que median la transducción de la señal opioide.

Tabla 1-3. Homología entre las secuencias aminoacídicas de los receptores opioides μ , δ y κ desglosada por dominios¹

Dominios	Porcentaje de identidad de secuencia		
	δ/μ	δ/κ	μ/κ
Terminales			
N-terminal	28	33	18
C-terminal	40	32	35
Transmembrana			
I	69	62	62
II	95	86	82
III	90	95	100
IV	43	57	33
V	85	77	77
VI	73	64	73
VII	78	82	86
Bucles extracelulares			
I	73	67	67
II	52	52	30
III	21	13	21
Bucles intracelulares			
I	90	90	100
II	91	95	91
III	86	81	86
Receptor completo	62	61	57

¹Datos tomados de Chaturvedi et al., 2000

Transducción de la señal

Los receptores opioides, al igual que cualquier receptor de membrana, son proteínas "discriminadoras" de una señal específica y, por sí mismos, no son capaces de ejecutar una respuesta fisiológica a la señal que reciben. Para integrar una respuesta funcional necesitan la actividad de otras proteínas y segundos mensajeros que amplifican y propagan la señal. Estos mecanismos de "transducción" son los responsables de la divergencia y/o convergencia de las respuestas ante los distintos estímulos exógenos que recibe la célula.

Señalización dependiente de proteína G

Como ya se ha mencionado, los receptores opioides pertenecen a la superfamilia de GPCRs, y transducen su señal (o al menos una parte de ella) mediante la interacción con otra familia de moléculas denominada proteínas G. En la década de los '50, mucho antes del aislamiento de

los GPCRs, Shuderland descubrió que ciertas hormonas ejercían sus funciones promoviendo el incremento de cAMP intracelular, y consiguió además aislar el enzima responsable de esta actividad, la adenilato ciclasa (AC). Fueron dos grupos independientes, liderados por Rodbell y Gilman, quienes aislaron y determinaron el mecanismo de acción de las proteínas G, las cuales median la activación de la AC inducida por aquellas hormonas (figura 1-3). Estas proteínas tienen la peculiaridad de regular su propia actividad gracias a la incorporación de un dominio GTPasa autocatalítico. La proteína G se activa cuando se encuentra unida a GTP. En este estado es capaz de activar numerosos efectores que amplificarán la señal mediante la producción de segundos mensajeros (figura 1-3). El dominio autocatalítico de la proteína G hidroliza el GTP, aunque lo hace de manera ineficiente, permitiendo un margen de tiempo para que la proteína ejerza sus funciones. La proteína G unida a GDP es inactiva, pero tiene mayor afinidad por la cara citoplasmática del receptor, al cual se une rápidamente. La unión del agonista al receptor promueve el intercambio de GDP por GTP en la proteína G, la cual pierde afinidad por el receptor y se libera al citosol en su forma activa, reanudando así el ciclo (figura 1-3). Este mecanismo es el principal sistema que emplean los GPCRs para transducir la señal del ligando, y por el cual reciben su nombre.

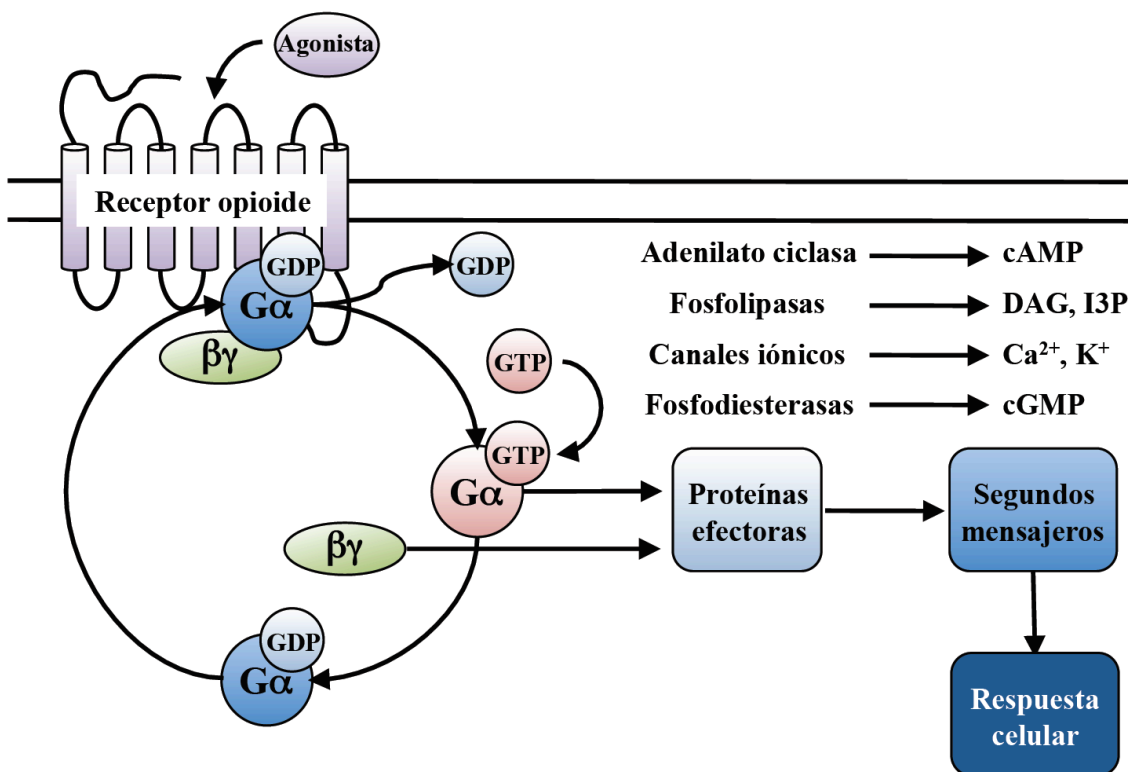


Figura 1-3. Señalización del receptor opioide dependiente de proteína G y principales mecanismos efectoros. cAMP, AMP cíclico; DAG, diacilglicerol; I3P, inositol trifosfato; cGPM, GMP cíclico.

Las proteínas G que se acoplan a los GPCRs son proteínas heterotriméricas, compuestas por tres subunidades diferentes, α , β y γ , en estequiometría 1:1:1. Se han descrito hasta 27 subunidades α distintas, y al menos 6 subunidades β y 14 γ . Esta familia de proteínas se clasifica en función del tipo de subunidad α que conforma la proteína G. En esta clasificación, las proteínas G se dividen en cuatro grupos: Gs (estimuladoras), Gi (inhibidoras), Gq y G₁₂ (tabla 1-4). Una característica relevante de esta familia es que las proteínas Gs y Gi son sensibles a las toxinas colérica y pertúsica respectivamente, las cuales son herramientas muy útiles para alterar la respuesta a algunos fármacos.

Tabla 1-4. Propiedades de las subunidades α de las proteínas G

Familia	Sensibilidad a toxina	Localización	Sistema efector
Gs	Colérica	Ubicua	(+) AC
Gi	Pertúsica	Ubicuas (G α_i), cerebro (G α_o , G α_z), retina (G α_t), papilas gustativas (G α_{gust})	(-) AC (+) canal de K ⁺ (-) canal de Ca ²⁺ (+) PLC (+) PLA ₂ (+) fosfodiesterasa cGMP
Gq	No	Ubicua	
G ₁₂	No	Ubicua	Intercambiador Na ⁺ /H ⁺

AC, adenilato ciclasa; PLA₂, fosfolipasa A₂; PLC, fosfolipasa C; (+), estimula; (-), inhibe

Todos los receptores opioides acoplan proteínas Gi/o. Posiblemente, la actividad más estudiada de esta familia de proteínas G es la inhibición de la AC, y el consecuente bloqueo de la producción de cAMP (tabla 1-4; figura 1-4), un segundo mensajero que estimula a la proteína quinasa A (PKA). Entre otras funciones, la PKA promueve la transcripción de un importante grupo de genes controlados por el elemento de respuesta a cAMP (CRE), mediante la fosforilación (activación) de la proteína de unión a CRE (CREB).

La activación de los receptores opioides está asociada a la hiperpolarización de la membrana de las neuronas, bloqueando la transmisión de un posible potencial de acción estimulador. La hiperpolarización de la membrana en dichas neuronas es una consecuencia de la activación de los canales de potasio dependientes de voltaje, una actividad directa de la proteína Gi/o (figura 1-4). La activación de las proteínas Gi/o inducida por opioides también es responsable del bloqueo de los canales de calcio, otro segundo mensajero con multitud de funciones en el interior celular. Por ejemplo, dos proteínas dependientes de calcio, esenciales en la señalización opioide, son la proteína quinasa C (PKC), y la Ca²⁺/calmodulina (CaM). Ambas cuentan con numerosos sustratos. La primera puede fosforilar directamente al receptor opioide μ , promoviendo su desensibilización, aunque también es capaz de estimular las vías

de las quinasas activadas por mitógenos (MAPKs) o penetrar en el núcleo de la célula y promover la transcripción de numerosos genes. La CaM es la principal responsable de la activación de la quina II dependiente de CaM (CaMKII), un enzima muy relevante, al igual que la PKC y las MAPKs, en el desarrollo de tolerancia a la morfina y otros fenómenos de plasticidad neuronal.

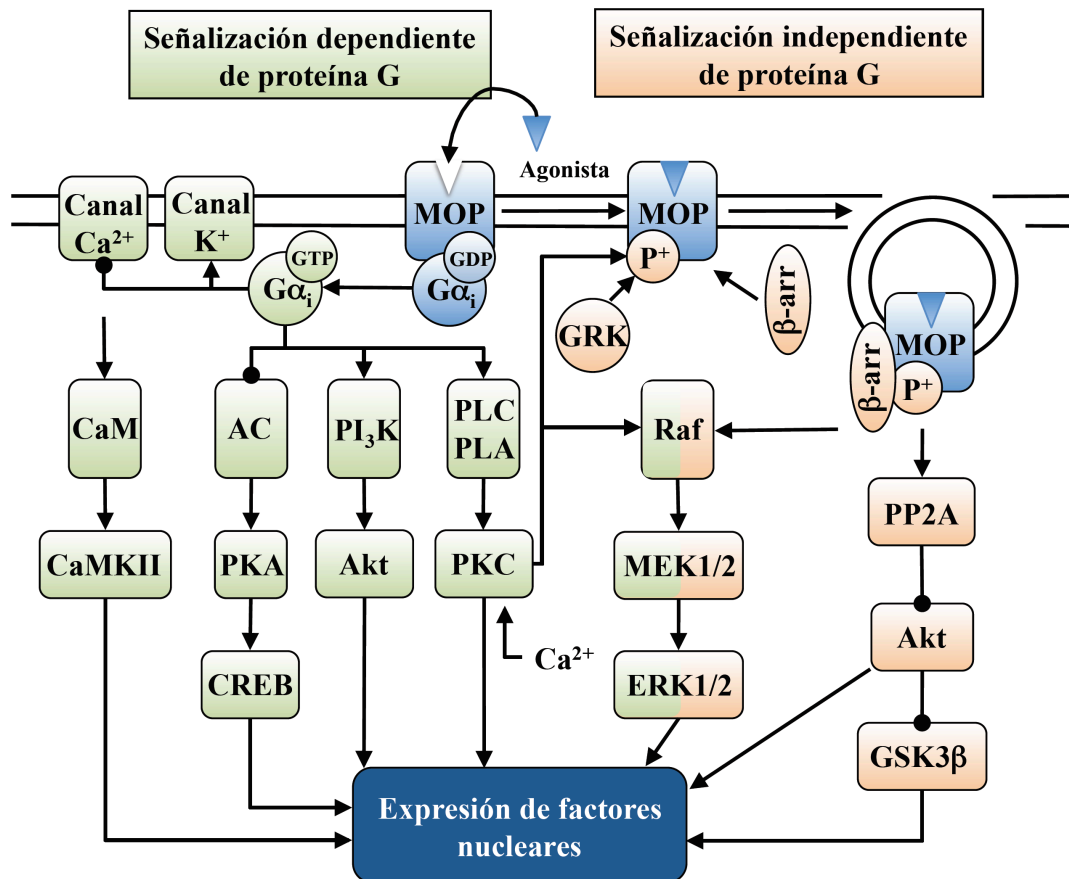


Figura 1-4. Regulación homóloga y principales vías de señalización dependientes e independientes de proteína G del receptor opioide μ (MOP). AC, adenilato ciclasa; Akt, homólogo del oncogén vírico v-akt del timoma murino (también proteína quinasa B); β-arr, β-arrestina; CaM, Ca²⁺/calmodulina; CaMKII, quina II dependiente de CaM; CREB, proteína de unión a CRE (elemento de respuesta a cAMP); ERK, quina regulada por señales extracelulares; GRK, quina del receptor acoplado a proteína G; GSK3β, quina 3β de la glucógeno sintasa; MEK, MAP (proteína activada por mitógenos)/ERK quina; P⁺, fosforilado; PI₃K, fosfoinositol 3-quinasa; PKA, proteína quinasa A; PKC, proteína quinasa C; PLA, fosfolipasa A; PLC, fosfolipasa C; PP2A, proteína fosfatasa 2A; Raf, homólogo del oncogén viral de la leucemia murina v-raf-1. →, estimulación; —●, inhibición

Otros efectores importantes son las fosfolipasas A₂ y C (PLA₂ y PLC), y la fosfoinositol 3-quinasa (PI₃K), las cuales producen segundos mensajeros lipídicos. Las actividades de estos enzimas estimulan otras proteínas quinasas (figura 1-4). Entre éstas, la Akt, o proteína quinasa B, así como la PKC, mencionada anteriormente, intervienen numerosas respuestas celulares.

Desensibilización del receptor y señalización independiente de proteína G

La exposición de los GPCRs a sus agonistas normalmente resulta en una atenuación rápida de la respuesta del receptor. Este proceso, clásicamente conocido como desensibilización, es consecuencia de diferentes mecanismos, incluyendo el desacoplamiento de la proteína G heterotrimérica en respuesta a la fosforilación del receptor, la internalización del receptor en compartimentos membranosos intracelulares (endosomas), la degradación del receptor en lisosomas, la parada de la síntesis *de novo* del GPCR y, consecuente, una reducción global del pool total de receptores. Los intervalos de tiempo que limitan la respuesta de un GPCR varían entre unos pocos segundos (fosforilación) y varias horas (destrucción y parada de síntesis del receptor). También es variable la magnitud de la desensibilización del GPCR, pudiendo ser una terminación total de la respuesta, como ocurre en los sistemas visual y olfatorio, o una atenuación de la potencia del agonista, reduciendo el umbral máximo de respuesta.

El desacoplamiento del GPCR a la proteína G, como se ha mencionado, es consecuencia de la fosforilación del receptor, una modificación covalente que consiste en la incorporación de grupos fosfato ($R-O-PO_3^-$) a residuos concretos de la secuencia aminoacídica del receptor, mediante la acción de kinasas intracelulares. Existen principalmente dos grupos de enzimas que regulen este proceso, las proteína kinasas dependientes de segundos mensajeros (PKA y PKC), o bien las denominadas kinasas de los GPCR (GRKs) (véase figura 1-4). No obstante, se ha sugerido que otras kinasas, tales como la CaMKII o la kinasa 5 dependiente de ciclina (cdk5), pueden fosforilar a los receptores opioides μ y δ respectivamente (Mestek et al., 1995; Koch et al., 1997; Xie et al., 2009). Estas kinasas son capaces de fosforilar residuos de serina y/o treonina presentes en los bucles intracelulares o en el dominio C-terminal del GPCR. La búsqueda de secuencias consenso en estas regiones del receptor μ para las distintas kinasas ha probado la existencia de numerosos lugares putativos de fosforilación, aunque hoy día sólo se ha demostrado con firmeza la fosforilación en la serina 375 (revisado en Zhang et al., 2009). Las GRKs fosforilan de forma selectiva al receptor activado por agonista. Esta modificación del receptor es detectada por otro grupo de proteínas citosólicas denominadas arrestinas (arrestina 1 es exclusiva del sistema visual, mientras que β -arrestina 1 y β -arrestina 2 son ubicuas), las cuales impiden el acoplamiento de una nueva proteína G, terminando así la señalización dependiente de proteína G (figura 1-4). Tras el anclaje de las arrestinas al GPCR, la región interna de la membrana adyacente al receptor se cubre de clatrina, y la célula procede a la endocitosis del receptor. El GPCR puede ser entonces resensibilizado por la acción de fosfatasas (p. ej. proteína fosfatasa-2A, PP-2A) que eliminan los grupos fosfato

unidos al receptor y, posteriormente, reciclados en la membrana citoplasmática, o bien proceder a su eliminación en los lisosomas.

Los mecanismos de desensibilización e internalización de los receptores opioides por determinados fármacos opiáceos permanece en un primer plano de debate en la Neurofarmacología debido a sus posibles repercusiones funcionales sobre la tolerancia al efecto analgésico y la dependencia a este tipo de sustancias, y la importancia de estos fenómenos sobre las limitaciones del uso clínico de los opiáceos en el tratamiento del dolor. Mientras que los péptidos opioides, así como la mayoría de agonistas más potentes (p. ej. etorfina y fentanilo), promueven una desensibilización rápida del receptor opioide μ , la morfina (y otros alcaloides sintéticos y semisintéticos) son incapaces de mediar la internalización del mismo (Keith et al., 1996; Sterini et al., 1996). En este sentido, se ha documentado que algunas de las proteínas que participan de manera directa o indirecta en el mecanismo de desensibilización del receptor μ (β -arrestina 2, GRK3, PKA, PKC, CaMKII, PP-2A, etc.), están involucradas en la adquisición de tolerancia al efecto analgésico de la morfina (revisado en Bailey y Connor, 2005; Gintzler y Chakrabarti, 2006; Wang y Wang, 2006, Kelly et al., 2008; Garzón et al., 2008; Zhang et al., 2009). No obstante, la tolerancia al efecto analgésico es una propiedad que se mantiene en todo este grupo farmacológico, incluyendo tanto a los fármacos que promueven una rápida desensibilización del receptor μ , como los que no lo hacen.

En esta línea, se ha observado que la β -arrestina juega un papel clave. Originalmente se creía que esta proteína de "andamiaje" se encargaba exclusivamente de impedir la interacción entre el receptor y la proteína G, y de reclutar la maquinaria endocitótica en la cara interna de la membrana plasmática. En cambio, esta proteína multifuncional es capaz de mediar una señalización independiente de proteína G. Las β -arrestinas, al translocarse a la membrana y acoplarse al receptor fosforilado, pueden reunir numerosas proteínas de señalización intracelular, tales como las MAPKs (Ferguson et al., 1996; Daaka et al., 1998; figura 1-4). Recientemente, se ha descrito que la estimulación del receptor opioide δ induce la traslocación de la β -arrestina 1 al núcleo celular, donde coordinaría la remodelación la condensación de la cromatina para reprogramar la expresión de ciertos genes (Kang et al., 2005). El papel funcional de estas proteínas de andamiaje en la acción de los opiáceos ha sido puesto de manifiesto tras la generación de ratones "knockout" para la β -arrestina 2. Estos animales presentan una potenciación del efecto analgésico y una disminución en la

adquisición de tolerancia a la morfina, sin que las propiedades reforzantes de los opiáceos se vean afectadas (Bohn et al., 1999, 2000).

Estas observaciones, en conjunto, sugieren que los mecanismos moleculares responsables de la tolerancia a los opiáceos (y a otras sustancias adictivas) dependen de la señalización (independiente de proteína G) mediada por β -arrestina y sus consecuencias sobre la plasticidad neuronal, más que por el hecho de la internalización o no del receptor opioide. Es por ello por lo que la industria farmacéutica se centra en generar nuevos agonistas "sesgados" para el receptor opioide μ , que señalicen con mayor preferencia por la vía dependiente de proteína G, sin estimular la señalización mediada por β -arrestinas (Rajagopal et al., 2010). El papel de estas cascadas de señalización en fenómenos de neuroprotección y neuroplasticidad se discute más detalladamente en el siguiente apartado.

LA ADICCIÓN A OPIÁCEOS

La adicción a opiáceos es un trastorno crónico con graves consecuencias no sólo para el individuo que la padece, sino también para toda la sociedad por sus implicaciones sanitarias, económicas y delictivas. La prevalencia de este trastorno durante la pasada década en individuos de entre 15 y 64 años fue del 0.4% (United Nations Office on Drugs & Crime, 2008), cifra que asciende al 1.7% si se focaliza en individuos de 19 a 30 años. Además, el 18.7% de los jóvenes reconocen haber probado alguna vez algún opiáceo (Johnston et al., 2008). Por tanto, es fundamental que los estados inviertan en conocer con mayor precisión este problema social desde todas las perspectivas para elaborar mejores estrategias de prevención y tratamiento de las adicciones.

Las primeras teorías sobre la adicción a las distintas sustancias de abuso postulaban que un individuo consume inicialmente una determinada droga por su habilidad de producir cierto efecto placentero (es decir, la "recompensa"), y que la dependencia se desarrolla como consecuencia de la búsqueda recurrente de dicha recompensa (véase p. ej. Wise, 1980). Esta idea del refuerzo positivo inducido por la droga ha sido ampliamente aceptada como el principal factor bajo el que subyacen las diversas drogodependencias (Feltenstein y See, 2008). Además, todas las sustancias de abuso producen tolerancia tras un consumo repetido, reduciendo los efectos positivos del consumo y conduciendo eventualmente al sujeto a incrementar la dosis auto-administrada, en un esfuerzo para compensar la pérdida del estímulo placentero (recompensa), apareciendo así algunas de las alteraciones

neurofisiológicas y conductuales prototípicas de la adicción. De forma paralela, algunos fármacos de abuso, incluyendo a los opiáceos y psicoestimulantes, también pueden promover el fenómeno opuesto a la tolerancia, conocido como “sensibilización”, sobre distintos aspectos conductuales y neuroquímicos: esto es, la ganancia o potenciación de un efecto tras el consumo repetido de la sustancia (Kalivas y Stewart, 1991; Anagnostaras y Robinson, 1996). Además, el abuso prolongado de la droga finalmente resulta en la aparición de síntomas psicológicos y fisiológicos aversivos cuando la administración de la sustancia es interrumpida, obligando al individuo a perpetuar su consumo con el fin de que dichos síntomas negativos inducidos por la abstinencia no aparezcan de nuevo. Este fenómeno ha sido descrito como refuerzo negativo (Camí y Farré, 2003). Aunque ambas teorías del refuerzo positivo y negativo aportan algunos elementos para comprender la iniciación y mantenimiento del consumo de las drogas de abuso, son insuficientes para explicar ciertas conductas asociadas a la drogodependencia, tales como la búsqueda compulsiva de la sustancia y el regreso a su consumo (recaída) incluso después de períodos en ausencia de droga sobradamente suficientes como para disipar cualquier síntoma del síndrome de abstinencia.

Así pues, las teorías más recientes sobre la complejidad del proceso adictivo tratan de abordar este trastorno como un fenómeno en el que las adaptaciones neuroquímicas tras el consumo abusivo y prolongado de estas sustancias juegan un papel esencial en los trastornos cognitivos y conductuales descritos en los adictos (Hyman, 2005; Feltstein y See, 2008; Kalivas y O’Brien, 2008; Thomas et al., 2008). En este contexto, varias teorías se han centrado en aspectos particulares de las adaptaciones neurológicas inducidas por las drogas de abuso que podrían explicar la naturaleza tan persistente de la conducta adictiva. Un aspecto principal en estas teorías es la formación de hábitos y la presencia de un contexto asociados al momento del consumo, los cuales se postula que potencian la aparición de cambios neuroadaptativos (Wise, 2002; Everitt y Robbins, 2005; Volkow et al., 2006), incluyendo cambios en regiones cerebrales como la corteza prefrontal que podrían alterar la capacidad de toma de decisiones (Jentsch y Taylor, 1999; Franklin et al., 2002; Goldstein y Volkow, 2002) o las habilidades de aprendizaje y memoria (Di Chiara, 1999; Hyman y Malenka, 2001; Hyman 2005).

Hoy día, la adicción se encuentra recogida dentro del Manual Diagnóstico y Estadístico de los Trastornos Mentales (DSM-IV; American Psychiatric Association). No obstante, ante las

definiciones confusas de ciertas condiciones como dependencia, abuso o adicción, distintas sociedades americanas publicaron un documento consensuado cuyo objetivo es la unificación de criterios en el empleo de estos términos (Savage et al., 2001). Así, la adicción queda definida de la siguiente manera:

"... La adicción es un trastorno neurobiológico primario y crónico, cuyo desarrollo y manifestación están influenciados por factores genéticos, psicosociales y ambientales. Se caracteriza por la aparición de una o más de las siguientes conductas: incapacidad para controlar el uso de la droga, toma compulsiva, uso continuado a pesar de los perjuicios que en el individuo causa y ansiedad por la ausencia o búsqueda desesperada [craving] de la droga..."

Substratos biológicos de la adicción

La naturaleza restringida de las sustancias capaces de inducir a su abuso, y el hecho de que todas ellas lo hacen también en modelos animales de auto-administración, indica la existencia de un substrato biológico común a todas ellas en el ciclo de adicción. Si bien es cierto que el sistema dopaminérgico mesocorticolímbico media la recompensa y, posiblemente, los síntomas aversivos que conducen a la búsqueda compulsiva de la droga y la recaída, no todas las conductas que definen el cuadro fisiopatológico del adicto pueden ser explicadas a través de la teoría dopaminérgica de la adicción. Por ejemplo, se ha demostrado una íntima conexión entre las proyecciones noradrenérgicas del locus caeruleus no sólo con los síntomas físicos y psicológicos asociados al síndrome de abstinencia a opiáceos (Aghajanian et al., 1978; Aghajanian, 1978; revisado en Maldonado, 1997), sino también en la mediación de la recompensa (revisado en Weinshenker y Schroeder, 2007) y otros aspectos relevantes de la adicción (p. ej., Meana et al., 2000). De hecho, el tratamiento más efectivo hoy día para la supresión los síntomas físicos del síndrome de abstinencia en procesos de desintoxicación para heroinómanos es la administración de clonidina (véase Lingford-Hughes et al., 2004; O'Brien, 2006), un agonista del adrenoceptor α_2 . Además, los sistemas serotoninérgico y glutamatérgico, así como la liberación de glucocorticoides y factores tróficos, participan en la etiología y/o sintomatología de la adicción a las drogas. Así pues, es necesario abordar el proceso adictivo como una patología multisistémica del SNC en la que las adaptaciones a largo plazo producidas por la exposición repetida a una sustancia química exógena conducen al adicto a la búsqueda y consumo compulsivo de dicha sustancia. Puesto que este trastorno

afecta finalmente al autocontrol y a la capacidad de tomar de decisiones, parece de especial interés estudiar (sobretudo en humanos) las alteraciones producidas por estas sustancias en aquellas regiones cerebrales que medien estas conductas. La corteza prefrontal, por tanto, es de particular relevancia en este contexto porque, además de participar en control cognitivo sobre la toma de decisiones (y/o control sobre el consumo de drogas; Moghaddam y Homayoun 2008), forma parte del sistema dopaminérgico mesocorticolímbico que media los efectos reforzantes de los opiáceos (Volkow et al., 2003; Everitt et al., 2007; Schoenbaum y Shaham, 2008) y recibe proyecciones noradrenérgicas del locus caeruleus y serotoninérgicas del rafe implicadas en la patología de la adicción. De hecho, ha sido observado que la exposición crónica a morfina en ratas resulta en cambios estructurales y morfológicos en neuronas corticales que podrían explicar disfunciones cognitivas y cambios neuroadaptativos asociados al consumo prolongado de este tipo de sustancias (Skclair-Tavron et al., 1996; Robinson y Kolb, 1999; Robinson et al., 2002; Spiga et al., 2003; Liao et al., 2005; Ballesteros-Yáñez et al., 2007).

Uno de los hallazgos clave para la comprensión de las bases biológicas del proceso adictivo es el descubrimiento de la plasticidad neuronal. Según este concepto, las neuronas ya no son un grupo de células fijas, cuyas únicas variables, tras su génesis, consisten exclusivamente en la modulación del receptor y la liberación del neurotransmisor, si no que son entidades capaces de reprogramar, como consecuencia de estímulos endógenos y exógenos, su expresión génica, citoarquitectura, tamaño y forma, arborización dendrítica y axonal, etc., proporcionando una respuesta adaptativa ante variaciones en el medio (Nestler, 1992; Williams et al., 2001; McClung y Nestler, 2008). Esta capacidad del tejido cerebral es, en definitiva, un mecanismo adaptativo que media, entre otras funciones, el aprendizaje y la memoria a través del sistema de recompensa (Schultz et al., 1997). De hecho, hoy comprendemos la adicción a las distintas sustancias de abuso como una enfermedad que afecta a estos circuitos (Hyman, 2005). Por tanto, en la adicción, comprendida como un proceso biológico de exposición crónica a una sustancia exógena capaz de interactuar con moléculas endógenas (dianas farmacológicas), las respuestas adaptativas de las neuronas, a nivel individual y colectivo, son concebidas como formas diversas de neuroplasticidad (Nestler y Aghajanian, 1997). Así, se puede hablar jerárquicamente de plasticidad sináptica, neuronal, estructural y conductual. En este contexto, es de especial relevancia hallar correlaciones entre los fenómenos de neuroplasticidad a distintos niveles.

A continuación, se describen algunos de los descubrimientos más relevantes que han evidenciado el proceso adictivo como una forma de adaptación del SNC ante los diversos estímulos exógenos que son los fármacos de abuso, poniendo de manifiesto la estrecha relación entre el fenómeno de la plasticidad neuronal, ligado al aprendizaje y la memoria, y la adicción a las drogas.

Evidencias neurofisiológicas y teoría dopaminérgica de la recompensa

En las últimas décadas ha existido un interés especial en comprender los mecanismos mediante los cuales nuestro cerebro es capaz de procesar y memorizar los estímulos placenteros y cómo estas memorias motivacionales son integradas en hábitos o conductas con el fin de experimentar nuevamente dicho estímulo. La búsqueda de los substratos cerebrales que median la recompensa se iniciaron con el descubrimiento de la auto-estimulación intracraneal (ICSS), que permitió observar que ratas que habían sido previamente implantadas con electrodos en ciertas regiones cerebrales, tales como el hipotálamo lateral, eran capaces de aprender a presionar la palanca adecuada para recibir descargas eléctricas que, presumiblemente, les producían sensaciones placenteras (Olds y Milner, 1954). Más tarde, se demostró que las regiones capaces de producir este refuerzo positivo se extendían desde el hipotálamo lateral hasta el tegmento ventral del mesencéfalo (Crow y Deakin, 1978). Pero los mayores avances para comprender los resultados de los estudios de ICSS tuvieron lugar tras la determinación de la especificidad farmacológica del sistema de recompensa. Desde el campo de la Neurofarmacología se observó que diversas sustancias psicotrópicas, que actúan sobre neuronas catecolaminérgicas, incluyendo antipsicóticos (clorpromacina), reserpina o ciertos psicoestimulantes (cocaína y anfetaminas), eran capaces de ejercer gran influencia sobre este sistema (Olds et al., 1956; Stein, 1964). Además, también fue clave la observación de que, en primates, los estímulos naturales (agua y alimento) activaban neuronas dopaminérgicas localizadas en el mesencéfalo, estriado (caudado, putamen y núcleo accumbens) y corteza orbitofrontal (revisado en Schultz, 2005).

Finalmente, estudios electrofisiológicos y de microdiálisis han permitido determinar con mayor detalle los componentes del sistema dopaminérgico mesocorticolímbico que median la recompensa (figura 1-5). Este substrato está ubicado en el sistema límbico, una estructura cerebral mal definida anatómicamente, pero que fisiológicamente es de gran relevancia al gestionar la emoción, la motivación y la memoria, e integrarlas para dar una respuesta adaptativa única, capaz de preservar la homeostasis del individuo.

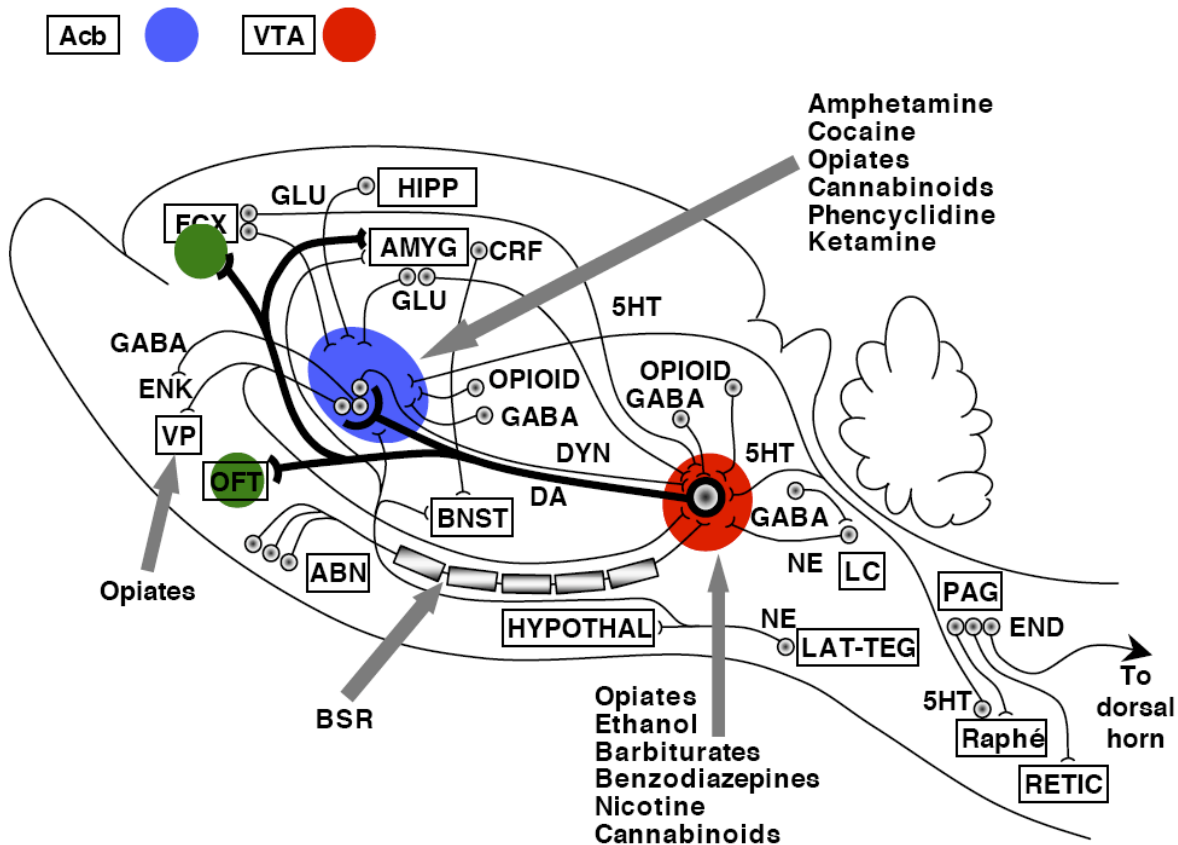


Figura 1-5. Sistema dopaminérgico mesocorticolímbico implicado en la recompensa y el refuerzo positivo, y otros sistemas asociados al proceso adictivo en el cerebro de mamíferos. Las proyecciones dopaminérgicas del área ventral del tegmento (VTA; sombreado en rojo) se encuentran resaltadas con líneas de mayor grosor. El núcleo accumbens (Acb) ha sido sombreado de azul. Las principales dianas de los distintos fármacos de abuso han sido señaladas con flechas grises. Tomado de Gardner, 2005.

Regiones cerebrales. (recuadradas) ABN, haz prosencefálico medial; Acb, núcleo accumbens, AMYG, amígdala; BNST, núcleo del lecho de la estría terminal; FCX, corteza frontal; HIPP, hipocampo; HYPOTHAL, hipotálamo; LAT-TEG, grupo de células del tegmento noradrenérgico lateral; LC, locus caeruleus; OFT, tubérculo olfatorio; PAG, materia gris periacueductal; Raphé, núcleo del Rafe del tallo cerebral; RETIC, retículo del tallo cerebral; VP, pálido ventral; VTA, área ventral del tegmento.

Neurotransmisor implicado. (no recuadrado) 5HT, 5-hidroxitriptamina (serotonina); BSR, región de inducción de ICSS; CRF, factor de liberación de corticotropina; DA, dopamina; DYN, dynorphin; END, endorphin; ENK, enkefalin; GABA, ácido γ -aminobutírico; GLU glutamato; NE, norepinefrina (noradrenalina); OPIOID, péptido opioide endógeno.

Este circuito se pone de manifiesto por la activación (mediada por diversos estímulos exógenos) de neuronas dopaminérgicas localizadas en el área ventral del tegmento (VTA), que proyectan a la corteza prefrontal (PFC), núcleo accumbens (NAc) y amígdala (Amy), donde la liberación de dopamina en el terminal presináptico promueve el aprendizaje y media la sensación de placer. Curiosamente, todas las sustancias de abuso tienen la propiedad de activar las neuronas dopaminérgicas del VTA, una acción que, en el caso de los opiáceos, es consecuencia de la hiperpolarización de las interneuronas GABAérgicas del VTA, cuya liberación de GABA inhibe tónicamente a las neuronas de proyección dopaminérgicas (Johnson y North, 1992; Nader y van der Kooy, 1997). Además, los opiáceos actúan

directamente en el NAc en la PFC para inducir recompensa independientemente de los estímulos dopaminérgicos del VTA (Ventura et al., 2005).

Además, existen diferencias importantes entre la liberación de dopamina inducida por las sustancias adictivas y la inducida por estímulos naturales. En primer lugar, la liberación promovida por las drogas de abuso es de mayor amplitud y duración que la que pueda ser alcanzada por cualquier otro estímulo; es decir, las propiedades químicas de estas sustancias conducen la liberación de dopamina más allá de los límites fisiológicos mediante la manipulación farmacológica de los sistemas homeostáticos impuestos por nuestra biología. Además, en contraste con la marcada tolerancia experimentada tras repetidos estímulos naturales, la exposición crónica (dosis crecientes) a las sustancias adictivas no reduce la magnitud de la liberación de dopamina. De este modo, en el caso de estímulos naturales, una vez que el sujeto ha aprendido la conducta más eficiente para conseguir la recompensa, la liberación de dopamina que facilita el aprendizaje no es necesaria y, por tanto, no ocurre (Schultz, 2004). Es importante destacar que la señal dopaminérgica es sensible al condicionamiento pavloviano (Schultz, 1998). Por ejemplo, cuando la ingesta de alimento ha sido asociada a un condicionante, la aparición del condicionante por sí mismo desencadena la liberación de dopamina. Así pues, la liberación fisiológica de dopamina parece cumplir dos funciones esenciales: facilitar el aprendizaje inicial para lograr una respuesta adaptativa ante un estímulo importante; y recuperar la información necesaria para ejecutar la conducta aprendida ante una circunstancia ambiental asociada al estímulo. Por el contrario, cada vez que la droga es administrada, la liberación de dopamina es precipitada de forma abrupta sobre las dianas del VTA, donde se promueven nuevos aprendizajes, incrementando la asociación entre la sustancia adictiva y el entorno (revisado en Kalivas y O'Brien, 2008).

El NAc es, según muchos autores (véase p. ej. Carlezon y Thomas, 2009), el substrato donde se integran todos estos estímulos (droga y entorno) y se gestiona el aprendizaje de nuevos hábitos que conduzcan a experimentar nuevamente los estímulos reforzantes. Este núcleo se compone, en su gran mayoría (90-95%), de neuronas de proyección GABA (las llamadas "medium spiny neurons"; MSNs). Existen dos subpoblaciones de MSNs, que componen las vías "directa" e "indirecta" (Gerfen et al., 1990; Surmeier et al., 2007). Las MSNs de la vía directa co-expresan receptores D1 de dopamina (D1-DR) y el péptido opioide endógeno dinorfina, y proyectan de vuelta sobre la región mesencefálica (VTA y sustancia negra). Por contra, las MSNs de la vía indirecta co-expresan predominantemente receptores D2 de

dopamina (D2-DR) y encefalinas, y proyectan al mesencéfalo de forma indirecta, principalmente a través del pálido ventral (VP) y del núcleo subtalámico (véase figura 1-5). Dado que el D1-DR se encuentra acoplado a proteínas Gs, el estímulo reforzante tiende a excitar las MSNs de la vía directa. Una actividad elevada de estas células incrementaría eventualmente la liberación de GABA y dinorfinas en la región mesencefálica, apagando así la actividad dopaminérgica inducida por el estímulo, en lo que sería un circuito de retroalimentación negativa. En cambio, el D2-DR se halla asociado a proteínas Gi. Las MSNs de la vía indirecta, las cuales inhiben tónicamente la estimulación de las neuronas del VP, quedarían inhibidas tras el estímulo, resultando en una activación talámica promovida por neuronas del VP (Kelley, 2004). Además, las MSNs de las vías directa e indirecta reciben proyecciones glutamatérgicas de distintas áreas prosencefálicas, incluyendo la corteza prefrontal, el hipocampo y de la amígdala. Así pues, estas células deben asimilar estímulos excitatorios e inhibitorios de las regiones límbicas y corticales para generar respuestas que integren las emociones con la percepción y el pensamiento racional (Carlzeron y Thomas, 2009).

Por otra parte, LC parece el principal responsable de la aparición de los síntomas negativos durante la abstinencia a opiáceos (Aghajanian, 1978; Maldonado, 1997). El LC es el centro nervioso desde el cual parten la mayoría de fibras noradrenérgicas del cerebro, proyectando sobre núcleos importantes para el sistema de recompensa, como son el VTA y la PFC (figura 1-5). Además, presenta una elevada densidad de receptores opioides. La administración aguda de morfina inhibe la liberación de noradrenalina en los lugares donde el LC dirige sus proyecciones. En cambio, después de la administración repetida o crónica de esta sustancia se manifiesta la tolerancia a este efecto y, tras la retirada del opiáceo, se produce una liberación masiva de noradrenalina en las regiones corticales, la cual promueve las conductas estereotípicas asociadas al síndrome de abstinencia (Rasmussen et al., 1990).

Otros mecanismos implicados en la aparición de este síndrome son los sistemas asociados al estrés. En este sentido, se ha observado un incremento en la densidad extracelular del factor de liberación de corticotropinas (CRF) en la amígdala, así como en el eje hipotálamo-hipófisis, de ratas dependientes de morfina tras la retirada del opiáceo (Kreek et al., 1984).

Estos fenómenos de refuerzo positivo y negativo son suficientes para explicar el inicio y mantenimiento del consumo de drogas y, en parte, podrían asentar ciertas bases de otros fenómenos como la tolerancia y la dependencia. Sin embargo, son insuficientes para

demostrar por sí mismos el carácter recidivante de la adicción después de largos periodos en ausencia de la droga. Por ello es fundamental explorar otros substratos que expliquen los trastornos cognitivos a largo plazo asociados a la recaída de los individuos desintoxicados. En este sentido, la corteza prefrontal parece una diana esencial de esta enfermedad (Hyman, 2005), la cual no ha sido suficientemente explorada.

Evidencias morfológicas y estructurales

Estudios de neuroimagen han puesto de manifiesto la existencia de alteraciones estructurales inducidas por el consumo prolongado de heroína y otros opiáceos. Por ejemplo, se han descrito pérdidas del volumen cortical en sujetos dependientes de morfina (Pezawas et al., 1998), reducciones en la densidad de la materia gris en ambos lóbulos de las cortezas temporal y prefrontal (Lyo et al., 2006), así como una actividad sináptica y metabólica y un flujo sanguíneo reducidos en diversas regiones corticales (revisado en Licata y Renshaw, 2010). Estas alteraciones implican cambios a nivel macroscópico cuyo origen es todavía una incógnita, y podrían ser un reflejo de los efectos microscópicos de los opiáceos. Además, las consecuencias de estos daños corticales podrían ser el origen de las alteraciones conductuales y cognitivas observadas en estos individuos. Estos hallazgos se discuten más adelante en el contexto de un posible incremento de la tasa apoptótica de células corticales.

A nivel morfológico, se ha observado que, de forma opuesta a los psicoestimulantes, los opiáceos reducen la densidad de espinas dendríticas, así como la arborización dendrítica y el volumen de neuronas dopaminérgicas del VTA y/o de células piramidales de la corteza frontal (Skclair-Tavron et al., 1996; Robinson y Kolb, 1999; Robinson et al., 2002; Spiga et al., 2003; Liao et al., 2005; Ballesteros-Yáñez et al., 2007; Russo et al., 2007). Se ha sugerido que esta reducción es debida a cambios adaptativos en la citoarquitectura neuronal, sostenida por diversos complejos proteicos en los que participan proteínas de tipo estructural (principalmente actinas y neurofilamentos) y otras proteínas reguladoras (MAPKs, fosfolipasas, cdk5, Akt, Arc, etc.) (véase figura 1-6; revisado en Thomas et al., 2008; Russo et al., 2009). Algunos autores apuntan a que estas adaptaciones de las neuronas pueden estar originadas por la liberación de factores tróficos, principalmente el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), el cual ejerce su actividad a través de receptores con actividad tirosina kinasa (TKRs), entre los que destacan el receptor relacionado con la kinasa de tropomiosina (Trk) y el receptor de neurotrofina p75 (p75NTR) (véase figura 1-6; revisado en

Pierce y Bari, 2001; Bolaños y Nestler, 2004; Russo et al., 2009). El papel de éstas y otras proteínas reguladoras en los mecanismos de adicción a opiáceos se discute a continuación.

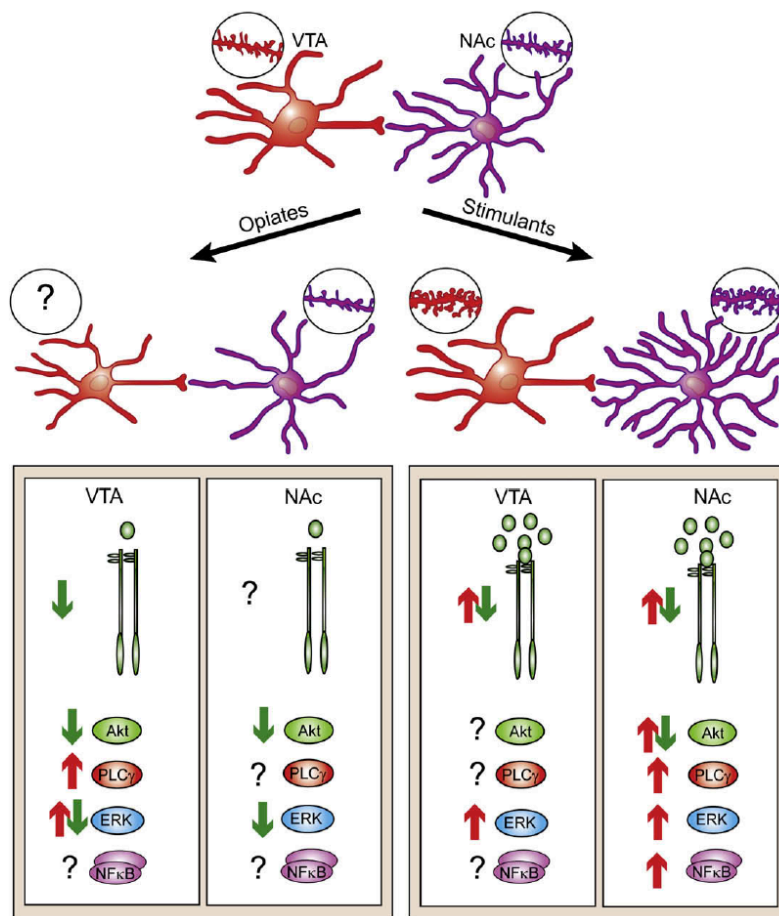


Figura 1-6. Efecto diferencial de los psicoestimulantes y los opiáceos sobre la densidad de las espinas dendríticas en neuronas de proyección dopaminérgica del VTA y MSNs del NAc, y principales vías de señalización asociadas. Mientras que, de forma crónica, los opiáceos tienden a reducir el número de espinas dendríticas, así como la densidad y/o actividad de los Trk y de las vías de señalización a través de las cuales ejerce su actividad, los psicoestimulantes parece que actúan de forma diametralmente opuesta. Tomado de Russo et al., 2009.

Evidencias moleculares

Las alteraciones macroscópicas estructurales y morfológicas de las neuronas son posiblemente una consecuencia de cambios a nivel molecular (Robinson y Kolb, 1999, 2004; Russo et al., 2009). La citoarquitectura de las neuronas puede verse comprometida por la exposición continuada a las distintas sustancias de abuso, lo cual implicaría disfunciones cognitivas y conductuales. La estructura neuronal no es inalterable, sino que existe cierta plasticidad en estas células, la cual permite una flexibilidad para establecer nuevas conexiones sinápticas con distintas neuronas o eliminar las ya existentes, generando, eventualmente, nuevos recuerdos, aprendizajes y conductas. Las drogas tienen la propiedad de interferir en estos sistemas endógenos de aprendizaje. En primer lugar, se unen de forma específica a su diana farmacológica, comprometiendo de forma directa o indirecta la actividad de un receptor. Éste activa una o varias vías de señalización, compuestas por segundos mensajeros que amplifican la señal, y por proteínas efectoras (proteínas kinasas y otros enzimas) que

regulan la expresión de genes importantes en la función y estabilidad neuronal, y que pueden modificar la citoarquitectura de la neurona, las conexiones sinápticas, la frecuencia de descarga, etc. En esta sección se repasa de forma breve cada uno de estos sistemas.

Receptores y otras dianas farmacológicas

A mediados de los '70, tras el descubrimiento de los lugares de fijación específicos de los opiáceos (los receptores opioides), era ampliamente aceptado que la tolerancia a la morfina (reducción del efecto farmacológico tras administraciones repetidas) y la dependencia (expresada mediante el síndrome de abstinencia tras la retirada del opiáceo) podían ser sencillamente explicadas por los cambios en la densidad de receptores expresados en la membrana de las neuronas. Del igual manera podría razonarse la tolerancia y dependencia a la cocaína como una alteración en la densidad de su diana farmacológica, el transportador de dopamina. Los estudios en cultivos celulares expresando receptores opioides apuntaban hacia la misma teoría sobre la tolerancia a la morfina (Chang et al., 1982; Law et al., 1982). No obstante, la inmensa cantidad de literatura sobre tolerancia y dependencia en modelos animales (p. ej. Rogers y el-Fakahany, 1986) o en estudios post mórtem de cerebro de adictos a opiáceos (Rothman et al., 1987; Gabilondo et al., 1994) no indicaba que la regulación de los receptores opioides pudiera explicar estos fenómenos conductuales. Hoy día se encuentra bastante asumido que estos fenómenos conductuales son consecuencia de algunas adaptaciones en los mecanismos "post receptor" (revisado en Nestler, 1992, 2004).

Vía del AMP cíclico

Como se ha mencionado anteriormente, los receptores opioides se hallan acoplados a proteínas Gi, las cuales tienen un efecto inhibitorio sobre la AC. Consecuentemente, en la mayoría de tipos celulares que expresan el receptor opioide μ , la morfina reduce los niveles de cAMP. En cambio, la exposición crónica de esta sustancia promueve la recuperación (tolerancia) de la concentración intracelular de cAMP, en un esfuerzo de la célula por compensar la pérdida de función (revisado en Nestler, 1992; Nestler y Aghajanian, 1997; Maldonado, 1997). Esta adaptación involucra la sobre-expresión de proteínas G, adenilato ciclasas, proteína kinasa dependiente de cAMP (PKA) y, probablemente, otros componentes de esta cascada de señalización, incluyendo el factor de transcripción CREB ("cAMP response-element binding protein"). La retirada del opiáceo (abstinencia) promueve un nuevo empuje hacia la producción de cAMP, pues se suprime el freno que impone la morfina. Existen actualmente evidencias de que este modelo ocurre en neuronas noradrenérgicas de

proyección del locus caeruleus (Nestler 1992; Maldonado et al., 1995), en las que incrementos de cAMP y la actividad kinasa de la PKA promueven un aumento en la frecuencia de descarga de estas neuronas en la corteza cerebral (Alreja y Aghajanian, 1993). Esto podría explicar el incremento de neurotransmisión noradrenérgica y el comportamiento asociado al síndrome de abstinencia.

También se han observado alteraciones de la vía del cAMP similares en el NAc. No obstante, en este núcleo, el incremento de los componentes de esta vía no es consecuencia exclusiva de la activación crónica de los receptores opioides, sino que también esta inducida por la activación de receptores de dopamina. En esta región, se cree que la sobre-expresión de la PKA durante la dependencia a opiáceos, y la consecuente activación de los genes regulados por el elemento de respuesta a cAMP (CRE) a través de la fosforilación de CREB, es uno de los fenómenos más importantes para el desarrollo de la dependencia a estas sustancias (Nestler 1992, 2004; Hyman et al., 2006; Kalivas y O'Brien, 2008; Christie, 2008). Uno de los genes subordinados a CRE es el gen que codifica la prodinorfina. Las MSN de la vía directa, como se ha descrito anteriormente, representan un bucle de retroalimentación negativa que apaga la señal dopaminérgica mediante la liberación de dinorfinas en el VTA. Durante el desarrollo de la dependencia y/o tolerancia a los opiáceos, la constante liberación de dinorfina sobre el VTA, como consecuencia de la citada sobre-expresión de la vía del cAMP en las neuronas del NAc, reduce la capacidad de liberación de dopamina tras la administración de una nueva dosis de la droga, conduciendo al individuo tolerante a incrementar la dosis para experimentar la sensación placentera. En individuos en etapas avanzadas de la adicción, la liberación de dopamina es prácticamente inexistente, por lo que se cree que los adictos tienen anulados los circuitos de la recompensa, un fenómeno que podría explicar la ausencia de motivaciones y los déficits de aprendizaje y memoria que padecen estos sujetos.

Sin embargo, en otras regiones cerebrales importantes para el circuito dopaminérgico de la recompensa, tales como la corteza prefrontal, no se ha podido asociar la sobre-expresión de la maquinaria del cAMP al fenómeno de la adicción (Ferrer-Alcón et al., 2004). Es necesario, por tanto, hallar nuevas alteraciones en estas regiones que puedan explicar las conductas prototípicas del adicto (*craving*, recaída) observadas después largos periodos de tiempo tras su desintoxicación.

Señalización del Ca^{2+}

La activación de los receptores opioides también bloquea los canales de calcio, inhibiendo la entrada de este ión en la neurona. El ión Ca^{2+} es otro segundo mensajero que regula la actividad de diversas cascadas de señalización intracelular. Entre ellas, destaca la activación de PKC. Se ha observado una hiperactividad de este enzima en animales tolerantes (pero no dependientes) a los opiáceos (Narita et al., 1994a), mientras que en la corteza cerebral de ratas dependientes (y tolerantes) a la morfina, así como en la corteza prefrontal de adictos a opiáceos, varias formas e isoformas de PKC son sobre-expresadas (Busquets et al., 1995; García-Sevilla et al., 1997). Además, se ha demostrado que la inhibición farmacológica de esta proteína kinasa previene la adquisición de tolerancia al efecto analgésico de distintos opiáceos (Narita et al., 1994b), y atenúa las propiedades reforzantes de la morfina (Narita et al., 2001). Sin embargo, la inhibición de PKC no altera la aparición de la dependencia física a los opiáceos (Gabra et al., 2008). La importancia de PKC reside en su enorme capacidad para fosforilar substratos muy diversos. Entre las dianas de esta kinasa destacan el receptor opioide μ , receptores de glutamato, c-Raf (la MAPKKK de ERK1/2; véase más adelante), y otros substratos citosólicos y nucleares.

Otra proteína sensible a los niveles de Ca^{2+} intracelular es la Ca^{2+} /calmodulina (CaM), cuyo principal efector en el sistema nervioso es la CamKII. Al igual que PKC, la inhibición de CaMKII atenúa la tolerancia a la morfina (Fan et al., 1999; Lou et al., 1999). Esta kinasa, entre otras de sus numerosas funciones, regula la apertura y composición de los receptores de glutamato ionotrópicos, incluyendo los receptores del ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropionico (AMPA) y N-metil-D-aspartato (NMDA). De este modo, los opiáceos pueden influir sobre la excitabilidad (potenciación/depresión) de las neuronas a largo plazo (LTP/LTD), fenómenos asociados a la plasticidad neuronal. Por otra parte, la CaM es un potente activador de las adenilato ciclasas 1 y 8. Por tanto, la inhibición inicial de la producción de cAMP por los agonistas opiáceos (a través de la proteína Gi/o), se ve reforzada por el cierre de los canales de Ca^{2+} , y consecuente inhibición de la CaM.

Los fosfoinosítidos

Los fosfoinosítidos son fosfolípidos que actúan como precursores de algunos segundos mensajeros. El más relevante es el fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP_2). La estimulación del receptor opioide y liberación de las subunidades $\beta\gamma$ de la proteína Gi/o, promueve la activación de algunas fosfolipasas, de entre las cuales, el mejor representante es la fosfolipasa

C (PLC). La actividad de la PLC consiste en hidrolizar el PIP_2 para dar lugar a dos segundos mensajeros, inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3) y 1,2-diacilglicerol (DAG). El IP_3 media la liberación de calcio del reservorio presente en el retículo endoplasmático, mientras que el DAG es el responsable de la activación de PKC. Por tanto, a pesar del bloqueo de los canales de Ca^{2+} iniciado por la administración aguda de fármacos opiáceos, la señalización a través de estos segundos mensajeros promueve la movilización del Ca^{2+} intracelular y la activación independiente de Ca^{2+} de PKC mediante su interacción con DAG.

Curiosamente, la implicación de la PLC en los fenómenos conductuales asociados a la adicción a opiáceos no ha sido muy estudiada. Se conoce que animales deficientes en el gen que codifica la isoforma β_3 de la PLC presentan mayor sensibilidad al efecto analgésico de la morfina (Xie et al., 1999). Recientemente se ha descrito que un inhibidor específico de la subunidad $\beta\gamma$ (M119) es capaz de potenciar el efecto analgésico de los opiáceos, a la vez que se reduce la tolerancia y la dependencia a estos fármacos, en un mecanismo dependiente de la activación de $\text{PLC}\beta$ (Mathews et al., 2008).

Otro enzima que regula el metabolismo de los fosfoinosítidos es la fosfoinositol 3-kinasa (PI_3K). En tejido cerebral, esta proteína kinasa es activada por factores neurotróficos, tales como el BDNF (revisado en Russo et al., 2009). Tiene numerosos sustratos intracelulares, entre los que destaca la Akt y, además, es necesario para la activación de las MAPKs mediada por algunos factores tróficos. Se ha demostrado la asociación entre PI_3K con procesos de plasticidad estructural, remodelación de las espinas dendríticas, LTP/LTD y el aprendizaje y la memoria (revisado en Corominas et al., 2007). En el contexto de la adicción a las drogas, se ha demostrado que PI_3K es esencial para la expresión de la sensibilización a la cocaína (Izzo et al., 2002). Así mismo, la inhibición de la vía $\text{PI}_3\text{K}/\text{IRS2}/\text{Akt}$ redujo el refuerzo positivo y la sensibilización locomotora inducida por la morfina, y bloqueó la reducción del volumen de MSN de NAc provocada por esta droga (Russo et al., 2007).

Vías mitogénicas

Entre otras vías de señalización asociadas a los receptores opioides (y otros receptores acoplados a proteínas Gi), las cascadas de las proteínas kinasas activadas por mitógenos (MAPKs) han mostrado gran relevancia en las drogodependencias (Thomas et al., 2004; Thomas y Huganir, 2004; Girault et al., 2007). Existen tres principales representantes de las MAPKs: la kinasa regulada por señales extracelulares (ERK), la kinasa del dominio N-

terminal de c-Jun (JNK), y la MAPK de 38 kDa (p38). Curiosamente, todas ellas participan en la regulación del ciclo celular y la apoptosis y, aunque de forma discutible, ERK se postula como un factor anti-apoptótico, mientras que JNK y p38 MAPK son pro-apoptóticos (véase más adelante; y también en Xia et al., 1995; Kuan et al., 1999; Weng et al., 2007). La importancia de estas kinasas mitogénicas en el proceso adictivo, así como en otros procesos asociados a neuroplasticidad, reside en que presentan multitud de dianas citosólicas y nucleares, participando en la regulación génica y estructural de la neurona a corto y largo plazo.

La alteración de ERK1/2 (las dos isoformas principales de esta kinasa) en respuesta a drogas de abuso fue inicialmente observada en el VTA de ratas tras tratamientos crónicos con morfina o cocaína (Berhow et al., 1996). De forma aguda, numerosos tipos de fármacos (adictivos y no adictivos) son capaces de estimular la actividad de ERK1/2 en regiones cerebrales clave que median la recompensa, el aprendizaje y la memoria, la cognición y otras funciones cerebrales alteradas en adictos a estas sustancias (p. ej. véase Valjent et al., 2004). De forma similar al cAMP, tras la exposición crónica a algunas drogas de abuso, incluyendo opiáceos, la regulación aguda sobre ERK1/2 es compensada (tolerancia) con una reducción de su actividad, tanto en modelos animales como en cerebro humano post mórtem (Muller y Unterwald, 2004; Ferrer-Alcón et al., 2004), y en animales dependientes de opiáceos, la abstinencia precipitada por antagonista induce la hiperactivación de este enzima (Edwards et al., 2009). Además, la inhibición farmacológica de ERK1/2, así como la ablación génica de esta kinasa, han puesto de manifiesto su relevancia para las propiedades reforzantes de la morfina (Mazzucchelli et al. 2002, Valjent et al., 2006), sugiriendo que esta MAPK sería esencial en el proceso de tolerancia a la recompensa, un fenómeno (neuroplástico) que induce al adicto a incrementar la dosis auto-administrada para sentir el efecto placentero de la droga, conduciendo, eventualmente, a la adicción. No obstante, el papel de estas vías de señalización en el contexto de la adicción a drogas de abuso no está completamente elucidado, y se requiere más conocimiento sobre sus mecanismos de acción en relación con otras vías de señalización (véase revisiones interesantes en Thomas y Huganir, 2004; Girault et al., 2007; Zhai et al., 2008).

La conexión entre JNK y p38 con fenómenos de neuroplasticidad inducida por drogas de abuso ha sido menos explorada, aunque existen algunas evidencias de su participación en la señalización mediada por los receptores opioides (Fan et al., 2003; Cui et al., 2006).

Integración de señales: papel de DARPP-32

Uno de los modelos moleculares más recientes sobre la adicción a drogas implica la integración de las señales mediadas por algunas de las cascadas citadas en esta sección a través de una compleja maquinaria que involucra distintos estados de fosforilación de la fosfoproteína regulada por dopamina y cAMP de 32 kDa (DARPP-32; véase figura 1-7; revisado en Nairn et al., 2004; Svenningsson et al, 2005; Le Novère et al, 2008). Esta fosfoproteína se encuentra expresada en todas las neuronas dopaminoceptivas del sistema dopaminérgico de recompensa, y de forma especial ($\sim 50 \mu\text{M}$; Ouimet et al., 1998) en todas las MSN, tanto las de la vía directa como aquéllas pertenecientes a la vía indirecta. DARPP-32 funciona, según las evidencias experimentales *in vivo* e *in vitro*, como un amplificador de la señal de cAMP/PKA (figura 1-7).

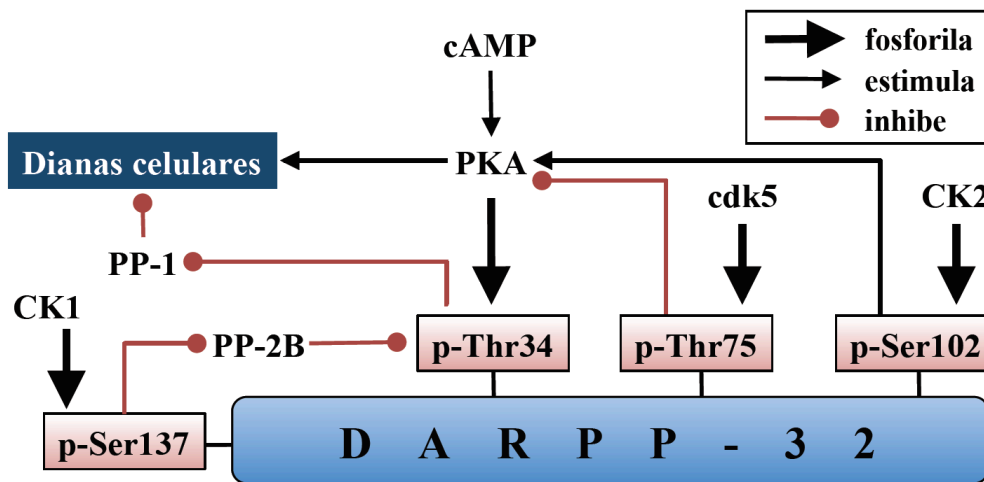


Figura 1-7. Mecanismo de señalización a través de la fosfoproteína regulada por dopamina y cAMP de 32 kDa (DARPP-32). cAMP, AMP cíclico; cdk5, kinasa 5 dependiente de ciclina; CK, caseína kinasa; p-Ser, fosfo-serina; p-Thr, fosfo-treonina; PKA, proteína kinasa A; PP-1, proteína fosfatasa-1; PP-2B, proteína fosfatasa-2B.

El incremento de cAMP en la célula activa a PKA, la cual fosforila a sus substratos iniciando la respuesta celular. Por contra, la proteína fosfatasa-1 (PP-1) es una potente fosfatasa que elimina rápidamente los fosfatos incorporados por PKA, atenuando su señal. Uno de los substratos de esta kinasa es la treonina 34 de la DARPP-32, la cual, una vez fosforilada, se convierte en un potente inhibidor de la PP-1. Este inhibidor, al estar en mayor abundancia que PP-1 (aproximadamente el doble), previene rápidamente la actividad fosfatasa. Así, la señal de la PKA es amplificada por su propia actividad. No obstante, la ventaja de este bucle de retroalimentación positiva es que permite una regulación muy fina gracias a la presencia de múltiples lugares de fosforilación dentro de la estructura de DARPP-32. La más importante es

la posición treonina 75, que, una vez fosforilada por la actividad de la kinasa 5 dependiente de ciclina (cdk5) se convierte en un inhibidor de la PKA. Esta fosforilación es dominante, es decir, independientemente de su estado de fosforilación en la Thr34, p-Thr75 DARPP-32 presenta afinidad por PKA, secuestrando su centro activo. DARPP-32 también ofrece dos serinas fosforilables, en las posiciones 102 y 137 de la proteína, las cuales son diana de las caseína kinasas (CK) 2 y 1, respectivamente. En estado basal, la fosforilación en estas dos posiciones es elevada. Ambas fosforilaciones contribuyen a incrementar la fosforilación en la Thr34, aunque de formas diferentes. La fosforilación en la Ser102 incrementa la eficiencia de la PKA, mientras que la p-Ser137 reduce la afinidad por DARPP-32 de la proteína fosfatasa-2B (PP-2A), la cual media la defosforilación de la p-Thr34.

El papel de esta proteína integradora en la adicción a las drogas (y a otras enfermedades que afectan a la neurotransmisión dopaminérgica) ha sido confirmado tras la generación de animales transgénicos con mutaciones puntuales o deficientes en esta molécula. Por ejemplo, de forma aguda, la morfina no estimula la locomoción en ratones DARPP-32-*knockout* ni en ratones cuya Thr34 ha sido substituida por alanina, aunque estas mutaciones no afectan a la sensibilización ni a las propiedades reforzantes de la morfina (Borgkvist et al., 2007). En cambio, la cocaína no parece producir recompensa en ratones deficientes en esta proteína (Zachariou et al., 2002, 2006).

Consecuencias en la expresión de genes

Todas estas cascadas de señalización tienen en común la capacidad llegar al núcleo (directa o indirectamente) y estimular de la transcripción de genes a través de la fosforilación de factores nucleares que pueden fijarse a distintos elementos de unión del ADN (figura 1-8). Esta capacidad es esencial en la respuesta adaptativa de las neuronas ante la exposición aguda y crónica a las sustancias de abuso. Uno de los primeros factores nucleares asociados a las drogodependencias fue la proteína de unión al elemento de respuesta a cAMP (CREB; Guitart et al., 1992). Como ya se ha mencionado, el incremento de los niveles de cAMP activa a PKA, la cual puede penetrar en el núcleo y fosforilar (activar) a CREB. Éste tiene la capacidad de estimular la transcripción de genes que presentan en su promotor el elemento de respuesta a cAMP (CRE). Se han descrito hasta 10 000 genes que portan este motivo de unión y que son inducidos por CREB, aunque la cantidad de ellos que pueden ser inducidos en las regiones cerebrales importantes en la adicción no está muy claro (revisado recientemente en Briand y Blendy, 2010). Entre ellos, la estimulación de la transcripción de dinorfina, del

factor de liberación de corticoides (CRF), BDNF o Arc parecen altamente relevantes en la inducción de cambios plásticos (Nestler, 2004). Además, CREB puede ser activado por otras proteínas, incluyendo MAPKs/ERK (a través de la kinasa R6 del ribosoma, RSK) o las quinasas dependientes de Ca^{2+} /calmodulina.

Otros factores de transcripción importantes en el fenómeno adictivo son Elk-1, c-Jun y el factor nuclear- κB (NF- κB). Todos ellos pueden ser dianas comunes de las MAPKs, y han sido implicados en la mediación de los fenómenos de plasticidad neuronal inducidos por ERK (revisado en Wang et al., 2007).

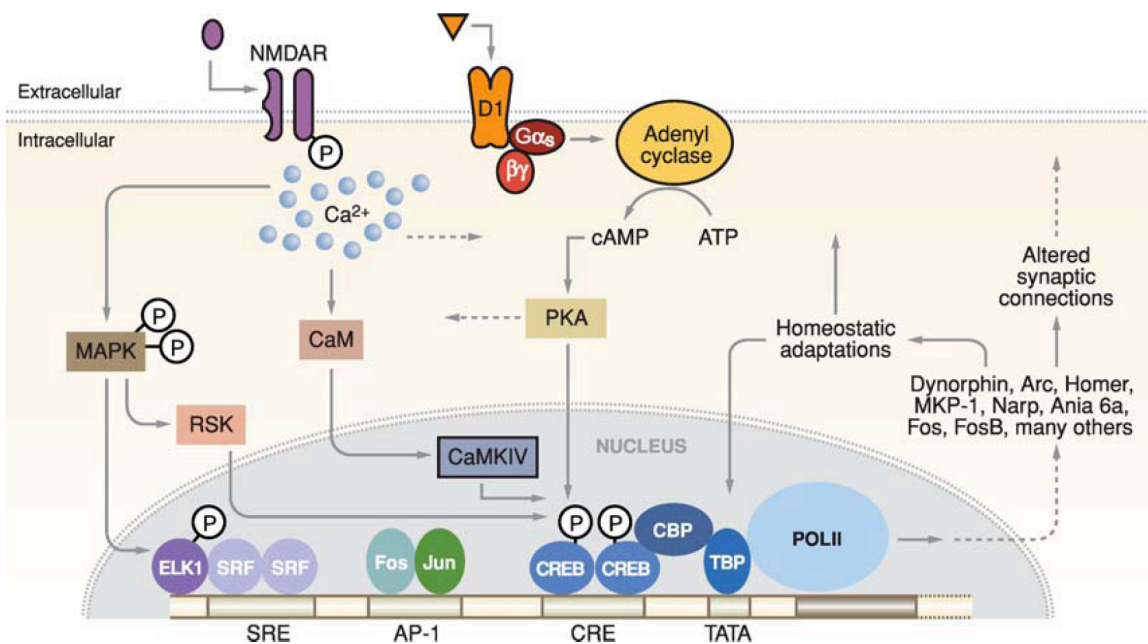


Figura 1-8. Modelo de los elementos de unión del promotor de c-Fos y regulación de los genes de expresión temprana por los receptores de dopamina y glutamato en neuronas del estriado. SRE, elemento de respuesta al suero, elemento de la proteína activadora-1 (AP-1) elemento de respuesta a cAMP (CRE) (tomado de Hyman et al., 2006).

No obstante, uno de los factores de transcripción mejor caracterizados en las drogodependencias es la familia de Fos. Un amplio rango de fármacos de abuso, incluidos los opiáceos, son capaces de incrementar la expresión de esta familia de proteínas en neuronas del NAc, y otras regiones implicadas en la adicción (revisado en Nestler et al., 2001; Nestler 2008). La transcripción de los miembros de esta familia puede ser inducida por CREB, Elk-1 o proteínas activadoras de tipo-1 (AP-1), como la familia Jun o la propia familia de Fos (figura 1-8). Estos factores de transcripción tienen una vida media corta (2-6 h), e inducen rápidamente la transcripción transitoria de muchos genes. Sin embargo, uno de sus miembros, FosB, posee la peculiaridad de generar un derivado truncado, el denominado ΔFosB , el cual

tiene una vida media de 1-2 días. Esta forma truncada de FosB puede ejercer las mismas funciones como factor nuclear que la forma nativa. Así pues, la exposición repetida a los opiáceos (y a otras sustancias) promueve la acumulación de Δ FosB en el núcleo de las neuronas, incrementando progresivamente el número de genes inducidos por Fos (Nestler, 2004). Este fenómeno podría ser un mecanismo molecular que origine respuestas conductuales de sensibilización a las drogas (Nestler, 2008).

SEÑALIZACIÓN APOPTÓTICA EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

La apoptosis, o muerte celular programada, es un mecanismo presente en todas las células de los vertebrados y regula el proceso de muerte de la célula. Es esencial durante el desarrollo de los seres vivos pluricelulares y para la homeostasis de los tejidos y órganos que conforman un organismo. En la mayoría de los tejidos de un vertebrado adulto y sano siempre existe un equilibrio entre la tasa mitótica y la apoptótica, con el fin de regenerarlos y evitar el estrés oxidativo. Sin embargo, en el sistema nervioso central (SNC), este balance entre la generación y destrucción de células se halla descompensado por la incapacidad de división de las neuronas maduras (véanse revisiones enfocadas a la apoptosis en el SNC: Kinloch et al., 1999; Nijhawan et al., 2000; Sharma et al., 2000; Yuan y Yankner, 2000; Sastry y Rao, 2000; Gupta, 2001a, 2001b).

Aunque había sido observado anteriormente, el término "apoptosis" (cuya etimología corresponde a una palabra griega que describe 'hojas cayendo del árbol') no fue acuñado hasta 1972, cuando se describió por primera vez un mecanismo intrínseco de un suicidio celular programado involucrado en el recambio normal de hepatocitos (Kerr et al., 1972). Estos autores fueron los primeros en realizar una clara distinción entre la morfología celular de la apoptosis y de la necrosis. A diferencia de la necrosis, la muerte celular programada se caracteriza por mantener la integridad de la membrana hasta el fin del proceso apoptótico, durante el cual la membrana se va arrugando a medida que el volumen celular disminuye. Mientras los contenidos lisosomales permanecen intactos, el fraccionamiento celular prosigue su curso formando los cuerpos apoptóticos, unas vesículas pequeñas unidas a la membrana que son fagocitadas por las células vecinas. Otra característica distintiva de la apoptosis a nivel bioquímico es la fragmentación de DNA. El proceso apoptótico en células es dependiente de energía y puede depender de la síntesis de nuevas proteínas, diferencia clave con la necrosis donde falla el suplemento de energía celular y la síntesis de proteína se interrumpe. Estos procesos morfológicos y bioquímicos que diferencian ambos tipos de

muerte celular se deben a la participación de un mecanismo molecular específico, incluyendo una familia de proteasas conocidas bajo el nombre de caspasas, y que conducen a la fragmentación nuclear y celular. Antes de la activación de estas vías efectoras de muerte, el balance entre vida/muerte de la célula está modulado por una compleja interacción entre los distintos activadores de muerte. Una vez la balanza se inclina hacia la muerte celular, los efectores de muerte empiezan a actuar.

La apoptosis en el tejido nervioso es un caso especial dentro de los complejos mecanismos de muerte celular. Durante el desarrollo embrionario de un vertebrado, las células progenitoras de las neuronas proliferan, migran y comienzan a diferenciarse a la vez que el axón y las dendritas se ramifican y establecen las conexiones sinápticas. Aquéllas que establecen conexiones fisiológicamente "útiles" reciben los factores neurotróficos que necesitan para su supervivencia, mientras que las neuronas cuya conectividad resulta "irrelevante" dejan de recibir estos factores y entran en apoptosis. La producción de neuronas durante el desarrollo es masiva, y se estima que tan sólo sobreviven un 50% de las neuronas maduras (Oppenheim, 1991). Esta actividad apoptótica desmesurada durante el desarrollo se va apagando durante la maduración del individuo, aunque no por completo. La importancia de la apoptosis en el SNC queda de manifiesto con la observación de que ratones deficientes en caspasa-3 desarrollan hiperplasia en el tejido cerebral alrededor del duodécimo día de gestación, y mueren antes del nacimiento (Kuida et al., 1996). Numerosas patologías están asociadas a la alteración de los mecanismos apoptóticos en el SNC (p. ej. enfermedades neurodegenerativas; Nijhawan et al., 2000; Sastry y Rao, 2000). En el contexto de la adicción a drogas de abuso, la alteración de los mecanismos apoptóticos podría jugar un papel relevante en los trastornos cognitivos y conductuales prototípicos del adicto (revisado en Cunha-Oliveira et al., 2008). No obstante, el potencial efecto neurotóxico de estas sustancias, y en concreto de los opiáceos, es un tema todavía debatido. Antes de debatir con mayor profundidad este asunto, se describirán brevemente los principales mecanismos de muerte celular que han sido descritos en mamíferos. En resumen, la apoptosis puede ser desencadenada por la vía extrínseca o por la vía intrínseca. Ambas cascadas apoptóticas convergen en la activación de los mecanismos efectoras de muerte, los cuales ejecutan el fraccionamiento cromosómico y la aparición de los apoptosomas (figura 1-9).

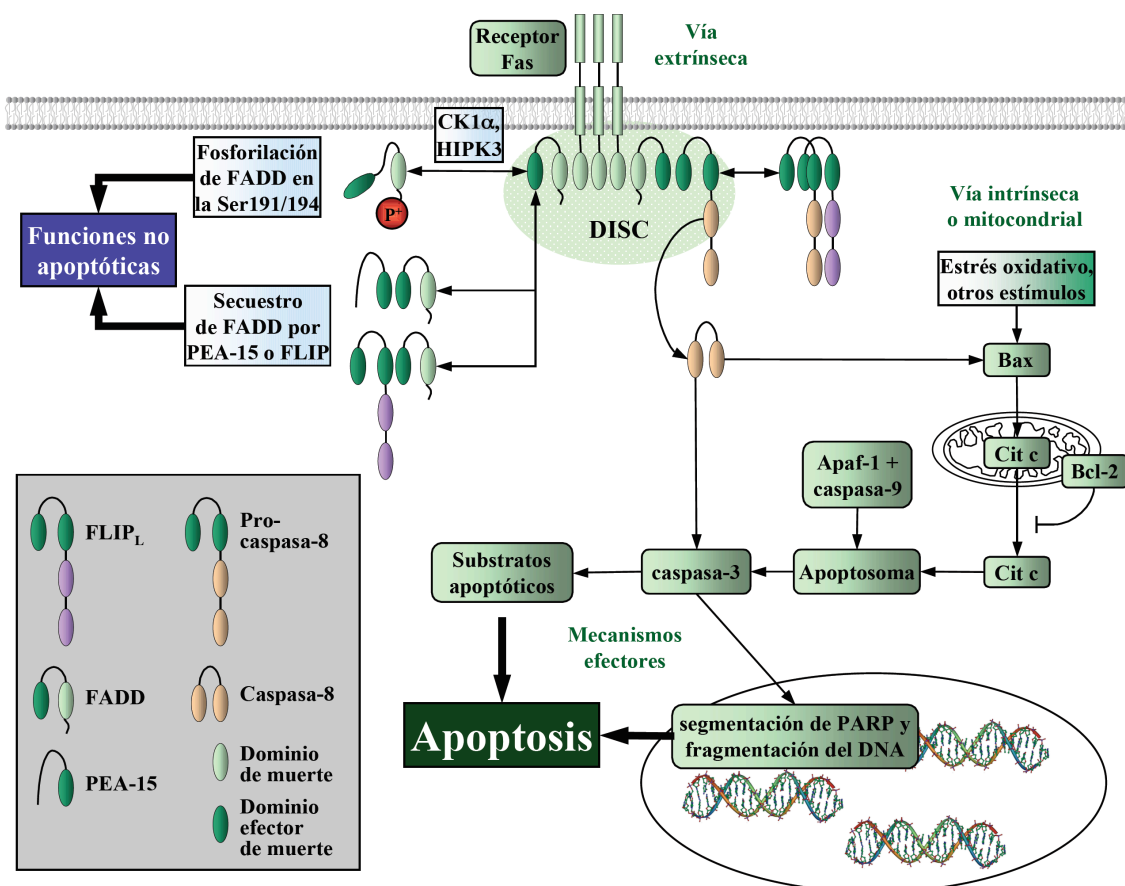


Figura 1-9. Principales proteínas implicadas en las vías de señalización apoptótica extrínseca e intrínseca, y mecanismos efectores de muerte celular.

La vía apoptótica extrínseca

La vía extrínseca comienza con la asociación de alguno de los receptores de muerte, todos ellos pertenecientes a la superfamilia de receptores del factor necrótico tumoral (TNFR), con su ligando. Entre ellos, el más representativo en cerebro es el receptor Fas (CD95, “cytotoxicity-dependent protein 95”, APO-1, “apoptosis-1 protein”, o TNFRSF6) (Cheema et al., 1999; Lambert et al., 2003). La unión de Fas con su ligando (Fas-L) induce la trimerización del receptor, que en esta conformación es capaz de reclutar tres moléculas del acoplador de la señal FADD (“Fas-associated protein with death domain”). A su vez, cada molécula de FADD une una molécula de pro-caspasa-8, conformando finalmente el complejo inductor de muerte celular (DISC, “death-inducing signaling complex”) (Algeciras-Schimnich et al., 2002; Lee et al., 2006; Feig et al., 2007). La asociación de estas moléculas es posible gracias a los dominios de acople que presentan. Tanto Fas como FADD contienen dominios de muerte (DD; "death domain"), mientras que la unión entre FADD y la pro-caspasa-8 se realiza por la interacción entre sus dominios efectoros de muerte (DED; "death effector

domain"). Aunque la estequiometría 3:3:3 del DISC ha sido recientemente discutida (Scott et al., 2009), la elevada capacidad de auto-asociación de estas proteínas es sumamente relevante en la señalización apoptótica (Werner et al., 2006). Una característica esencial del receptor Fas es que presenta al menos dos sitios de N-glicosilación en las posiciones N22 y N93 (Itoh et al., 1991). La eliminación enzimática de los grupos glicosil de Fas promueve la auto-asociación del receptor, sugiriendo que podrían funcionar como elementos disociadores del DISC (García-Fuster et al., 2004). Tras la formación del DISC, el dominio auto-catalítico de la pro-caspasa-8 queda expuesto, segmentándose y liberando al fragmento activo de la caspasa-8. Las caspasas son proteasas que fragmentan a sus substratos tras un residuo de aspartato. La principal actividad de la caspasa-8 es segmentar a las pro-caspasas efectoras 3, 6 y 7, donde confluyen las cascadas intrínseca y extrínseca. Una proteína importante en la regulación de la vía extrínseca es FLIP ("FLICE-like inhibitory protein"). Esta molécula presenta una estructura muy similar a la caspasa-8, incluyendo el DED, pero carece de dominio catalítico (Tschopp et al., 1998; Peter y Krammer, 2003; Kataoka, 2005). La sobre-expresión de FLIP impide la unión entre FADD y pro-caspasa-8, bloqueando la formación del DISC y, consecuentemente, la vía extrínseca de la apoptosis (Tschopp et al., 1998; Krueger et al., 2001). Existen diversas isoformas de FLIP, como consecuencia de un procesamiento alternativo de RNA mensajero, pero la principal isoforma en cerebro de mamíferos es la forma larga de 55 kDa (FLIP_L; Kataoka, 2005; Taoufik et al., 2007).

La vía apoptótica intrínseca o mitocondrial

Por otra parte, la vía apoptótica intrínseca o mitocondrial está regulada por otra familia de proteínas pro- y anti-apoptóticas denominada Bcl-2 ("B-cell leukemia 2"; revisado en Wong y Puthalakath, 2008). Tras un estímulo apoptótico, la proteína citosólica Bax ("Bcl-2-associated X protein") se transloca a la mitocondria, donde oligomeriza y se asocia a Bak ("Bcl-2 homologous antagonist/killer protein"), y desde la superficie interna de la membrana mitocondrial externa, abren un poro que permite la liberación al citosol del citocromo c (Liu et al., 1996), el cual, en estado basal, se halla recluido en el espacio intermembrana de la mitocondria. La proteína anti-apoptótica Bcl-2, la cual da nombre a esta familia de moléculas, inhibe la acción de sus homólogas preservando intacta la permeabilidad de la membrana externa de la mitocondria (Green y Reed, 1998; Gross et al., 1999), aunque el mecanismo por el cual Bcl-2 ejerce su actividad es todavía un tema discutido (Wong y Puthalakath, 2008). Una vez en el citosol, el citocromo c promueve el ensamblaje de Apaf-1 ("apoptosis protease-activating factor-1"), que, junto con la caspasa-9 formarán el

apoptosoma (Acehan et al., 2002). Éste último es un activador muy potente de caspasa-3, donde convergen las cascadas extrínseca e intrínseca.

Al igual que el citocromo c, AIF (“apoptosis-inducing factor”), es activador apoptótico dependiente de su liberación del espacio intermembrana de la mitocondria (Susin et al., 1996; Daugas et al., 2000). AIF tiene la propiedad de inducir apoptosis de forma independiente de la actividad caspasa, penetrando en el núcleo de la célula y promoviendo la condensación de la cromatina y la fragmentación del DNA (Daugas et al., 2000), un proceso que también tiene lugar en neuronas del SNC tras la inducción de isquemia en animales de experimentación (Zhu et al., 2003).

Mecanismos efectores de muerte neuronal

La apoptosis, tras la activación de las vías extrínseca y/o intrínseca, continúa con la fragmentación y activación de las caspasas efectoras, de las cuales, en mamíferos, la principal representante es la caspasa-3 y, en menor medida, la 6 y la 7 (Kumar, 2007). El fragmento activo de la caspasa efectora es, en esta forma, comienza a proteolizar substratos citosólicos, entre los que destacan neurofilamentos y tubulinas, desestructurando la arquitectura celular. Además, es capaz de translocarse al núcleo, donde segmentará sus substratos, activará nucleasas y desencadenará la disgregación cromosómica y nuclear observada en células apoptóticas. Entre los substratos más destacables de las caspasas efectoras, se encuentra PARP-1 (“poly-(ADP-ribose)-polymerase-1”; Lazebnik et al., 1994), un enzima nuclear que media, entre otros fenómenos, la reparación del DNA (revisado en Koh et al., 2005). La fragmentación de PARP-1 (116 kDa) en dos fragmentos (87 y 29 kDa), mediada por las caspasas efectoras, ha sido ampliamente utilizada como un marcador funcional de la apoptosis (véase Putt et al., 2005; Galluzzi et al., 2009). Como consecuencia de la degradación masiva de los componentes estructurales, la célula se fragmenta en los denominados cuerpos apoptóticos, los cuales mantienen la integridad de la membrana plasmática. Estos cuerpos son reconocidos por macrófagos y otras células que, finalmente, se encargan de fagocitarlas.

Apoptosis en la adicción a drogas de abuso

Muerte neuronal y patología adictiva

Se ha sugerido que los opiáceos, así como otras drogas de abuso, pueden inducir distintas formas de neurotoxicidad, las cuales conducirían eventualmente a disfunciones cerebrales severas (Gruber et al., 2007; Nutt et al., 2007). En este contexto, diversos laboratorios han

observado, mediante estudios de neuroimagen de sujetos dependientes de opiáceos, que existe una pérdida de volumen ventricular y cortical asociada al consumo prolongado de estas drogas de abuso (Pezawas et al., 1998), así como una reducción de la densidad de materia gris de las cortezas prefrontal bilateral y temporal (Lyo et al., 2006). De acuerdo con estos trabajos, otro estudio en niños de 9 a 14 años de edad que habían sido expuestos a heroína *in utero*, ha demostrado que presentaban volúmenes intracraneales y cerebrales menores, destacando una reducción en el grosor cortical de regiones como el córtex cingulado anterior y la corteza orbitofrontal lateral del hemisferio derecho (Walhovd et al., 2007, 2010). Estas aberraciones estructurales en la corteza prefrontal podrían estar asociadas con la fisiopatología y la conducta observadas en adictos crónicos a opiáceos o tras la exposición prenatal a estas sustancias (Gruber et al., 2007; Walhovd et al., 2007; Yücel et al., 2007).

La presencia de un índice apoptótico neuronal más elevado podría explicar la reducción del volumen cortical en sujetos con un historial de exposición prolongado a opiáceos y, por consiguiente, parte de la etiología de su enfermedad. Sin embargo, la capacidad de los fármacos opioides para inducir la muerte celular programada de neuronas *in vivo* es todavía un tema controvertido (Tegeeder y Geisslinger, 2004). Se ha documentado, por ejemplo, que la administración crónica de agonistas para el receptor opioide μ puede promover un incremento de algunas proteínas pro-apoptóticas en cerebro de animales de laboratorio (Boronat et al., 2001; Mao et al., 2002; García-Fuster et al., 2003, 2004; Pérez-San Emeterio et al., 2006; Cunha-Oliveira et al., 2007; Tramullas et al., 2007, 2008), lo cual apoyaría la hipótesis de una inducción de muerte celular ejecutada por el consumo crónico de estas sustancias. No obstante, la asociación directa entre el abuso de heroína o morfina y la muerte neuronal sigue sin ser resuelta satisfactoriamente (Liao et al., 2005; García-Fuster et al., 2007a; Tramullas et al., 2008). Además, la presencia de un índice de muerte neuronal elevado en el cerebro de humanos adictos a opiáceos es todavía desconocida.

Proteínas apoptóticas asociadas a los mecanismos de neuroplasticidad: FADD como diana en la adicción a opiáceos

Más allá de su función en la muerte celular programada, las proteínas pertenecientes a las cascadas apoptóticas podrían jugar un papel importante mediando procesos de plasticidad sináptica en el SNC (revisado en Gilman y Mattson, 2002; Mattson y Gleichmann, 2005; Jonas, 2006; Mattson, 2007). En este contexto, se ha observado que la estimulación del receptor Fas promueve el crecimiento de las neuritas en neuronas del tallo dorsal del ganglio

en cultivo (Desbarats et al., 2003) así como la ramificación de axones y dendritas durante el desarrollo embrionario del cerebro (Zuliani et al., 2006), entre otras acciones neuroplásticas (Reich et al., 2008).

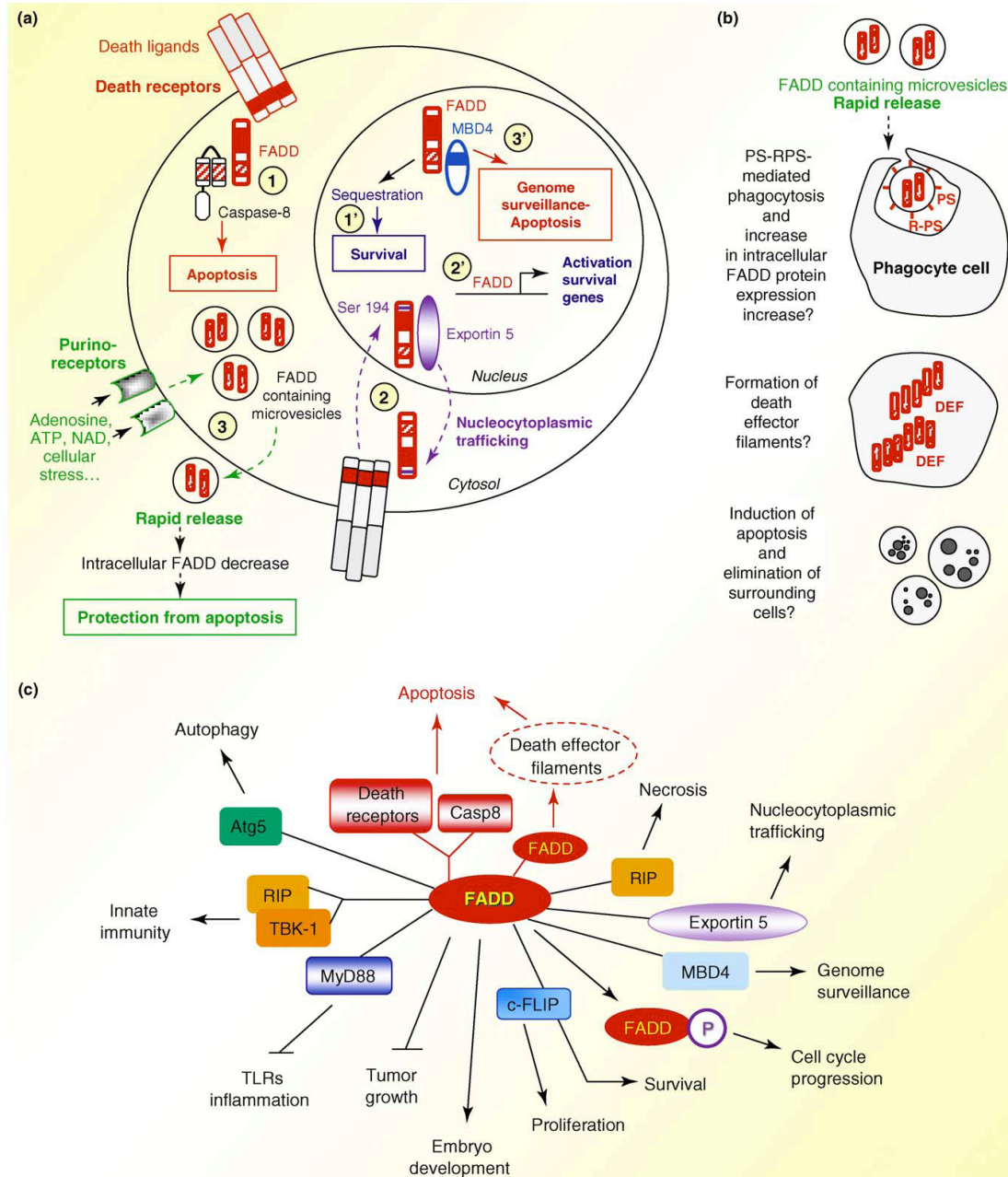


Figura 1-10. Vías de señalización mediadas por FADD implicadas en apoptosis, proliferación y otras respuestas celulares (tomado de Tourneur y Chiocchia, 2010).

La proteína de acople FADD, como se ha mencionado anteriormente, fue inicialmente descrita como una molécula adaptadora de la señalización de distintos receptores, todos ellos pertenecientes a la superfamilia TNFRs (Chinnaiyan et al., 1995; Kischkel et al., 1995). La presencia de FADD es esencial en la apoptosis inducida por el receptor Fas (Sharma et al.,

2000; Sastry y Rao, 2000). Además de su función en la mediación de las señales de suicidio celular, se ha descrito que FADD, junto a Fas, juega un papel fundamental en el crecimiento y diferenciación celular, así como en otros procesos celulares no relacionados con la apoptosis (véase la figura 1-10, y algunas revisiones en esta línea, Park et al., 2005; Tourneur et al., 2005; Werner et al., 2006; Tourneur y Chiocchia 2010). De hecho, FADD y caspasa-8 parecen mediar las funciones no-apoptóticas que el receptor Fas promueve a través de JNK (Matsumoto et al., 2007). En el SNC se ha documentado que la estimulación de Fas/FADD promueve el crecimiento de las neuritas (Zuliani et al., 2006) mediante la activación de ERK. Todas estas funciones no apoptóticas de FADD parecen estar controladas mediante la fosforilación en una única serina de la proteína situada en el extremo C-terminal, fuera del dominio de muerte: la serina 194 (Alappat et al., 2005). La caseína kinasa 1 α (CK1 α), una serina/treonina kinasa de amplia distribución subcelular (Zhang et al., 1996; Knippschild et al., 2005), es la principal responsable de la fosforilación de FADD en la Ser194 (p-Ser194 FADD) en distintos tipos celulares (Alappat et al., 2005), aunque se ha sugerido que podría no ser la única (Scaffidi et al., 2000; Rochat-Stainer et al., 2000). Mediante este mecanismo, este enzima multifuncional puede regular el ciclo celular y la sensibilidad a fármacos antineoplásicos (Alappat et al., 2005).

Al igual que Fas, FADD (23 kDa), posee un extraordinario potencial para auto-asociarse, formando dímeros (\approx 50 kDa) y oligómeros (\approx 92-116 kDa) de distintos pesos moleculares que podrían favorecer la eficiencia de la señalización del receptor Fas (Sandu et al., 2006; Werner et al., 2006; García-Fuster et al., 2008; Scott et al., 2009). Esta capacidad auto-asociativa se debe, sin duda, a la peculiar estructura de FADD. Esta proteína presenta en su dominio N-terminal un DED, y el C-terminal está compuesto por un DD (figura 1-11). Ambos dominios tienen la capacidad de establecer interacciones homotípicas, pudiendo formar dímeros (u oligómeros) bien a través de la unión DED-DED o bien DD-DD (Scott et al., 2009). Del mismo modo, puede interactuar con una gran batería de proteínas, incluyendo todas aquellas que presenten alguno de estos dos dominios (figuras 1-10 y 1-11).

Aunque, debido a su función en la apoptosis, se postula como una proteína citosólica (O'Reilly et al., 2004), la estructura de FADD presenta secuencias de localización y exportación nucleares (Zhang et al., 2004), y se ha descrito su presencia en el núcleo de distintos tipos celulares (Screaton et al., 2003, Gómez-Angelats y Cidlowski, 2003), incluido el núcleo de neuronas en cerebro de rata y humano (Takagi et al., 2007; Bi et al., 2008),

donde probablemente cumple funciones que no guardan relación con su actividad apoptótica (Screaton et al., 2003; García-Fuster 2007a, 2008). Además, se ha sugerido que la fosforilación en la Ser194 podría favorecer la formación de oligómeros de FADD y su acumulación en el núcleo (Screaton et al., 2003; Alappat et al., 2005; García-Fuster et al., 2008).

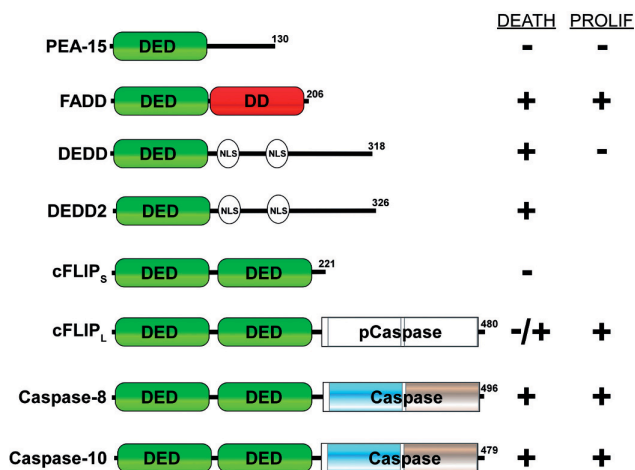


Figura 1-11. Ilustración de la familia de las proteínas portando uno o más dominios efectores de muerte (DED). De entre todas ellas, el FADD es la única que presenta además un domini de muerte (DD). También se indica la habilidad de cada proteína para activar (+) o inhibir (-) la apoptosis (death) y/o la proliferación (prolif). NLS es la secuencia de localización nuclear. Los dominios caspasa y pseudocaspasa (pCaspase) han sido representados con una caja azul/gris o blanca respectivamente. La longitud de la proteína (número total de aminoácidos) también ha sido listada. Tomado de Valmiki y Ramos, 2009.

En cerebro de rata, distintos tratamientos con fármacos opioides redujeron los contenidos de FADD (García-Fuster et al., 2007a). Esta regulación sugiere que los fármacos opioides podrían favorecer la actividad no-apoptótica (neuroplástica) de esta proteína multifuncional. Es importante destacar que tanto los contenidos basales de los agregados de Fas (formas activas del receptor) como los de FADD se hallaron incrementados en la corteza cerebral de ratones KO para el receptor opioide δ , indicando que este receptor inhibe de forma tónica la expresión del complejo Fas/FADD (García-Fuster et al., 2007b). Todos estos antecedentes reflejan la importancia de la señalización de Fas/FADD en el sistema opioide, así como en la adicción a opiáceos. No obstante, la fosforilación de FADD, la cual podría jugar un papel importante en este contexto, todavía no ha sido estudiada en las acciones farmacológicas de los opiáceos.

Algunas vías de señalización podrían asociar los receptores opioides con p-Ser194 FADD en el contexto de los fenómenos de neuroplasticidad. Entre los mejores candidatos destacan las MAPKs. Se ha descrito que la reducción de FADD inducida por fármacos opioides es dependiente de la estimulación de ERK1/2 (García-Fuster et al., 2007a). Además, otras proteínas podrían vincular estas vías de señalización entre receptores opioides y FADD. La fosfo-proteína enriquecida en astrocitos de 15 kDa (PEA-15; Araujo et al., 1993; y revisado en Ramos, 2008), al igual que FADD, contiene un dominio efector de muerte (figura 1-11), y

también es expresada en el citosol de neuronas maduras (Sharif et al., 2004). PEA-15 puede bloquear la apoptosis extrínseca (promovida por la activación de un TNFR) mediante su unión a otras moléculas que contienen dominios efectores de muerte, tales como FADD y caspasa-8 (Kitsberg et al., 1999), un proceso que requiere su fosforilación (Trencia et al., 2003). Además, la forma no fosforilada de PEA-15 es capaz de unirse a ERK1/2 e impedir su entrada al núcleo, previniendo las funciones nucleares de esta kinasa (Formstecher et al., 2001; Renganathan et al., 2005). Akt es una kinasa crítica en la regulación de la supervivencia y proliferación celular (Song et al., 2005) y media la actividad de algunos receptores neuronales (Beaulieu et al., 2007). La activación de Akt promueve la fosforilación de PEA-15 en la serina 116 (p-Ser116 PEA-15; Trencia et al., 2003). Estudios previos muestran que la estimulación del receptor opioide μ activa a Akt (p-Ser473) *in vitro* (Polakiewicz et al., 1998) y, de forma crónica, la morfina promueve una reducción en p-Ser473 Akt (Muller y Unterwald, 2004; Russo et al., 2007). Un hallazgo relevante es que inyecciones sistémicas de un RNA de interferencia para anular la expresión de Akt en el VTA, atenuó significativamente el efecto reforzante de la morfina, así como la reducción del volumen de neuronas dopaminérgicas de esta región cerebral inducida por la exposición repetida al opiáceo (Russo et al., 2007). Puesto que PEA-15 es una proteína de unión entre las señalizaciones de Akt y ERK, implicadas en las propiedades reforzantes de los opiáceos, y de FADD en la señalización apoptótica, parece de gran relevancia estudiar también el papel de PEA-15 y su fosforilación en el contexto de la adicción a opiáceos.

En resumen, este trabajo trata de explorar si las alteraciones observadas en las vías apoptóticas conducen a la muerte de células corticales o pueden estar relacionadas con fenómenos neuroadaptativos, a través de la interacción con otras vías de señalización. En este sentido, el presente estudio es de particular relevancia, puesto que los modelos de adicción en animales de laboratorio no pueden reproducir con exactitud las características ni el cuadro fisiopatológico desarrollado por el autoconsumo que presentan las personas adictas a estas sustancias. Así pues, en este trabajo se han explorado las consecuencias de la exposición a opiáceos en el cerebro de animales de laboratorio, así como en cerebro humano post mórtem de individuos con un historial de consumo de opiáceos bien documentado.

OBJETIVOS

Durante el desarrollo de esta Tesis doctoral se marcaron dos objetivos principales. El primero trata de profundizar en la cuestión de si el consumo esporádico o prolongado de opiáceos está asociado a un incremento de la tasa apoptótica en tejido cerebral de animales de laboratorio y en la corteza prefrontal de adictos a este tipo de sustancias. En este contexto, trabajos previos del grupo en el que se ha elaborado esta Tesis doctoral ya han asentado algunas de las bases en las que se apoya el presente trabajo de investigación (Boronat et al., 2001; García-Fuster et al., 2003, 2004, 2007a, b). En el segundo objetivo, dada la potencial implicación de estas vías apoptóticas en la plasticidad neuronal asociada a la patología de la adicción, se evaluó el posible papel de la fosforilación de FADD en la serina 191/194 (p-Ser191/194 FADD) en los cambios neuroadaptativos ocurridos durante la exposición crónica a opiáceos. Para la consecución de dichos objetivos, este trabajo se abordó de la siguiente manera:

1. Evaluar mediante técnicas inmunológicas (*Western blotting*) el contenido de un amplio número de proteínas pro- y anti-apoptóticas implicadas en las vías extrínseca e intrínseca, así como mecanismos efectores de muerte celular en la corteza prefrontal de grupos y subgrupos de sujetos con un historial bien documentado de consumo de heroína y/o metadona que, en su mayoría, murieron por sobredosis, y que fueron emparejados en función del sexo, la edad y el retraso autopsico (PMD) para su comparación con sujetos control.
2. Detectar y caracterizar, mediante *Western blotting*, la expresión de p-Ser191/194 FADD, responsable de las actividades no apoptóticas de esta proteína multifuncional, en cerebro de rata, ratón y humano.
3. Cuantificar los efectos agudos y crónicos de los agonistas selectivos para receptores μ -, δ - y κ -opioides sobre la fosforilación de FADD en corteza cerebral de rata, así como el efecto de la abstinencia (espontánea o precipitada por antagonista) tras los tratamientos crónicos con dichos fármacos. Asimismo, estudiar la regulación de FADD y p-FADD en el cerebro de rata durante la expresión de las alteraciones conductuales inducidas tras la exposición repetida o crónica a la morfina.
4. Cuantificar el contenido de las distintas formas de p-Ser194 FADD en los grupos y subgrupos de adictos y sujetos control anteriormente citados.
5. Analizar los contenidos de proteínas asociadas con la señalización no-apoptótica de FADD y clásicamente involucradas en procesos de neuroplasticidad, en las muestras

cerebrales de adictos y ratas sometidas a los tratamientos farmacológicos. En este contexto, se estudiaron la posible regulación de las principales kinasas activadas por mitógenos (MAPK), ERK, JNK y p38 MAPK, así como la vía de Akt/PEA-15.

6. Estudiar la posible interacción entre las distintas vías de señalización que puedan explicar la acción de los fármacos opiáceos sobre FADD y p-FADD.
7. Evaluar el efecto de la inhibición de ERK sobre las conductas estereotípicas asociadas a la dependencia y sensibilización a la morfina.
8. Estudiar la relevancia de las modulaciones de estas cascadas de señalización a nivel subcelular.
9. Finalmente, se evaluaron los factores que pueden sesgar de forma significativa los estudios en cerebro humano post mórtem.

Estas investigaciones finalmente han originado cinco publicaciones de relevancia en el campo de la Neurofarmacología, los cuales se presentan, por orden cronológico, como los resultados propios de esta Tesis doctoral:

1. García-Fuster MJ*, Ramos-Miguel A*, Miralles A, García-Sevilla JA (2008) Opioid receptor agonists enhance the phosphorylation state of Fas-associated death domain (FADD) protein in the rat brain: functional interactions with casein kinase Ialpha, Galpha(i) proteins, and ERK1/2 signaling. *Neuropharmacology* 55: 886-899.
2. García-Fuster MJ, Ramos-Miguel A, Rivero G, La Harpe R, Meana JJ, García-Sevilla JA (2008) Regulation of the extrinsic and intrinsic apoptotic pathways in the prefrontal cortex of short- and long-term human opiate abusers. *Neuroscience* 157: 105-119.
3. Ramos-Miguel A, García-Fuster MJ, Callado LF, La Harpe R, Meana JJ, García-Sevilla JA (2009) Phosphorylation of FADD (Fas-associated death domain protein) at serine 194 is increased in the prefrontal cortex of opiate abusers: relation to mitogen activated protein kinase, phosphoprotein enriched in astrocytes of 15 kDa, and Akt signaling pathways involved in neuroplasticity. *Neuroscience* 161: 23-38.

* MJ G-F y A R-M contribuyeron a partes iguales en este trabajo

4. Ramos-Miguel A, Esteban S, García-Sevilla JA (2010) The time course of unconditioned morphine-induced psychomotor sensitization mirrors the phosphorylation of FADD and MEK/ERK in rat striatum: role of PEA-15 as a FADD-ERK binding partner in striatal plasticity. *European Neuropsychopharmacology* 20: 49-64.
5. Ramos-Miguel A, Miralles A, García-Sevilla JA (2010) Correlation of rat cortical FADD (Fas-associated death domain) protein phosphorylation with the severity of spontaneous morphine abstinence syndrome: Role of α 2-adrenoceptors and extracellular signal-regulated kinases. Aceptado en *Journal of Psychopharmacology* (31-7-2010).

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES

Fármacos

A continuación se detallan todos los fármacos empleados durante el desarrollo de esta Tesis doctoral para los diversos tratamientos en ratas. Seguido del nombre genérico de cada fármaco, se indica en *cursiva* su nomenclatura según la IUPHAR y (entre paréntesis) el número de catálogo (N° Cat) y la casa comercial donde fue adquirido. Además, las afinidades de los agonistas y antagonistas para los receptores opioides utilizados se encuentran resumidos en la tabla 3-1.

Agonistas de receptores opioides

- Fentanilo, citrato; *N-phenyl-N-[1-(2-phenylethyl)piperidin-4-yl]propanamide* (N° Cat F3886; Sigma-Aldrich, MO, EE.UU.). Agonista μ potente y selectivo.
- Sufentanilo, citrato; *N-[4-(methoxymethyl)-1-[2-(2-thienyl)ethyl]-4-piperidinyl]-N-phenylpropanamide 2-hydroxy-1,2,3-propanetricarboxylate* (N° Cat 00008451; Janssen-Cilag S.A., Madrid). Agonista para el receptor opioide μ potente y selectivo.
- Morfina, clorhidrato (Alcaliber S.A., Madrid). Agonista μ .
- SNC-80; *4-[(R)-[(2S,5R)-2,5-dimethyl-4-prop-2-enylpiperazin-1-yl]-(3-methoxyphenyl)methyl]-N,N-diethylbenzamide* (N° Cat 0764; Tocris Cookson Ltd., Avonmouth, Reino Unido). Agonista para el receptor opioide δ potente y selectivo.
- (-)-U-50488-H, clorhidrato; *trans-(-)-3,4-Dichloro-N-methyl-N-[2-(1-pyrrolidinyl)cyclohexyl]benzeneacetamide hydrochloride* (N° Cat 0496; Tocris). Agonista para el receptor opioide κ potente y selectivo.

Antagonistas de receptores opioides

- Naloxona, clorhidrato; *17-Allyl-4,5 α -epoxy-3,14-dihydroxymorphinan-6-one hydrochloride* (N° Cat N7758; Sigma-Aldrich). Antagonista opioide no selectivo.
- Naltrindol, clorhidrato; *17-Cyclopropylmethyl-6,7-dehydro-4,5 α -epoxy-3,14-dihydroxy-6,7-2',3'-indolomorphinan hydrochloride* (N° Cat 0740; Tocris). Antagonista neutro y selectivo para el receptor opioide δ .
- *nor*-Binaltorfimina, dihidroclorato; *17,17'-(Dicyclopropylmethyl)-6,6',7,7'-6,6'-imino-7,7'-binorphinan-3,4',14,14'-tetrol dihydrochloride* (N° Cat 0347; Tocris). Antagonista neutro y selectivo para el receptor opioide κ .

Tabla 3-1. Afinidades de unión [Ki (nM)] de los agonistas y antagonistas para los receptores opioides murinos μ , δ y κ en células COS-7 transfectadas¹

Receptor	μ -OR	δ -OR	κ -OR
Ligando de competición	[³ H]DAMGO	[³ H]naltrindole	[³ H]U-69,593
Agonistas opioides			
Fentanilo	0.39	>1000	255
Sufentanilo	0.15	50	75
Morfina	14	>1000	538
SNC-80 ²	>1000	0.82	-
U-50488-H	>1000	>1000	0.12
Antagonistas opioides			
(-)-Naloxona	0.93	17	2.3
Naltrindol	64	0.02	66
<i>nor</i> -Binaltorfimina	2.2	65	0.027

¹Datos tomados de Raynor et al., 1993.

²Calculado en células CHO transfectadas con receptores opioides δ y μ y marcados con [³H]pCl-DPDPE y [³H]DAMGO respectivamente (Knapp et al., 1996).

Otras herramientas y fármacos

- Toxina de pertusis (Nº Cat P7208, lote 034K1409; Sigma-Aldrich). Este compuesto es capaz de ADP-ribosilar las proteínas $G\alpha_{i/o}$, promoviendo su inactivación de forma irreversible.
- SL 327; α -[Amino[(4-aminophenyl)thio]methylene]-2-(trifluoromethyl)benzenea-cetonitrile (Nº Cat 1969, lote 1A/813330; Tocris). Inhibidor potente y selectivo de MEK1 y MEK2 capaz de atravesar la barrera hemato-encefálica y la membrana celular: IC₅₀ para MEK1/2, 0.18-0.22 μ M; IC₅₀ para ERK1/2 > 50 μ M (Selcher et al., 1999).
- EEDQ; *N*-Ethoxycarbonyl-2-ethoxy-1,2-dihydroquinoline (Nº Cat E-1004, lote 121H0050; Sigma-Aldrich). Agente alquilante de los receptores adrenérgicos α_2 .
- Isoflurano; 2-chloro-2-(difluoromethoxy)-1,1,1-trifluoro-ethane (Nº Cat 05260-05; Abbott Laboratories, IL, EE.UU.). Anestésico inhalatorio.

Anticuerpos

Las características de los anticuerpos primarios empleados para la detección y cuantificación de proteínas de interés en cerebro de rata y humano se hallan detallados en la tabla 3-2. Generalmente, los anticuerpos primarios son generados mediante la inmunización de un animal (huésped; habitualmente conejo, ratón o cabra; véase figura 3-1) con un antígeno, es decir, la secuencia completa o parcial de la proteína diana (normalmente de origen humano). En la producción de anticuerpos policlonales, el suero del animal es posteriormente extraído y purificado mediante columnas cromatográficas de afinidad compuestas por una resina que contiene dicho antígeno. De este modo obtenemos un anti-suero conteniendo anticuerpos

reconociendo epítomos diferentes, pero todos ellos específicos para el antígeno, o lo que es lo mismo, específicos para la proteína diana.

Tabla 3-2. Anticuerpos primarios

Proteína diana	Péptido antigénico	Origen	Huésped	Catálogo	Lote	Compañía	Dilución
Fas receptor	Residuos C-terminales	Ratón	Conejo	sc-716	D-219	Santa Cruz, USA	1:5000
Fas receptor	Residuos 300-319	Humano	Conejo	sc-715	D-172	Santa Cruz, USA	1:1000
FADD (H-181)	Residuos 28-208	Humano	Conejo	sc-5559	J-2004	Santa Cruz, USA	1:5000
FADD (AAP)	Residuos N-terminales	Humano	Cabra	sc-1172	H-231	Santa Cruz, USA	1:5000
FADD Clone 28	Residuos 97-178	Rata	Ratón	558202	08738	BD Pharmigen, USA	1:1000
Caspase-8/p20	Residuos 217-350	Humano	Conejo	sc-7890	F-1604	Santa Cruz, USA	1:1000
Caspase-3/p20	Residuos 1-277	Humano	Conejo	sc-7148	H-011	Santa Cruz, USA	1:1000
FLIP-S/L	Residuos 1-202	Humano	Ratón	sc-5276	F-0404	Santa Cruz, USA	1:1000
FLIP-S/L	Residuos 1-202	Humano	Conejo	sc-8347	H-3005	Santa Cruz, USA	1:1000
Bcl-2	Residuos 1-205	Humano	Conejo	sc-783	B-141	Santa Cruz, USA	1:1000
Bcl-2	Residuos N-terminales	Humano	Conejo	sc-492	C-082	Santa Cruz, USA	1:1000
Bax	Residuos 1-171	Humano	Conejo	sc-493	G-101	Santa Cruz, USA	1:1000
Cytochrome c	Residuos 93-104	Paloma	Ratón	556433	59671	BD Pharmigen, USA	1:5000
AIF	Residuos C-terminales	Ratón	Cabra	sc-9416	A282	Santa Cruz, USA	1:1000
PARP	Residuos 215-228	Humano	Conejo	512729	D33259	Calbiochem, FRG	1:750
p-FADD(Ab I)	Péptido incluyendo p-Ser191	Ratón	Conejo	2785	1	Cell Signaling, USA	1:500
p-FADD(Ab II)	Péptido incluyendo p-Ser194	Humano	Conejo	sc-12439-R	C072	Santa Cruz, USA	1:1000
p-FADD(Ab III)	Péptido incluyendo p-Ser194	Humano	Conejo	2781	2	Cell Signaling, USA	1:1000
p-FADD(Ab IV)	Péptido incluyendo p-Ser194	Humano	Cabra	sc-12439	I0304	Santa Cruz, USA	1:1000
CK1 α	Residuos C-terminales	Humano	Cabra	sc-6477	K2305	Santa Cruz, USA	1:2500
G α_2	Secuencia completa	Humano	Ratón	G111	086L200	Leinco, USA	1:1000
p-MEK1/2	Péptido incluyendo p-Ser217/221	Humano	Conejo	9121	18	Cell Signaling, USA	1:1000
MEK1/2	Secuencia completa	Humano	Conejo	9122	6	Cell Signaling, USA	1:5000
p-ERK1/2	Péptido incluyendo p-Thr202/Tyr204	Humano	Conejo	9101	20	Cell Signaling, USA	1:1000
ERK1/2	Péptido sintético de p42	Humano	Conejo	442704	D33075	Calbiochem, FRG	1:2000
p-JNK1/2	Péptido incluyendo p-Thr183/Tyr185	Humano	Conejo	9251	10	Cell Signaling, USA	1:1000
JNK1/2	Proteína de fusión JNK2-GST	Humano	Conejo	9252	6	Cell Signaling, USA	1:2000
p-p38 MAPK	Péptido incluyendo p-Thr180/Tyr182	Humano	Conejo	9211	16	Cell Signaling, USA	1:500
p38 MAPK	Péptido sintético de p38	Humano	Conejo	9212	9	Cell Signaling, USA	1:1000
p-PEA-15	Péptido incluyendo p-Ser116	Humano	Conejo	44-836G	0103	BioSource, USA	1:1000
PEA-15	Péptido incluyendo Leu60	Humano	Conejo	2780	1	Cell Signaling, USA	1:1000
p-Akt1	Péptido incluyendo p-Ser473	Ratón	Conejo	9271	10	Cell Signaling, USA	1:1000
Akt1	Residuos 88-100 (isoforma α)	Humano	Conejo	530311	D35774	Calbiochem, FRG	1:1000
Arc	Residuos 1-300	Humano	Conejo	sc-15325	B2309	Santa Cruz, USA	1:2500
NF- κ B	Péptido incluyendo Ser276	Humano	Conejo	3034	7	Cell Signaling, USA	1:1000
FosB	Residuos 1-237	Humano	Conejo	sc-28213	K0805	Santa Cruz, USA	1:1000
c-Fos	Péptido incluyendo región interna	Humano	Conejo	sc-253	D012	Santa Cruz, USA	1:1000
Stathmin	Péptido incluyendo Ser38	Humano	Conejo	3352	1	Cell Signaling, USA	1:1000
PAR-4	Residuos 1-334	Rata	Ratón	sc-1666	J-305	Santa Cruz, USA	1:500
NF-L	Extracto de la médula espinal porcina	Cerdo	Ratón	5139 NR4	086K4823	Sigma, USA	1:5000
p-NF-H	Epítomos C-terminales fosforilados	Humano	Ratón	SMI-31R	14815001	Covance, USA	1:1000
GFAP	Extracto de la médula espinal porcina	Cerdo	Ratón	GFAP-GA5	C02601	Novocastra, USA	1:5000
β -actin	Residuos 2-16	Humano	Ratón	A1978	016K4817	Sigma, USA	1:10000

Por otra parte, para la elaboración de anticuerpos monoclonales, se selecciona una única célula linfocitaria, la cual se hibrida con una célula tumoral para favorecer su proliferación. Todos los anticuerpos producidos por esta célula de fusión, o hibridoma, son idénticos, por lo que es esencial aislar una amplia colección de clones para obtener al menos uno que produzca anticuerpos contra la proteína diana. Todos los anticuerpos monoclonales empleados en este trabajo se elaboraron utilizando como huésped a un ratón, mientras que los anticuerpos producidos en conejo y cabra son policlonales (tabla 3-2).

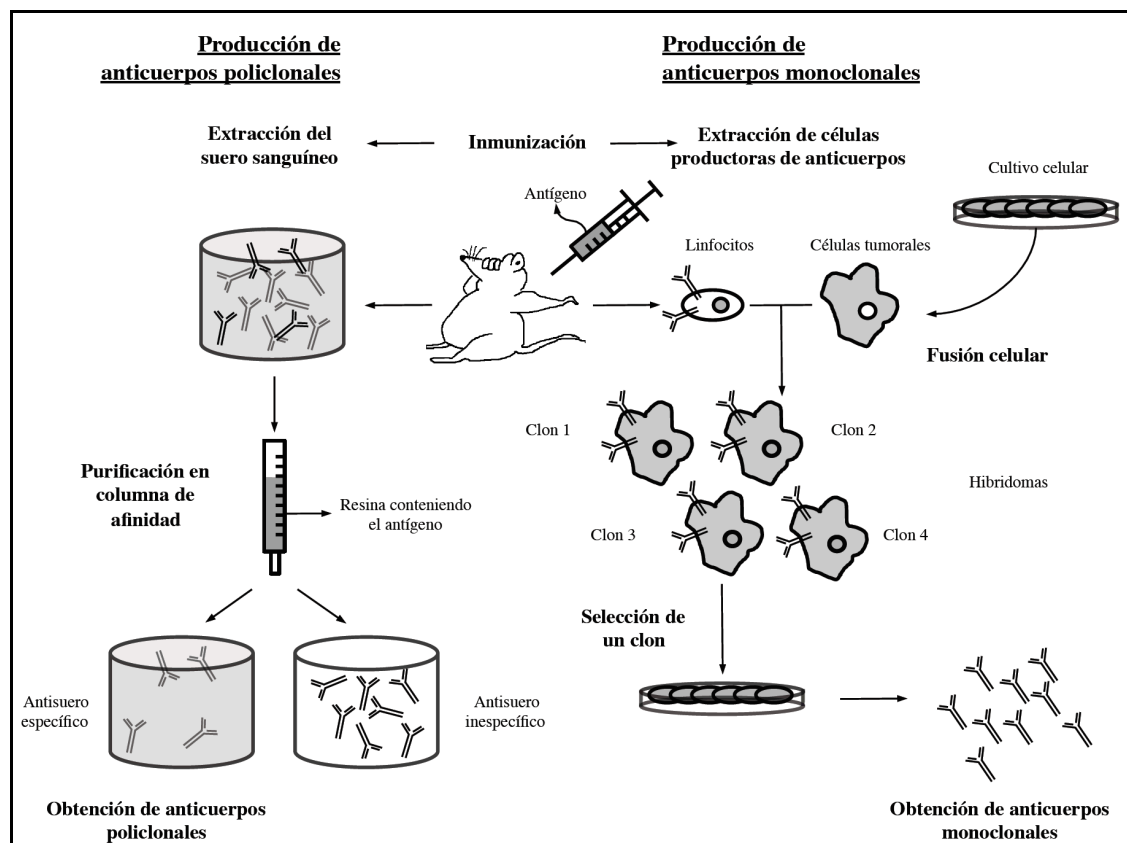


Figura 3-1. Representación esquemática de la producción de anticuerpos primarios mono- y policlonales.

Los anticuerpos secundarios empleados en este estudio se encuentran listados en la tabla 3-3. Todos ellos son anticuerpos conjugados con peroxidasa de rábano (HRP).

Tabla 3-3. Anticuerpos secundarios

Diana	Antígeno	Origen	Huésped	Catálogo	Lote	Compañía	Dilución
IgG	Secuencia completa de la cadena pesada	Conejo	Cabra	7074	Varios	Cell Signaling, USA	1:5000
IgG	Secuencia completa de la cadena pesada	Ratón	Caballo	7076	Varios	Cell Signaling, USA	1:5000
IgG	Secuencia completa de la cadena pesada	Cabra	Conejo	A 5420	Varios	Sigma Chemical, USA	1:5000

Otros reactivos y kits

Kits

- Kit para el ensayo del ácido bicinconónico (BCA) para la determinación de proteínas (Nº Cat 23225, Pierce, Rockford, IL, EE.UU.).
- Kit para la extracción subcelular de proteínas en tejido cerebral (Subcellular Proteome Extraction Kit, ProteoExtract™; Nº Cat 539790; Calbiochem, Darmstadt, Alemania).
- Kit para determinación de proteínas por precipitación (Non-Interfering Protein Assay™ Kit; Nº Cat 488250; Calbiochem).
- Kit para la inmunodetección de la segmentación funcional de PARP-1, incluyendo anticuerpo, péptido antigénico, controles positivo y negativo, y proteína purificada (Nº Cat 512729, lote D33259; Calbiochem).

Proteínas, controles positivos y péptidos antigénicos

- FADD recombinante (DD: residuos 109-208) unido a Glutation-S-transferasa (GST) (Nº Cat H00008772-Q01, lote 124Q45DL; Abnova Corporation, Taipei, Taiwan).
- Control positivo de p-Ser473 Akt para *Western blotting* (Nº Cat KP24002; lote D37245; Calbiochem).
- Péptido antigénico de p-Ser194 FADD (Nº Cat sc-12439P, lote C201; Santa Cruz Biotechnology, Delaware, CA, EE.UU.).
- Péptido antigénico de CK1 α (Nº Cat sc-6477P, lote J-1802; Santa Cruz).
- Fosfatasa alcalina de la mucosa intestinal de ternera (Nº Cat P-0905, lote 94F80003; Sigma-Aldrich).

Otros reactivos empleados en Western blotting

- Acrilamida [30% (w/v) acrilamida: 0.8% (w/v) bis-acrilamida (37.5:1); Nº Cat EC-890; ProtoGel, LX, R.U.]
- Persulfato de amonio (APS; Nº Cat 161-0700; Bio-Rad, Laboratories, Hercules, CA, EE.UU.).
- Tetrametiletilenediamina (TEMED; Nº Cat 87689; Fluka – Sigma-Aldrich).
- Marcador molecular (Prestained SDS-PAGE Standards; Nº Cat 161-03318; Bio-Rad).
- Albúmina de suero bovino (Nº Cat A7906; Sigma-Aldrich).
- Tween-20 (Nº Cat P5927; Sigma-Aldrich).

- Sistema de electro-quimio-luminescencia para el revelado en el empleo de anticuerpos secundarios conjugados con HRP (ECL™ Western Blotting Detection Reagents; N° Cat; RPN2106; Amersham, Buckinghamshire, R.U.).
- Líquidos de revelado (revelador N° Cat 190 0984; fijador N° Cat 190 2485; Kodak, Rochester, NY, EE.UU.).

Reactivos empleados para el ensayo de actividad enzimática

- Substrato para CK1 (RRKDLHDDEEDEAMSITA) (N° Cat 218730, lote B50445; Calbiochem).
- Inhibidor de CK1, (N° Cat D4476, lote D22439; Calbiochem).
- ATP (N° Cat A-3377)
- [γ -³²P]ATP (3000Ci/mmol; Amersham)

Reactivos empleados en HPLC-ED

- Dopamina (N° Cat. H8502), HVA (N° Cat. H1252) y DOPAC (N° Cat. 850217; Sigma-Aldrich).

Reactivos genéricos

- Productos adquiridos en Scharlau (Sharlau Chemie S.A., Barcelona): ácido clorhídrico (HCl), ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) tetrasódico, EDTA dipotásico (K₂-EDTA), etanol absoluto, glicerol, glicina, tris-(hidroximetil)-aminometano (Tris-HCl), dodecil-sulfato de sodio (SDS), metanol.
- Productos adquiridos en Sigma-Aldrich: 2-mercaptoetanol, azul de bromofenol, cloruro de magnesio (MgCl₂), cloruro potásico (KCl), cloruro sódico (NaCl), dimetil-sulfóxido (DMSO), dihidrógeno fosfato de potasio (KH₂PO₄), ditiotreitól (DTT), hidrógeno fosfato de sodio (Na₂HPO₄), pirofosfato sódico (PPi), sulfato de cobre (Cu₂SO₄)

Materiales empleados para Western blotting

- Mini-geles de poliacrilamida de 6×8 cm, 1 mm de grosor; peines de Teflón™ de 1 mm de grosor y 15 pocillos; cubeta de electroforesis/transferencia; casete de transferencia; y esponjas compresoras de fibra de vidrio, todo ello de Bio-Rad.
- Membranas de nitrocelulosa; tamaño de poro 0.45 μ m (N° Cat 10 401 196; Protran, Schleicher y Schuell, Dassel, Alemania).

- Papel para cromatografía Whatman de 3 mm de grosor (Nº Cat 3030 917; Whatman International Ltd., Maldstone, R.U.).
- Películas fotográficas (Hyperfilm ECL™; Nº Cat 28906837; Amersham).
- Casete de exposición membrana-película (Hypercasete™; Amersham).

Aparatos

- Activímetro (El Temps©”; A. Díez-Noguera, Grup de Cronobiologia, Universitat de Barcelona, 1999).
- pH-metro (micro-pH 2000; Crison Instruments S.A., Barcelona)
- Centrifugadoras: Ultracentrifugadora (RC-5C Plus; Sorvall Instruments, EE UU) con rotor SS-34 (Sorvall Instruments); y microcentrifugadora (Centrifuge 5415 R; Eppendorf, Hamburgo, Alemania) con rotor para tubo eppendorf (F-45-24-11; Eppendorf).
- Homogenizador (PT 10/35; Polytron, Lucerna, Suiza).
- Sonicador (Sonifier 250; Branson Ultrasonics Corporation, EE UU).
- Espectrofotómetros: BioPhotometer 562 nm (Eppendorf); y Genova 198-1000 nm (Jenway; Bibby Scientific Limited, Staffordshire, R.U.).
- Fuente para electroforesis y transferencia (Power Pac 200; Bio-Rad).
- Baño termorregulador (Unitronic OR; JP Selecta, Barcelona).
- Escáner para la captura y medición de autorradiografías (GS-800 Calibrated Densitometer; Bio-Rad).
- Contador de centelleo (LS 1801; Beckman Coulter; Brea, CA, EE UU)
- Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC; AllianceHPLC 2796; Waters, Milford, MA, EE UU) con detector electroquímico (ED, ISAAC Waters Electrochemical Detector; Waters).

MODELOS DE EXPERIMENTACIÓN

Durante el desarrollo de esta Tesis doctoral se empleó la rata como modelo de experimentación animal y, de forma paralela, los resultados obtenidos en dicho modelo fueron contrastados en muestras de cerebro humano post mortem.

Estudios en cerebro de rata

En este estudio, los animales fueron tratados de acuerdo con la Directiva del 24 de Noviembre de 1986 (86/609/EEC) del Consejo de la Comunidad Europea, y respetando las pautas marcadas por el comité de ética de la Comunidad Autónoma de las Islas Baleares. Así mismo,

fueron realizados todos los esfuerzos posibles para minimizar el número de animales durante el estudio, así como su sufrimiento.

Para los distintos tratamientos farmacológicos se utilizaron ratas macho de la cepa Sprague-Dawley [CrI:OFA(SD), Charles River, Barcelona], con un peso comprendido entre 200 y 250 g (6-7 semanas de edad) al inicio de los experimentos. Tras su llegada a las instalaciones de la UIB, las ratas fueron debidamente aisladas durante 7 días en cumplimiento del protocolo habitual de cuarentena y, posteriormente, fueron alojadas de tres en tres en jaulas de policarbonato (345×180×140 mm; Panlab, Barcelona), provistas de un lecho compuesto por birutas de pino tamizadas (Ultrasorb; Panlab), durante al menos otros 7 días para su aclimatación a las condiciones del estabulario. Para ello fueron mantenidas bajo condiciones controladas de temperatura ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$), humedad (50-60%), y ciclo de 12 h/12 h de luz/oscuridad (luz encendida de 8:00 a 20:00 horas; intensidad ≈ 300 lx). Además, durante este periodo de aclimatación, todos los animales fueron acostumbrados al manejo, con el objetivo de reducir el estrés y la agresividad que pudieran, de otro modo, aparecer mientras se realizan los tratamientos. Durante toda su estancia en las instalaciones, las ratas recibieron comida (dieta estándar A04; Panlab) y bebida (agua corriente) *ad libitum*. En todos los experimentos, las ratas fueron asignadas de forma aleatoria a cada uno de los grupos experimentales. La descripción de los tratamientos farmacológicos, así como de los ensayos conductuales se hallan detallados en los apartados siguientes. Todas las ratas fueron finalmente sacrificadas por decapitación sin anestesia, una vez transcurrido el tiempo especificado para cada tratamiento.

Estudios en cerebro humano

El efecto del consumo (de corto y largo plazo) de opiáceos sobre las distintas cascadas de señalización en las que se centra esta Tesis doctoral, también fue estudiado en cerebros humanos post mórtem de sujetos control y adictos con un historial de consumo de este tipo de sustancias bien documentado. Las características toxicológicas y demográficas de los individuos que han sido incluidos para este trabajo se encuentran detalladas en el apartado correspondiente. Las muestras cerebrales, así como las muestras capilares y sanguíneas para los análisis toxicológicos, de sujetos consumidores de opiáceos y controles fueron extraídas durante el transcurso de autopsias judiciales consecutivas llevadas a cabo en el “Centre Universitarie Romand de Médecine Légale-Site Genève” de la Universidad de Ginebra (Suiza), entre los años 1999 y 2004. Estas muestras se obtuvieron siguiendo todos los

procedimientos legales de la República y Cantón de Ginebra, y el estudio fue también revisado y aprobado por el consejo de investigación y ética del Departamento de Psiquiatría de la Universidad de Ginebra. Todos los experimentos con tejido cerebral humano post mórtem fueron realizados en el Laboratorio de Neurofarmacología-IUNICS, Universidad de las Islas Baleares (UIB), tras la aprobación formal del Comité de Ética para la Investigación Clínica (CEIC) y de acuerdo con las directrices de la UIB.

La calidad del tejido humano post mórtem procedente de autopsias consecutivas de una única morgue ha demostrado ser la más conveniente para este tipo de estudios (Stan et al., 2006). Los especímenes de cada individuo, extraídos de la corteza prefrontal derecha [área 9 de Brodmann (BA 9), giro medio frontal], fueron cuidadosamente diseccionados con el objetivo de obtener exclusivamente materia gris (en ningún caso se incluyó más de 1 mm de la sustancia blanca adyacente), e inmediatamente después fueron congelados a -80°C hasta su utilización para los análisis cuantitativos de proteínas. En un experimento preliminar, la sustancia blanca de dos sujetos fue también diseccionada con la intención de realizar un estudio comparativo de la expresión de algunas de las proteínas diana en ambos tejidos cerebrales (materia gris versus blanca). La elección de la región derecha de la corteza prefrontal frente a la izquierda se hizo con la intención de continuar en la línea de investigaciones anteriores (Escribá et al., 1994; García-Sevilla et al., 1997; Ozaita et al., 1998; Meana et al., 2000; Ferrer-Alcón et al., 2003, 2004). En este contexto, se han hallado reducciones similares de la sustancia gris en la corteza cerebral de ambos hemisferios (áreas 8-10 de Brodmann) en adictos a heroína (Lyo et al., 2006). Por el contrario, se ha observado que la liberación de dopamina en la corteza prefrontal del hemisferio derecho, pero no en el izquierdo, se correlacionaba con la tasa de auto-administración en ratas durante la fase de adquisición de dependencia (Glick et al., 1992), lo cual justifica el estudio del hemisferio derecho frente al izquierdo. Así mismo, en sujetos sanos, la realización de operaciones cognitivas directamente relacionadas con la capacidad de memorización, indujo activaciones asimétricas de las cortezas prefrontales en ambos hemisferios (revisado en Fuster, 2001).

TRATAMIENTOS FARMACOLÓGICOS EN RATAS

Tratamientos agudos con fármacos opiáceos

En los tratamientos agudos, las ratas recibieron una única dosis del fármaco por vía intraperitoneal (i.p.) o subcutánea (s.c.), disuelto en suero salino (0,9% NaCl) o dimetilsulfóxido (DMSO), dependiendo de las características de penetración y solubilidad del

fármaco. En los tratamientos de antagonismo, se administró en primer lugar el fármaco antagonista y, transcurrido el tiempo indicado para cada caso, el fármaco agonista. En todas las series experimentales, las ratas control recibieron el vehículo en el que el fármaco es disuelto (salino o DMSO), por la misma vía de administración. Tras los distintos tratamientos, los animales fueron sacrificados por decapitación, al tiempo indicado en cada caso. Los cerebros se extrajeron rápidamente y se diseccionaron las regiones de interés en hielo. Las muestras cerebrales fueron congeladas en nitrógeno líquido inmediatamente después de su disección, y posteriormente almacenadas a -80°C hasta su preparación para los distintos análisis bioquímicos.

En este estudio se realizaron los siguientes tratamientos agudos, cuya dosis, vía de administración y tiempo de acción (entre paréntesis) se detallan a continuación:

- Tratamiento agudo de fentanilo (agonista μ ; 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$, s.c., 15 min).
- Tratamiento agudo de sufentanilo (agonista μ ; 2,5, 5, 15 y 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$, s.c., 30 min).
- Tratamiento agudo de morfina (agonista μ ; 100 mg/kg, i.p., 2 h).
- Tratamiento agudo de SNC-80 (agonista δ ; 10 y 30 mg/kg, i.p., 30 min).
- Tratamiento agudo de (-)-U50488H (agonista κ ; 30 mg/kg, i.p., 60 min).
- Tratamiento con naloxona (antagonista opioide no selectivo; 10 mg/kg, i.p.) sola (90 min) o 60 min antes que el sufentanilo (15 $\mu\text{g}/\text{kg}$, s.c.).
- Tratamiento con naltrindol (antagonista δ ; 5 mg/kg, i.p.) solo (60 min) o 30 min antes que el SNC-80 (10 mg/kg).

Otros tratamientos agudos

1. Efecto de la toxina de pertusis sobre la modulación de FADD y p-FADD inducida por SNC-80

Las ratas fueron tratadas con toxina de pertusis (PT), mediante inyecciones intracerebroventriculares (i.c.v.), para ADP-ribosilar (en la cisteína 350) e inactivar las proteínas $G\alpha_{i/o}$ (Clark and Taynor, 2006). La PT fue administrada esencialmente como se ha descrito en trabajos anteriores (García-Sevilla et al., 1978). Para ello, las ratas fueron anestesiadas con isoflurano (700 cm^3/min) y sus cráneos expuestos por medio de una incisión sobre la línea media. Se realizó una perforación en el lado derecho 2 mm posterior a bregma y 2 mm hacia el lateral desde la sutura sagital. Entonces la PT (3 μg en 10 μl de vehículo, pH 7,0) fue cuidadosamente inyectada en la cavidad del ventrículo lateral (4 mm bajo la

superficie craneal) con una jeringuilla *Hamilton*. Posteriormente, la perforación fue tapada con resina acrílica y la piel suturada con grapas estériles. Para su recuperación, las ratas fueron enjauladas individualmente. Paralelamente, las ratas control recibieron vehículo (10 μ l, i.c.v.) siguiendo el mismo procedimiento, el cual fue comprobado inyectando y localizando un colorante en el ventrículo lateral derecho. Veinticuatro horas después de la operación, cuando el comportamiento de los animales se estabilizó, las ratas recibieron DMSO o SNC-80 (10 mg/kg, i.p.) y se sacrificaron 30 min más tarde. Los contenidos de FADD, p-FADD y $G\alpha_{i2}$ fueron cuantificados en la corteza cerebral derecha.

2. Efecto de la inhibición de MEK sobre los contenidos basales de FADD, p-FADD y otras dianas de interés

El compuesto SL 327 es un inhibidor selectivo de las MAP/ERK kinasas (MEK1/2). Se ha descrito que el bloqueo de la activación de ERK1/2 previene la reducción de FADD inducida por SNC-80 en la corteza cerebral de rata (García-Fuster et al., 2007a), y atenúa el refuerzo positivo de la morfina (Valjent et al., 2006b). Por tanto, la inhibición farmacológica de esta vía de señalización podría dar pistas sobre los mecanismos moleculares que median las alteraciones de las vías apoptóticas inducidas por fármacos opioides. En un experimento preliminar, grupos de ratas fueron tratados con SL 327 (10, 20, 30 mg/kg, i.p., 90 min) para analizar el efecto de la inhibición de ERK1/2 sobre los contenidos basales de FADD, p-FADD, CK1 α y otras proteínas diana en corteza y estriado. Los animales del grupo control recibieron DMSO en lugar de SL 327. Ha sido documentado que dosis mayores de SL 327 alteran ciertos aspectos conductuales en roedores (Selcher et al., 1999; Valjent et al., 2006b), y por tanto se han descartado para este estudio.

3. Efecto de la inhibición de MEK sobre los cambios en los contenidos basales de FADD, p-FADD y CK1 α inducidos por SNC-80

En otros experimentos, grupos de ratas recibieron SL 327 (20 mg/kg) solo (90 min) o 60 min antes de la administración de SNC-80 (10 mg/kg, 30 min) para determinar la influencia de una interrupción en la señalización de ERK1/2 sobre la regulación de p-FADD por el agonista delta. Las ratas control recibieron DMSO o SNC-80 (10 mg/kg, i.p., 30 min). Esta dosis de SL 327 (20 mg/kg) fue escogida porque inhibe aproximadamente un 50% la activación basal de ERK1/2 sin alterar la expresión de las proteínas estudiadas en este trabajo y, además, dosis mayores alteraron el contenido de p-FADD en el estriado (véase en Resultados). Estudios

previos demostraron similares inhibiciones de la activación de ERK1/2 en el cerebro de ratón (Selcher et al., 1999; Valjent et al., 2006b).

Inducción de la sensibilización a la morfina: efecto del bloqueo de la vía MAPK/ERK

La morfina, así como otras drogas de abuso, induce un incremento de la locomoción en roedores. Además, la exposición repetida a estas sustancias de abuso ejerce una ganancia sobre el incremento inicial de la actividad locomotora. Este fenómeno recibe el nombre de sensibilización, y es conceptualmente opuesto a la tolerancia (pérdida de efecto). Cuando ratas sensibilizadas a la morfina, que posteriormente han sido sometidas a un periodo de abstinencia, son nuevamente expuestas al opiáceo, la actividad locomotora sufre un incremento adicional. Bajo estos fenómenos conductuales subyacen alteraciones neurológicas crónicas (plasticidad neuronal) en regiones cerebrales clave, cuyos mecanismos moleculares no están satisfactoriamente resueltos. Con el fin de explorar el posible papel de FADD y su fosforilación en este contexto, se diseñaron los siguientes protocolos de tratamiento (figura 3-2; véase también el apartado siguiente para la descripción detallada de la medición de la actividad locomotora de las ratas):

1. Grupos de ratas fueron inicialmente tratados con una dosis diaria de salino (1 ml/kg, n = 10) o morfina (10 mg/kg, i.p.; n = 10) durante 5 días. Después de 3 (SW 3; n = 5) o 14 (SW 14; n = 5) días en ausencia de opiáceos, con el objetivo de analizar la expresión de la sensibilización locomotora inducida por morfina, todas las ratas recibieron una nueva dosis de morfina (10 mg/kg, i.p.), y la actividad locomotora fue analizada durante 90 min transcurridos 30 min después de la última administración de morfina (protocolo 1, figura 3-2).
2. Para investigar la modulación de las proteínas cerebrales de interés para este trabajo en cuerpo estriado y corteza cerebral durante la sensibilización a la morfina, otros grupos de ratas recibieron el mismo tratamiento repetido de salino (n = 15) o morfina durante 5 días, y fueron posteriormente sacrificadas tras 2 horas (Mor 5; n= 7), 3 (SW 3, n = 9) o 14 (SW 14; n = 9) días en ausencia de opiáceos (protocolo 2, figura 3-2). Finalmente, las regiones cerebrales de interés fueron cuidadosamente extraídas y congeladas de inmediato en nitrógeno líquido y almacenadas a -80°C hasta su procesamiento para los análisis bioquímicos. En este protocolo, a diferencia del anterior, la dosis final de morfina fue omitida con el fin de investigar los cambios adaptativos que preceden (y eventualmente conducen) a la alteración conductual reflejada tras la nueva exposición a la morfina.

locomotora. Las ratas se sacrificaron por decapitación 4 h después de la dosis final de morfina para el análisis de las proteínas cerebrales.

Desarrollo de dependencia a la morfina e inducción del síndrome de abstinencia: influencia del adrenoceptor α_2 y de la vía de MAPK/ERK

Este experimento fue diseñado para evaluar la implicación de FADD y su fosforilación en la aparición del síndrome de abstinencia en animales dependientes de morfina. También se estudiaron los posibles mecanismos moleculares que podrían estar ligados a la modulación de FADD durante la manifestación de este síndrome: adrenoceptor α_2 y vía de MEK/ERK. Los protocolos experimentales se hallan esquematizados en la figura 3-3. En todos los experimentos, grupos de ratas recibieron un tratamiento crónico con dosis ascendentes de morfina durante 6 días consecutivos, tres administraciones i.p. diarias (a las 9:00, 15:00 y 21:00 horas), conforme al siguiente régimen: día 1: 10, 10 y 10 mg/kg; día 2: 10, 20 y 20 mg/kg; día 3: 20, 20 y 40 mg/kg; día 4: 40, 40 y 80 mg/kg; día 5: 80, 80 y 100 mg/kg; día 6: 100 mg/kg. Después de los tratamientos crónicos con morfina, las ratas fueron asignadas de forma aleatoria a uno de los siguientes protocolos (véase figura 3-3):

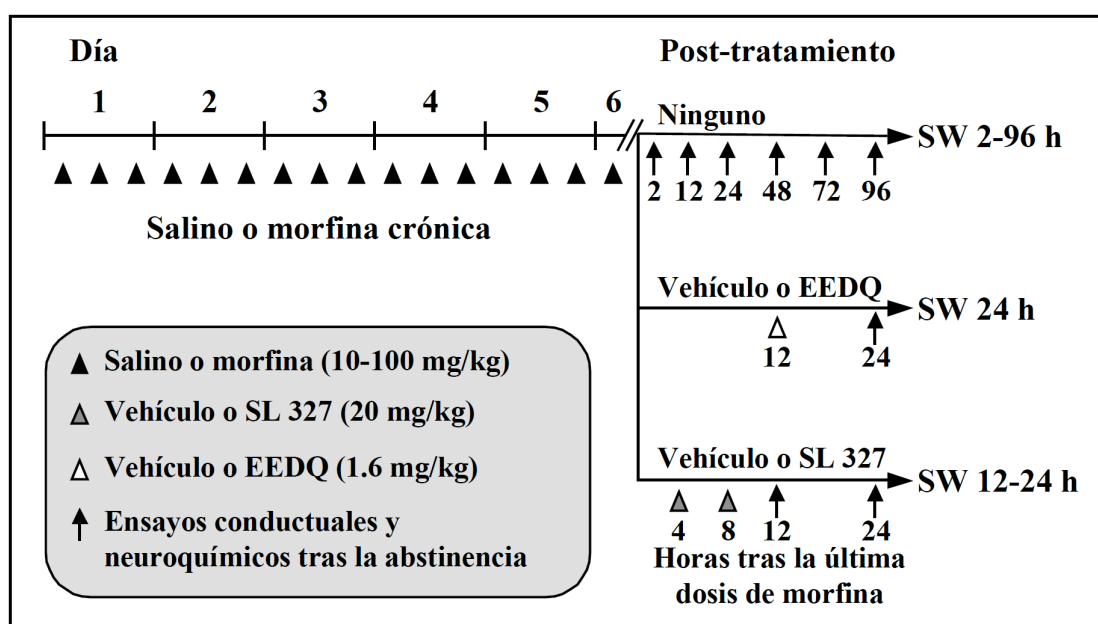


Figura 3-3. Representación esquemática de los tratamientos crónicos con morfina e interacción con EEDQ y SL 327

1. Grupos de ratas fueron mantenidos en ausencia de opiáceos durante 2 h (SW 2; n = 7), 12 h (SW 12; n = 11), 24 h (SW 24; n = 12), 48 h (SW 48; n = 8), 72 h (SW 72; n = 4), o 96 h (SW 96; n = 4). La severidad del síndrome abstinencia fue evaluada a los tiempos indicados en todos aquellos grupos de animales que continuaban en el experimento.

Inmediatamente después del análisis conductual, los animales indicados en cada grupo fueron sacrificados por decapitación.

2. En otro experimento se evaluó el efecto de la eliminación de los adrenoceptores α_2 sobre la conducta y la neuroquímica durante la abstinencia a opiáceos. Para ello, 12 h después de la última dosis de morfina, grupos de ratas recibieron vehículo (1 ml/kg; n = 8) o el alquilante de los receptores α_2 (EEDQ; 1.6 mg/kg; n = 8). Doce horas más tarde (24 h en abstinencia de opiáceos), tras evaluar la severidad del síndrome de abstinencia, las ratas fueron sacrificadas.
3. Otros grupos de ratas recibieron, 4 h y 8 h después de la última dosis de morfina, vehículo (DMSO; 1 ml/kg; n = 5+7) o el inhibidor de MEK1/2 (SL 327; 20 mg/kg; n = 5+10). Después de 12 h (SW 12; n = 5+5) y/o 24 h (SW 24; n = 7+10) en ausencia de morfina, la intensidad de la abstinencia fue cuantificada y las muestras corticales se recogieron tras su sacrificio.

Paralelamente, las ratas control fueron tratadas con salino (1 ml/kg, i.p.) siguiendo el mismo patrón de inyecciones durante los tratamientos crónicos, y cuando procedió, vehículo en paralelo al EEDQ (etanol:propilenglicol:agua en proporción 1:1:2; 1 ml/kg) y al SL 327 (DMSO; 1 ml/kg). Después del sacrificio de los animales, las regiones cerebrales de interés fueron extraídas y rápidamente congeladas como ha sido descrito para otros protocolos.

Otros tratamientos crónicos con fármacos opioides

Para otros tratamientos crónicos con morfina, se inyectó el fármaco (i.p.) tres veces al día (a las 09:00, 15:00 y 21:00 horas), durante 5 días consecutivos, con dosis crecientes de morfina (día 1: 10, 10 y 10 mg/kg; día 2: 10, 20 y 20 mg/kg; día 3: 20, 20 y 40 mg/kg; día 4: 40, 40 y 80 mg/kg; día 5: 80, 80 y 100 mg/kg), y finalmente, fueron sacrificadas 2 h después de la última dosis. A otros grupos de ratas, tras el mismo tratamiento, se les indujo abstinencia por precipitación con naloxona (2 mg/kg, 2h) o de forma espontánea (48 h), la cual resultó en la esperada reacción conductual (Miralles et al., 2005).

En otros tratamientos crónicos, las ratas recibieron SNC-80 (10 mg/kg) o (-)-U50488H (10 mg/kg) una vez al día durante 5 días consecutivos. Tras ellos fueron administrados naltrindol (5 mg/kg, i.p., 2 h) o nor-binaltorfimina (antagonista kappa; 5 mg/kg, i.p., 2 h) respectivamente, para inducir abstinencia precipitada por antagonista, resultando en una

moderada (kappa) o nula (delta) reacción conductual (Milanés y Laorden, 1998; Brandt et al., 2001).

Las ratas control recibieron paralelamente suero salino (μ y kappa) o DMSO (delta). Los animales fueron sacrificados por decapitación, al tiempo indicado en cada caso. Los cerebros se extrajeron rápidamente y se diseccionaron las regiones de interés (corteza cerebral y estriado) en hielo. Las muestras cerebrales fueron congeladas en nitrógeno líquido inmediatamente después de su disección, y posteriormente almacenadas a -80°C hasta su preparación para analizarlas mediante *Western blotting*.

ENSAYOS CONDUCTUALES EN ANIMALES DE LABORATORIO

Sensibilización locomotora inducida por morfina

Como se ha mencionado anteriormente, además de tolerancia (p. ej. al efecto analgésico), los opiáceos también pueden inducir sensibilización sobre otros fenómenos conductuales y/o neuroquímicos, es decir, una ganancia del efecto tras una exposición repetida a estos fármacos. La sensibilización a la morfina supone una alteración crónica cuyos efectos se pueden manifestar transcurridos muchos meses en ausencia de droga (Babbini et al., 1975), y su expresión es facilitada por el contexto ambiental que rodea a la toma/administración del opiáceo (revisado en Badiani y Robinson, 2004). El caso más paradigmático, en este sentido, es el de la sensibilización al incremento de la actividad locomotora inducido por la morfina. En modelos de experimentación animal, el contexto asociado a la droga puede ser reproducido, administrando el fármaco en un ambiente específico (asociando la administración de la droga a estímulos visuales sonoros u olfativos) o evitado, proporcionándolo en las mismas jaulas donde habitan. En este estudio, los tratamientos farmacológicos fueron realizados en las mismas cajas de registro donde los animales fueron alojados durante todo el estudio y, consecuentemente, el componente contextual que favorece la expresión de la sensibilización fue evitado. Por tanto, tan solo ha sido evaluada la componente farmacológica de la sensibilización locomotora inducida por morfina.

Descripción del activímetro

Durante el transcurso de estos experimentos, la actividad locomotora (espontánea y/o inducida por morfina) de las ratas fue monitorizada de forma individual y simultánea durante 4 semanas sin interrupciones, de tal manera que se obtuvieron registros continuos que ofrecen la posibilidad de detectar y cuantificar cambios en la actividad a lo largo del ritmo circadiano.

Para ello, los animales fueron alojados individualmente en cajas registradoras transparentes (220×220×150 mm; Panlab) situadas en el interior de un cuarto de aislamiento, cuyas condiciones ambientales de luz, temperatura y humedad fueron controladas como se ha descrito anteriormente, y con libre acceso a bebida y comida.

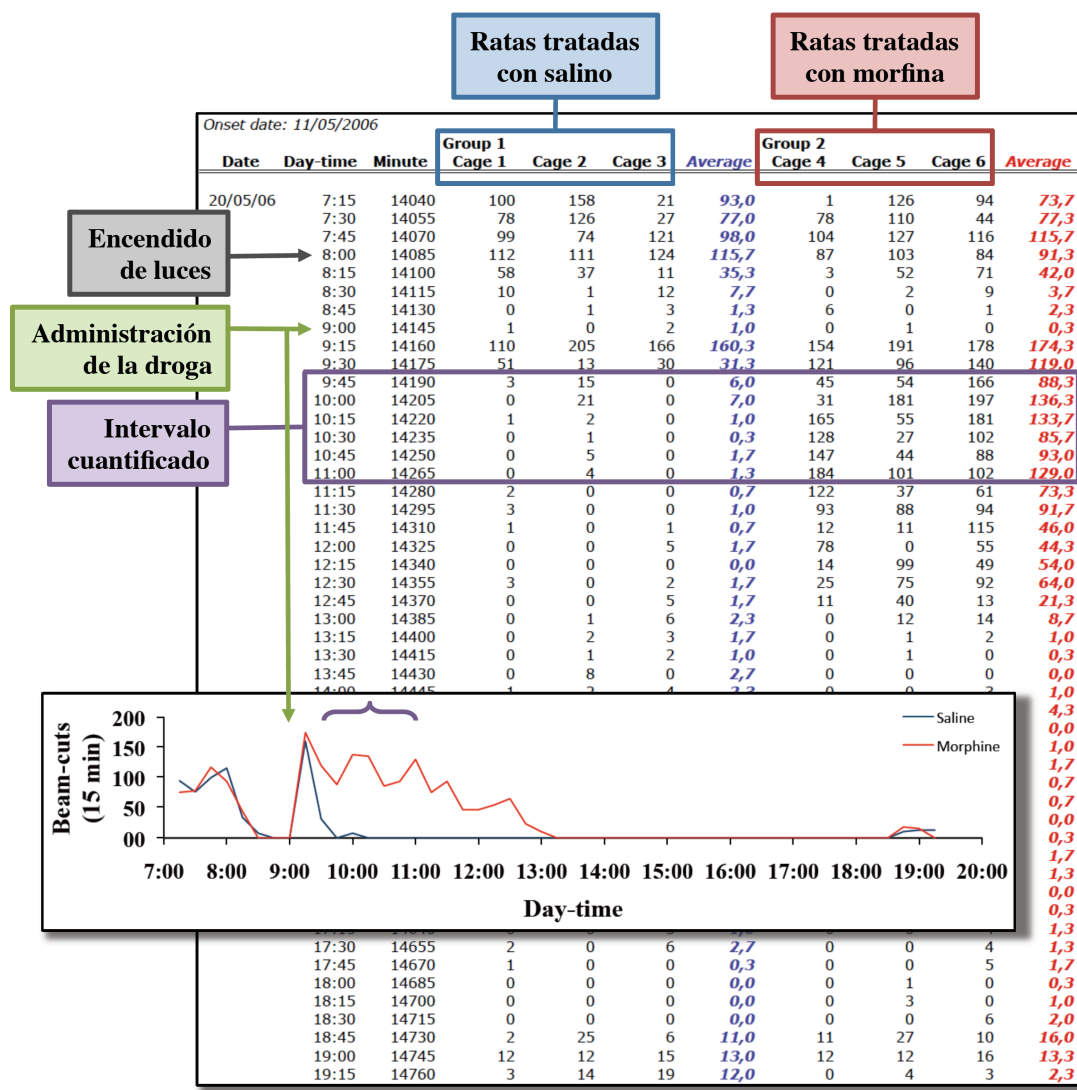


Figura 3-4. Ejemplo de registro continuo de la actividad locomotora de ratas tratadas con salino (n = 3) o morfina (10 mg/kg; n = 3) en el tercer día de tratamiento repetido, e histograma correspondiente.

Cada una de estas cajas está provista de dos haces perpendiculares de luz infrarroja que se cruzan en el centro de la jaula a 4 cm sobre su superficie. Estos haces inciden sobre una placa fotoeléctrica conectada a un ordenador. El animal alojado en el interior de cualquiera de las cajas registradoras, al moverse, puede interrumpir el haz de luz, lo cual es registrado por el software (“El Temps©”; A. Díez-Noguera, Grup de Cronobiologia, Universitat de Barcelona, 1999; disponible en <http://www.el-temps.com>; véase Campuzano et al., 1998; Anglès-

Pujloràs et al., 2009). Cada interrupción de uno de los haces es contabilizada como una unidad de movimiento. Las interrupciones son acumuladas en intervalos consecutivos de 15 min y almacenadas automáticamente por el software en un archivo de texto, de tal manera que los cortes de los haces efectuados por cada una de las ratas en un intervalo de tiempo determinado (p. ej. entre 10:00 y 10:15) generan una nueva línea de texto en el archivo en el instante en el que el intervalo de tiempo termina (en el ejemplo, a las 10:15) (véase figura 3-4).

De esta manera se obtienen series temporales que reflejan la actividad locomotora de cada una de las ratas alojadas en las cajas de registro. Posteriormente se calcula el promedio de los movimientos efectuados por las ratas de un mismo grupo para cada intervalo de 15 min, lo que finalmente es reflejado en los histogramas (figura 3-4). Estos histogramas no fueron utilizados con fines cuantitativos, sino que son una representación cualitativa del comportamiento normal o alterado de los animales, tal y como es reflejado en la figura 3-4.

Procedimiento estándar y cuantificación de la actividad locomotora

Previamente al comienzo de los tratamientos farmacológicos con morfina y/o SL 327, todas las ratas fueron alojadas individualmente en sus respectivas cajas de registro, donde pasaron por un periodo de aclimatación de 7 días, un tiempo suficiente para habituar y estabilizar el ciclo circadiano de los animales. Durante este periodo las ratas fueron manejadas una vez al día para reducir el estrés inducido por el investigador. Además, en los días 5 y 7 de aclimatación, se administró a todos los animales una inyección i.p. de salino (1 ml/kg) para obtener un registro basal de la actividad locomotora y, asimismo, acostumarlas a la agresión que supone la administración de sustancias por esta vía.

Tanto el manejo previo de los animales, como las inyecciones basales y posteriormente la administración de los fármacos fueron realizados durante el intervalo 9:00-9:15 am, cuando los animales se encontraban estabilizados en la fase de sueño del ciclo circadiano (véase figura 3-4). Durante los intervalos 9:00-9:30 se registraron picos de actividad locomotora que reflejan una respuesta a la agresión inducida por el manejo y/o las inyecciones efectuadas a las ratas, y no una respuesta a los tratamientos farmacológicos (figura 3-4). Por ello, los registros obtenidos en estas franjas temporales fueron excluidos de todos los cálculos. En todos los experimentos, la cuantificación de la actividad locomotora se limitó al número de movimientos acumulados durante los siguientes 90 min, es decir, durante el intervalo de

tiempo entre las 9:30 y 11:00 (figura 3-4). Los cálculos de la actividad locomotora de los animales del ejemplo propuesto en la figura 3-4 se hallan resueltos en la tabla 3-4.

Tabla 3-4. Análisis de los datos obtenidos del ejemplo propuesto en la figura 3-4

Intervalo	Grupo salino			Grupo morfina		
	Jaula 1	Jaula 2	Jaula 3	Jaula 4	Jaula 5	Jaula 6
09:30 - 09:45	3	15	0	45	54	166
09:45 - 10:00	0	21	0	31	181	197
10:00 - 10:15	1	2	0	165	55	181
10:15 - 10:30	0	1	0	128	27	102
10:30 - 10:45	0	5	0	147	44	88
10:45 - 11:00	0	4	0	184	101	102
Acumulado	4	48	0	700	462	836
Media±SEM			17±15			666±109

Cuantificación de la severidad del síndrome de abstinencia a la morfina

Este experimento se diseñó con el objetivo de evaluar la expresión de FADD y p-FADD durante la abstinencia a la morfina, y su posible correlación con la intensidad del síndrome de abstinencia, una manifestación conductual de la dependencia a opiáceos. Por tanto, y a pesar de que la conocida expresión “acampanada” (con valores máximos a las 24 h de la retirada del opiáceo) de la conducta asociada al síndrome de abstinencia, era importante para el estudio obtener un valor individual de cada rata para poder compararlo con el contenido cortical de las proteínas diana.

Consecuentemente, para el diseño experimental fueron incluidos grupos de animales dependientes de morfina (10-100 mg/kg durante 6 días) sometidos a distintos periodos de abstinencia (2 h, n = 7; 12 h, n = 11; 24 h, n = 12; 48 h, n = 8; 72 h, n = 4; y 96 h, n = 4), con el fin de obtener un curso temporal que nos ofreciera la posibilidad de establecer una comparación entre conducta y bioquímica. Tras la evaluación conductual, los animales indicados para cada punto de la curva temporal fueron sacrificados como se ha indicado en el apartado anterior. Cabe destacar que, con el fin de incrementar el tamaño muestral, fue evaluado el comportamiento de todos aquellos animales que pasaron por uno de los puntos anteriormente citados, aunque no fueran escogidos para su sacrificio. De este modo, todos los animales (n = 46) fueron evaluados tras 2 h de abstinencia; a las 12 h, todos menos 7 (n = 39); y así sucesivamente. Paralelamente, la conducta de las ratas que recibieron salino en lugar de morfina (grupo control), fue también evaluada siguiendo el mismo curso temporal, y fueron finalmente sacrificadas tras 96 h.

La valoración del síndrome conductual inducido por la retirada del opiáceo fue llevada a cabo por un investigador “ciego” a los distintos tratamientos farmacológicos, tal y como ha sido descrito en otros trabajos (Bläsig et al, 1973; Ulibarri et al., 1987). Para ello, en los intervalos anteriormente citados, las ratas fueron colocadas individualmente en cajas transparentes de metacrilato (50×30×20 cm, Panlab), destapadas, limpias y con el mismo material absorbente en la superficie. Durante este traslado se evaluó y anotó la presencia o ausencia de los siguientes signos: chillido u hostilidad al manejo, lacrimación, y diarrea. Una vez en las cajas de observación, se les permitió un periodo de habituación de 5 min, en el cual exploraron libremente la jaula. Tras este intervalo, y durante un periodo de 10 min, los observadores contabilizaron el número de veces que las ratas realizaban cada uno de los siguientes signos (véase Bläsig et al., 1973):

- “*Wet dog shaking*”; breves episodios de agitaciones o sacudidas del tronco completo, rápidas y/o repetitivas, realizadas apoyándose únicamente sobre sus patas traseras, similares a las realizadas por un perro mojado, y en ocasiones tan violentas que la rata llega a perder el equilibrio.
- “*Teeth chattering*”; castañeteo de dientes, nítidamente audibles.
- “*Grooming*”; acicalamientos, episodios en los que la rata se lava de forma compulsiva, tanto lamiéndose la zona abdominal y genital, como frotándose la cabeza con las patas delanteras.
- “*Writhing*”; estiramiento de las patas delanteras y traseras, sosteniéndose sobre la región abdominal.
- “*Digging*”; episodios en los que la rata escarba en la viruta de forma repetitiva.
- “*Rearing*”; posicionamiento erguido sobre las patas traseras, acompañado de una conducta claramente exploratoria.

Para cada rata, la puntuación obtenida en la valoración del síndrome de abstinencia resultó de la suma aritmética de: 1) el número de signos presentes multiplicado por 10 (como factor de peso; véase Gellert y Holtzman, 1978); más 2) el número total de repeticiones de todos los signos contabilizados durante el periodo de observación.

Nótese que otros signos clásicos de la abstinencia a opiáceos (p. ej., ptosis, cromodacriorrea, salivación, saltos y/o erección/eyaculación) también pretendieron ser evaluados. No obstante, a diferencia de la abstinencia precipitada por antagonista, la abstinencia desencadenada por la

retirada espontánea del opiáceo es de menor intensidad, y muchos de los signos asociados a este síndrome dejan de ocurrir en estos animales (véase Gabilondo y García-Sevilla, 1995).

Paralelamente, en los experimentos en los que se administró SL 327 o EEDQ, además de la conducta, también fueron analizados (en SW 12 y/o SW 24) la pérdida de peso corporal y la variación de la temperatura rectal, como alteraciones periféricas características de la dependencia física a la morfina.

EXPERIMENTOS EN CEREBRO HUMANO POST MÓRTEM

Selección de sujetos y toxicología forense

Para este estudio, se recogieron muestras cerebrales de 36 individuos (tabla 3-5) cuya adicción fue exhaustivamente documentada, basándose en los siguientes criterios:

- la presencia de opiáceos y metabolitos en sangre;
- los informes policiales, incluyendo las declaraciones de familiares y otras personas cercanas al sujeto;
- y, en el caso de que existieran, los historiales médicos disponibles en la Autoridad Sanitaria (la mayoría de los adictos estaban o habían estado sujetos al programa de mantenimiento de metadona; Perret et al., 2000).

Todos ellos, excepto tres, murieron por sobredosis accidental (tabla 3-5; Perret et al., 2000; Rehm et al., 2005). La búsqueda retrospectiva de los adictos cuyos historiales médicos pudieron ser rescatados, permitió la identificación de tres sujetos que habían sido diagnosticados con trastorno depresivo mayor (Manual Diagnóstico y Estadístico de los Trastornos Mentales, IV Edición, Asociación Americana de Psiquiatría), aunque el análisis toxicológico de sus muestras de sangre o pelo no reveló rastro alguno de fármacos antidepressivos. El análisis cuantitativo de opioides, etanol, cocaína u otras sustancias psicoactivas (antidepressivos, antipsicóticos, cannabinoides, etc.) en las muestras de sangre y pelo de los sujetos fue llevado a cabo en la Unidad de Toxicología (STS 390, Swiss Testing, Universidad de Ginebra), por medio de radioensayos y posterior confirmación por espectrometría de masas y/o cromatografía (tabla 3-5). A título comparativo, otros estudios han realizado tests toxicológicos de opioides en sangre con resultados similares a los presentados en este estudio (Goldberger et al., 1994; Merrill et al., 1996; Repetto y Repetto, 1997; Perret et al., 2000; Fugelstad et al., 2003). La presencia de concentraciones letales de 6-

monoacetilmorfina (MAM), así como de morfina o metadona libre en las muestras de sangre de los adictos a opiáceos, indicó que la muerte de estos individuos se produjo de un modo inminente e indoloro (Goldberger et al., 1994; Fugelstad et al., 2003), lo que sugiere que el estado agónico en el momento de su defunción fue mínimo (Hardy et al., 1985). La toxicología del pelo (usualmente recolectado del cuero cabelludo) se empleó también como una herramienta para determinar el tiempo de exposición de cada sujeto a los opiáceos mediante el análisis por secciones (3-25 cm) del bello (Boumba et al., 2006). Así, en 21 de los 36 consumidores de opiáceos (tabla 3-5, sujetos 16-36) se pudo determinar la presencia de MAM (rango: 0.2-20 ng/mg), morfina (rango: 0.1-4.5 ng/mg), o metadona (rango: 0.2-135 ng/mg), indicando que el consumo de opiáceos de este grupo de sujetos fue de largo plazo (subgrupo LT), estimando una exposición a este tipo de drogas que se prolongó durante al menos los 6 meses que precedieron a la sobredosis (véase también Ferrer-Alcón et al., 2004; Pujol et al., 2007). En 11 de estos adictos se detectaron también concentraciones de cocaína (rango: 0.9-40 ng/mg) en las muestras capilares, pero no en la sangre (excepto residuos marginales en dos de los once sujetos; ver Repetto y Repetto, 1997), lo cual indica una exposición continuada a opiáceos con un pasado de abuso de psicoestimulantes (policonsumo). En contraposición a este subgrupo LT, en los restantes 15 consumidores de opiáceos, el análisis toxicológico del cabello no detectó la presencia de opiáceos u otra sustancia psicoactiva (tabla 3-5, sujetos 1-15), indicando que este grupo de sujetos tiene un historial de abuso, si existió, de corta duración (subgrupo ST), en cualquier caso inferior a las dos semanas. Es decir, este subgrupo puede considerarse compuesto por sujetos que murieron tras su primera exposición a la heroína y/o exadictos que, tras un largo periodo de abstinencia, perdieron la tolerancia.

En las muestras de sangre de algunos de estos individuos (11 de los 36) se detectó la presencia de etanol (tabla 3-5), aunque no se halló evidencia alguna en sus historiales clínicos de que estos sujetos fueran dependientes de alcohol. Además, se detectó la presencia de otras sustancias psicotrópicas en sangre y/o pelo tales como antidepresivos o antipsicóticos, pero sus concentraciones se hallaron dentro del rango terapéutico (tabla 3-5).

Tabla 3-5. Características demográficas y toxicológicas individuales de los consumidores de opiáceos

Sujetos por pares	Sexo/edad años	PMD horas	Opiáceos en sangre (µg/ml)	Otros fármacos (µg/ml) Etanol (g/l)	Opioides y otras drogas en cabello (ng/mg)
1	M/45 (M/38)	57 (59)	Met (0.35)	Eth (0.45)+Cit (0.2)	Ninguno
2	F/41 (F/49)	60 (77)	Mor (0.94)	Ven (0.5)	Ninguno
3	M/33 (M/36)	38 (44)	Met (0.2)	Eth (1.36)	Ninguno
4	M/44 (M/39)	29 (25)	Mor (0.3)	Eth (1.17)	Ninguno
5 ^a	M/29 (M/38)	63 (77)	Mor (0.3)	Ninguno	Ninguno
6	M/28 (M/27)	2 (10)	Mor (0.9)	Ninguno	Ninguno
7	F/35 (M/38)	62 (77)	Mor (0.25)	Ninguno	Ninguno
8	M/40 (M/40)	12 (12)	Met (0.3)	Eth (0.62)	Ninguno
9	M/51 (M/56)	16 (16)	Mor (0.35)	Eth (1.99)	Ninguno
10	F/32 (F/23)	43 (55)	Mor (1.45)	Ninguno	Ninguno
11	M/33 (M/29)	22 (25)	Mor (0.9)	Ninguno	Ninguno
12	M/32 (M/27)	22 (20)	Mor (0.6) + Cod (0.3)	Ninguno	Ninguno
13	M/30 (M/34)	37 (42)	Mor (0.2)	Eth (1.45)	Ninguno
14	M/18 (M/20)	20 (21)	Met (0.3)	Cit (0.1)	Ninguno
15	F/33 (F/26)	14 (10)	Met (2.2)	Olz (1.1)	Ninguno
16 ^a	F/45 (F/44)	60 (46)	Met (3.7) + Cod (4.3)	Eth (0.35)+Lp (0.2)	Met (3.3) + Cod (14)
17	M/31 (M/36)	48 (44)	Mor (0.07) ^b	Ninguno	MAM (0.2) + Coc (14)
18	F/37 (M/39)	34 (25)	Met (0.25)	Eth (3.7)	MAM (1.6) + Coc (8)
19 ^a	F/24 (M/38)	75 (77)	Met (0.5)	Ninguno	Met (0.2) + MAM (0.4)
20	M/36 (F/35)	3 (8)	Mor (0.74)	Clo (0.4)	Mor (0.6) + MAM (1.9) + Met (0.5)
21	M/34 (M/38)	86 (77)	Mor (0.85)	Eth (1.72)	Met (0.7) + MAM (0.5) + Coc (0.8)
22	M/42 (M/48)	5 (16)	Met (4.3)	Ninguno	Met (65) + Coc (0.9)
23	M/50 (M/56)	28 (16)	Mor (0.13)+Met(0.4)	Ninguno	Mor (4.5) + MAM (20) + Met (0.6)
24	F/46 (M/52)	32 (28)	Mor (0.9)	Ninguno	Mor (0.4) + MAM (0.2) + Met (0.8)+Cod (13)
25	M/24 (F/23)	53 (55)	Mor (1.2)	THC (0.007)	Mor (0.3) + MAM (1.5) + Coc (4.5)
26	M/34 (M/30)	3 (10)	Met (0.3)	Ninguno	Met (0.4) + Mor (1.8) + MAM (0.8)
27	F/33 (F/30)	16 (15)	Met (1.4)	Ven (2.5)	Met (0.4)
28	F/20 (M/34)	51 (42)	Mor (0.4)	Eth (1.2)+Ven (0.3)	Mor (0.1) + MAM (0.4) + Coc (0.9)
29	M/25 (F/25)	7 (16)	Mor (0.3)	Eth (1.77)	Mor(0.2)+MAM(1.7)+Met(135)+MDMA(6.2)
30	M/47 (M/51)	96 (93)	Met (3.3)	Qua (10.5)	Met (8.7) + Coc (0.9)
31	F/35 (F/26)	12 (10)	Met (1.7)	Flu (0.5)	Met (20) + Mor (0.8) + MAM (0.5)
32	F/36 (M/39)	8 (8)	Mor (0.11) ^b	Coc (0.08)	Mor (0.5) + MAM (0.6) + Cod (2.7)+Coc (13)
33	F/30 (F/39)	40 (34)	Met(0.25)+Mor(0.15)	Ninguno	Met (1.9) + Mor (1.4) + MAM (2.5)+Coc (40)
34	F/26 (F/39)	33 (34)	Met (1.4)	Coc (<0.1)	NT
35	F/35 (M/41)	25 (27)	Met (0.3) ^b	Mir (0.35)	Met (11) + Mor (0.7) + MAM (0.8)+Coc (29)
36	F/48 (M/46)	29 (29)	Mor (0.55)+Met (0.6)	Cit (1.5)+Olz (0.3)	MAM (1.4) + Coc (21)
Adictos	20M/16F 35 ± 1 años	34 ± 4h	Mor (0.55± 0.09, n=21) Met (0.99± 0.26, n=15)		
Controles	18M/9F 37 ± 2 años	35 ± 5h	Ninguno		

Los datos (sexo, M, masculino, F, femenino; edad en años; PMD, retraso autopsico, en horas) de los respectivos controles emparejados están representados entre paréntesis. Los sujetos del 1 al 15 son exadictos o individuos sin un historial de consumo prolongado (subgrupo ST), mientras que del 16 al 36 presentan una historia de adicción

crónica a opiáceos (subgrupo LT). Los datos de toxicología en sangre muestran la presencia de etanol (Eth), antidepresivos (Cit, citalopram; Clo, clomipramina; Flu, fluoxetina; Mir, mirtazapina; Ven, venlafaxina) y/o antipsicóticos (Olz, olanzapina) que corresponden a concentraciones terapéuticas. Algunos adictos también dieron positivo para algunas benzodiazepinas (Lp, levomepromacina; Qua, metacualona) y Δ^9 -tetrahidrocannabinol (THC) en las muestras de orina. También se halló cocaína (Coc) en el cabello de 11 sujetos, pero no en sangre, salvo residuos marginales en dos de los adictos (sujetos 32 y 34). En otro sujeto también se halló 3,4-metil-enedioximetanfetamina (MDMA) en las muestras capilares (sujeto 29). NT: no testado.

^aSujetos diagnosticados con trastorno depresivo mayor.

^bLa causa de la muerte no fue sobredosis (sujeto 17, infarto de miocardio; sujeto 32, homicidio, estrangulación; sujeto 35, indeterminada).

La causa de la muerte de todos los adictos (excepto tres) fue sobredosis accidental de heroína [detección de MAM y morfina (Mor) libre en sangre] o metadona (Met, detección de Met y su metabolito 2-etilidina-1,5-dimetil-3,3-difenilpirrolidina en sangre). Otros sujetos también dieron positivo para codeína (Cod; rango: 2.7-14, n=3) en sus muestras capilares.

Las muestras control fueron obtenidas de 27 individuos sanos que murieron durante el mismo periodo de tiempo y que reunieron, para su inclusión en este estudio, las siguientes características:

- muerte repentina e inesperada (p. ej., accidentes de tráfico, infartos de miocardio, heridas de bala y homicidios);
- retraso autopsico (“*postmortem delay*”, PMD), edad y sexo apropiados para ser emparejados con uno o dos sujetos de cada uno de los subgrupos de adictos;
- y finalmente, ausencia de historial de drogodependencia, abuso de alcohol o diagnóstico de cualquier trastorno mental o neurológico, además de una toxicología negativa en cabello y sangre, con la excepción de la presencia de etanol en sangre en 12 de estos sujetos control (rango: 0.03-2.34 g/L).

Tanto los adictos como los controles con los que fueron emparejados para este estudio, murieron en un período de tiempo muy corto. Un indicador de condiciones terminales severas es la disminución del pH en el cerebro (Hardy et al., 1985), el cual puede afectar a la calidad del tejido. No obstante, el estado agónico de toda esta cohorte de sujetos fue mínimo, y se ha documentado que durante una muerte rápida generalmente el pH permanece inalterado, sin que ello pueda afectar a la expresión génica (Peerce y Cairns, 2003; Li et al., 2004). Por consiguiente, parece improbable que el pH fuera una variable que pudiera modificar los resultados de este trabajo.

Las características demográficas y toxicológicas individuales de todo este conjunto de consumidores de opiáceos, así como las de los controles con los que fueron emparejados, se encuentran detallados en la tabla 3-5. El estudio sobre la señalización apoptótica se realizó sobre toda esta cohorte de individuos. Además, para confirmar los resultados obtenidos sobre la cuantificación de algunas de las proteínas de la cascada apoptótica, los contenidos de Fas y FADD fueron también cuantificados en la corteza prefrontal (BA 9) de una serie independiente de adictos (véase el artículo II, tabla 2).

Efecto del PMD, la edad y el sexo sobre las proteínas diana

El retraso autopsico (PMD, “postmortem delay”), definido como el tiempo transcurrido entre la defunción de un sujeto y el almacenamiento de la muestra a -80°C , el sexo y la edad del individuo en el momento de su muerte son variables que potencialmente pueden alterar los resultados de un estudio post mórtem (Grange-Midroit et al., 2002; Stan et al., 2006). Para evaluar el efecto de estas variables sobre la inmunodensidad de las proteínas diana en la corteza cerebral, se empleó una serie independiente de sujetos sanos, cuyo PMD se estimó entre las 5 y las 102 horas y su edad estaba comprendida entre los 15 y 52 años. Las muestras de esta serie fueron recopiladas como se ha descrito anteriormente (véase criterios de inclusión para sujetos control), incluyendo una toxicología negativa para etanol en sangre.

En el estudio de las proteínas fosforiladas relacionadas con la neuroplasticidad, la marcada degradación de los grupos fosfato durante este intervalo post mórtem (véase artículo III, figura 3) obligó a reducir el número de sujetos en cada grupo y subgrupo, empleando como criterio esencial para su inclusión en el estudio la presencia de un PMD corto, inferior a las 40 horas. Tan sólo 26 adictos de los 36 originales cumplían esta premisa. Las características demográficas y toxicológicas de los grupos y subgrupos resultantes se encuentran resumidas en la tabla 3-6. En comparación con el conjunto original de sujetos, destaca la significativa reducción del PMD medio en esta selección reducida de adictos (de 34 ± 4 a 23 ± 3 horas de PMD). El resto de características relevantes para este estudio (toxicología, edad, etc.) no difieren significativamente de una población a otra (tablas 3-5 y 3-6).

Además, se sabe que los ciclos de congelación y descongelación durante el almacenamiento y uso de las muestras puede inducir una degradación de las mismas (Grange-Midroit et al., 2002). En la corteza prefrontal de los controles y adictos empleados en este trabajo, el patrón tan uniforme de expresión observado en la proteína PARP-1 (banda a 116 kDa) (véase artículo II, figura 9B), un substrato de las caspasas efectoras, sugiere que apenas existió (ante

mórtem) una degradación de ADN, un indicador fiable de la viabilidad celular (Putt et al., 2005). Además, la variabilidad de la inmunorreactividad calculada para algunas de las proteínas (únicamente aquéllas que no se vieron afectadas por el PMD) entre los sujetos control fue relativamente baja (p. ej. $100\pm 6\%$ para el citocromo c en el grupo de los 27 controles). Estas observaciones, en conjunto, pueden ser tomadas como indicadores de la excelente calidad del tejido de las muestras de cerebro humano post mórtem recolectadas para este estudio.

Tabla 3-6. Características demográficas y toxicológicas de los grupos y subgrupos de sujetos incluidos para el estudio de proteínas de señalización con grupos fosfato. Para más detalles ver tabla 3-5.

Grupos y subgrupos	Sexo	Edad (años)	PMD (horas)	Opiáceos en sangre ($\mu\text{g/ml}$)	Opiáceos en cabello (rango: ng/mg)
Sujetos control (n=21)	15M/6F	35 \pm 2.1	22 \pm 2.8	Ninguno	Ninguno
Todos los adictos (n=26)	16M/10F	35 \pm 1.6	23 \pm 2.8	Mor (0.58 \pm 0.11) Met (0.75 \pm 0.19)	
- Consumidores de corto plazo (ST; n=11)	9M/2F	34 \pm 2.6	23 \pm 3.8	Mor (0.67 \pm 0.17) Met (0.75 \pm 0.48)	Ninguno
- Adictos crónicos (LT; n=15)	7M/8F	36 \pm 2.0	22 \pm 4.2	Mor (0.50 \pm 0.15) Met (0.75 \pm 0.19)	MAM (0.2-20) Mor (0.2-5) Met (0.4-135)

PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS DE CEREBRO

Preparación rutinaria de muestras cerebrales para *Western blotting*: homogenado total

En los experimentos rutinarios, las muestras procedentes de la corteza prefrontal de adictos y sujetos control (200-250 mg), así como las muestras de la corteza cerebral (175-225 mg) y del cuerpo estriado (caudado putamen + núcleo accumbens; 70-100 mg) de rata fueron preparadas para su análisis mediante *Western blotting* como ha sido descrito en otros trabajos (García-Fuster et al., 2007a). En resumen, las muestras fueron homogenizadas (PT10/35; Polytron) durante dos ciclos de 10 segundos en tampón de homogenización, conteniendo Tris-HCl (50 mM, pH 6,8), SDS (2%), EDTA (1 mM), y un cocktail de inhibidores de proteasas (1%) y otro de inhibidores de fosfatasa (1%) previamente enfriado a 4°C, y en una proporción 1:15 de peso/volumen. Posteriormente, las muestras fueron sonicadas por duplicado durante dos ciclos de 5 segundos y una alícuota fue recogida para analizar la concentración total de proteínas mediante el método del ácido bicinonínico (BCA, Protein Assay Reagent, Pierce Chemical Company, IL, EE UU). Todas las muestras fueron diluidas en tampón de homogenización para alcanzar una concentración de proteína total de 6 mg/ml. A continuación, se mezclaron volúmenes iguales de muestra y de tampón de electroforesis,

conteniendo Tris-HCl (100 mM, pH 6,8), SDS (3%), glicerol (20%), β -mercaptoetanol (5%) y azul de bromofenol ($\approx 0.1\%$), alcanzando una concentración final de proteína total de 3 mg/ml. Finalmente, todas las muestras fueron hervidas durante 4 min a 95°C y congeladas a -20°C hasta su uso.

Defosforilación enzimática de las muestras cerebrales

La especificidad de los anticuerpos para reconocer formas fosforiladas (véase tabla 3) fue comprobada mediante la exposición de las muestras con fosfatasa alcalina de la mucosa intestinal de becerro (producto 79390, Sigma-Aldrich), como ha sido descrito anteriormente (Ferrer-Alcón et al., 2000). En esencia, una muestra de tejido cerebral de rata (60-100 mg de corteza o estriado) o corteza prefrontal humana [175 mg de un sujeto sano (mujer, 30 años, PMD 15 horas)] fue homogenizada en un tampón conteniendo 50 mM de Tris-HCl pH 6.8, 2% SDS, 2 mM $MgCl_2$, y el cocktail de inhibidores de proteasas (1%), previamente enfriado a 4°C, y en una proporción 1:15 de peso/volumen. Una parte del homogenado total fue centrifugado a $40.000 \times g$ y 4°C durante 15 min para la obtención de la fracción citosólica (sobrenadante). Alícuotas del homogenado total (TH) y del sobrenadante (citosol, S2) fueron incubadas en presencia (AP) o ausencia (C) de fosfatasa alcalina (236 unidades/ml) durante 1 h a 37°C. Otras alícuotas (controles inhibidos, IC) conteniendo fosfatasa alcalina fueron incubadas además con pirofosfato de sodio (100 mM). Las reacciones en la muestras control y AP fueron paradas añadiendo pirofosfato de sodio (100 mM).

Para todas las muestras, se mezclaron volúmenes iguales de homogenado cerebral y de tampón de electroforesis y, finalmente, fueron hervidas durante 4 min a 95°C y congeladas a -20°C hasta su uso.

Ruptura físico-química de agregados proteicos e inducción de oligomerización de FADD

En el procedimiento de disociación de oligómeros de p-FADD (116-92 kDa) para rendir formas monoméricas (23-20 kDa), la corteza cerebral de una rata, fue homogenizada (2 ciclos de 10 segundos) en un tampón previamente enfriado, conteniendo Tris-HCl (50 mM, pH 6,8), SDS (2%), EDTA (1 mM), y un cocktail de inhibidores de proteasas (1%) y otro de inhibidores de fosfatasas (1%), y en una proporción 1:15 de peso/volumen. Posteriormente, alícuotas de esta muestra cerebral fueron incubadas (1 h a 37°C) en ausencia o presencia de ditiotreitól (DTT, 200 mM), seguido de 10 ciclos de congelación/descongelación (-70/37°C).

En otros experimentos, se indujo la auto-asociación de las formas monoméricas de p-Ser194 FADD a formas oligomerizadas mediante su exposición con ión cobre (Cu^{2+}), esencialmente como se ha documentado para otras proteínas (Biasini et al., 2008), con algunas modificaciones. Para ello, una muestra de la corteza prefrontal (100 mg) de un sujeto sano (mujer, 30 años, PMD 15 horas) fue homogenizada en un tampón conteniendo Tris-HCl (50 mM, pH 6,8), SDS (2%), y el cocktail de inhibidores de proteasas (1%) y de fosfatasas (1%), previamente enfriado a 4°C, y en una proporción 1:15 de peso/volumen. La muestra fue sonicada y alícuotas de este homogenado total fueron incubadas (30 min a 30°C) en presencia o ausencia de ión CuSO_4 (100 μM , sulfato de cobre, Sigma-Aldrich). Se ha documentado que bajas concentraciones de ión Cu^{2+} , tales como las empleadas en este estudio, no promueven la precipitación de proteínas (Linder y Goode, 1991).

Tras las incubaciones (con DTT o CuSO_4) una alícuota de cada muestra fue utilizada para la determinación de proteínas totales (BCA), y la concentración de todas las muestras fue ajustada a 6 mg/ml con el tampón de homogenización. A continuación, se mezclaron volúmenes iguales de muestra y de tampón de electroforesis, para obtener una concentración final de proteínas de 3 mg/ml y, finalmente, fueron hervidas durante 4 min a 95°C y congeladas a -20°C hasta su uso.

Localización subcelular de las proteínas diana

La localización subcelular de proteínas diana fue evaluada mediante el uso de un kit de extracción subcelular (Subcellular Proteome Extraction Kit, ProteoExtract™, Calbiochem). Para estos experimentos se recogieron muestras de la corteza prefrontal de dos sujetos sanos (mujer, 30 años, PMD 15 horas; varón, 44 años, PMD 16 horas) para la comparación de sustancia gris frente a sustancia blanca. Además, con el objetivo de analizar el efecto de la adicción a opiáceos sobre la distribución subcelular de las proteínas de interés en este estudio, fueron substraídas muestras de la corteza prefrontal (100 mg) de un subgrupo de adictos LT representativos con sus respectivos controles (parejas 22, 23, 26, 31, 32; tabla 3-5). También se analizó el efecto de tratamientos con sufentanilo (15 $\mu\text{g}/\text{kg}$, s.c., 30 min), morfina (100 mg/kg, i.p., 2 h), y SNC-80 (10 mg/kg, i.p., 30 min) sobre la localización subcelular de proteínas diana en cerebro de rata.

Este método de extracción secuencial se basa en las diferencias de solubilidad de las proteínas localizadas en los distintos compartimentos subcelulares para rendir, de forma sucesiva, cuatro fracciones proteómicas enriquecidas en proteínas del citosol (F1), membranales y

orgánulos membranosos (F2), nucleares (F3) y citoesqueléticas (F4). La eficiencia y selectividad de este procedimiento de extracción ha sido documentada en cultivos celulares (Abdolzade-Bavil, et al., 2004) y en muestras de tejido cerebral (García-Fuster et al., 2007a). Además, en este estudio, la pureza de cada una de las fracciones subcelulares ha sido evaluada mediante la inmunodetección de marcadores selectivos para cada uno de los compartimentos mencionados: statmina para F1 (Di Paolo et al., 1997); Fas (un receptor de membrana) para F2; el elemento de respuesta del cáncer de próstata-4 (PAR-4) para F3 (Wang et al., 2006); y neurofilamento ligero de 68 kDa (NF-L) para F4.

Preparación de muestras cerebrales para ensayos enzimáticos

Muestras procedentes de la corteza cerebral de rata (aproximadamente 100 mg) fueron en primer lugar homogenizadas (PT10/35; Polytron) durante dos ciclos de 10 segundos en un tampón previamente enfriado a 4°C (dilución 1:7.5 peso:volumen), conteniendo 10 mM de Tris-HCl pH 7.4, 5 mM EDTA, 7.5 mM de MgCl₂, y un cocktail de inhibidores de proteasas (1%) y otro de fosfatasas (1%). A continuación, las muestras fueron centrifugadas (40000 × g, 4°C durante 15 min), y el sobrenadante (fracción citosólica) recogido en tubos marcados. Una alícuota fue separada en este momento para realizar la determinación de la concentración de proteínas (BCA). El resto de la muestra cerebral fue congelada a -80°C hasta su empleo en los ensayos enzimáticos.

Preparación de muestras cerebrales para HPLC-ED

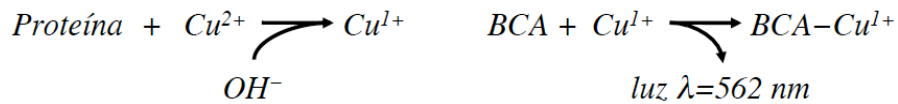
Muestras procedentes del cuerpo estriado (caudado putamen + núcleo accumbens 50-60 mg) fueron homogenizadas durante 30 segundos en 1 ml de tampón previamente enfriado a 4°C, conteniendo 0.01% de K₂EDTA, 0.1% de metabisulfito de sodio (Na₂S₂O₅) y 0.26 M de ácido perclórico (HClO₄). A continuación, las muestras fueron centrifugadas (40000 × g, 4°C durante 15 min), y el sobrenadante (fracción citosólica) filtrado en jeringuillas con un filtro incorporado de 0.45 µm (Spartan-3, Sigma-Aldrich). La muestra cerebral fue finalmente congelada a -80°C hasta su análisis mediante HPLC.

Determinación de la concentración de proteínas

Método del ácido bicinonínico (BCA)

Mediante esta técnica es posible cuantificar la concentración de proteína total presente en una muestra biológica. Está basada en la reacción colorimétrica generada entre el cobre oxidado y el ácido bicinonínico (BCA; Smith et al., 1985). El ácido bicinonínico es un compuesto

capaz de formar un complejo púrpura intenso con iones Cu^{1+} en medio alcalino. Este reactivo forma la base de un método analítico capaz de monitorizar el ión cuproso producido en una reacción entre las proteínas con Cu^{2+} en medio alcalino, la reacción de Biuret, la cual se detalla a continuación:



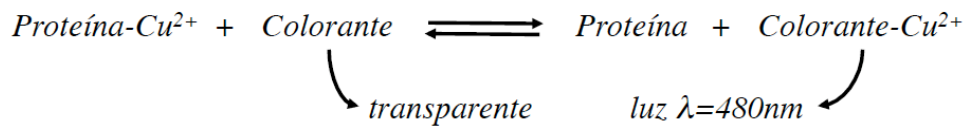
La estabilidad del reactivo y el cromóforo proporciona un método para la cuantificación de proteínas que es sencillo, rápido, muy sensible, y que muestra una gran tolerancia a compuestos que afectan a otros métodos. Este complejo de color púrpura emite un pico de luz a 562 nm y, dentro de un rango de concentraciones apropiado, la intensidad de la luz emitida es directamente proporcional a la concentración de proteína en la disolución. Por consiguiente, para conocer la concentración de proteína en una muestra incógnita es necesario generar, en primer lugar, una curva patrón con soluciones proteicas de concentración conocida para, posteriormente, poder extrapolar los valores.

Para este método, la curva patrón fue fabricada mediante la dilución de una solución comercial de albúmina sérica bovina (BSA) de 2 mg/ml. Se obtuvieron 8 puntos (3 réplicas por punto) de contenidos proteicos comprendidos en el rango 5-70 μg en un volumen final de 100 μl . Paralelamente, se añadieron 5 μl de cada muestra a 95 μl de agua. Cada muestra se analizó también por triplicado. Posteriormente se añadieron 2 ml de una mezcla apropiada de reactivos incluidos en el kit ("*BCA Protein Assay Kit*"; Pierce) a todas las muestras y se incubaron 30 min a 37°C en constante agitación. Finalmente, las muestras fueron atemperadas durante 5 min y se leyó la absorbancia a $\lambda = 562 \text{ nm}$ en un espectrofotómetro (BioPhotometer; Eppendorf) frente a un blanco de reactivo.

Método de precipitación de proteínas

En el proceso de separación subcelular del tejido cerebral se emplean detergentes cuya presencia puede interferir en las técnicas clásicas de Lowry, Bradford o BCA. Para la determinación de la concentración proteica en estas muestras, se empleó un protocolo ("*Non-Interfering Protein AssayTM Kit*"; Calbiochem) en el cual las proteínas son separadas del resto de sustancias en solución mediante su precipitación. Tras la resuspensión de las proteínas, el procedimiento es muy similar a otros métodos colorimétricos, incluyendo la fabricación de una curva patrón con BSA (rango 4-50 μg). Paralelamente, se mezclan 10 μl de cada muestra con

40 µl de agua (también por triplicado), y se añade a todos los tubos las cantidades apropiadas de cobre y mezcla de colorantes indicadas por el fabricante. A continuación, tras una incubación de 15 min a temperatura ambiente, se lee la absorbancia a $\lambda = 460$ nm. La peculiaridad de este método es que el colorante emite la luz cuando se encuentra unido al ión cobre. Las proteínas de las muestras secuestran los iones cobre y, por tanto, cuanto mayor es la concentración proteica, menor es la emisión de luz, tal y como se muestra en la siguiente reacción:



Finalmente, la absorbancia de cada muestra se interpola con la medición de la densidad óptica obtenida con la curva patrón, hallando así la concentración de proteína en la muestra.

DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS DIANA MEDIANTE TÉCNICAS INMUNOLÓGICAS (*WESTERN BLOTTING*)

La detección y cuantificación de las proteínas de interés para este estudio se realizó mediante la técnica de *Western blotting* (WB), una técnica que se basa en el empleo de anticuerpos específicos dirigidos contra dianas proteicas. Esta técnica consta de varios pasos: en primer lugar se realiza una separación electroforética de la muestra biológica, en la cual las proteínas migran con una velocidad diferencial, en función de su peso molecular, a través de un gel de acrilamida; las proteínas que quedan atrapadas en el gel son posteriormente transferidas a una membrana, donde quedan inmovilizadas; estas membranas son incubadas con anticuerpos primarios, los cuales se fijan a las proteínas diana inmovilizadas en las membranas, por reconocimiento de la secuencia antigénica; del mismo modo, los anticuerpos secundarios, con los que se incuban finalmente las membranas, reconocen las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas G (IgG) que componen los anticuerpos primarios fijados a las proteínas diana; los anticuerpos secundarios portan un trazador, el cual emite una señal de una intensidad que es cuantificada, y que además, es proporcional al número de anticuerpos fijados a las membranas, y por tanto, a la cantidad de la proteína diana en la muestra. El WB es una técnica semi-cuantitativa, por lo que siempre es necesario referir los efectos biológicos

a unas muestras control que son siempre cargadas en los mismos geles. Además, es un procedimiento que requiere de distintas formas de controles positivos y negativos. En resumen, el WB es una técnica sencilla, pero en la que surgen diversas complicaciones a lo largo de su desarrollo y, bien empleada, es posiblemente la herramienta más poderosa para el estudio y cuantificación de proteínas celulares *in vivo*. A continuación se detallan los pasos seguidos durante el empleo de la técnica de WB para la detección y cuantificación de proteínas cerebrales en el desarrollo de esta Tesis doctoral.

Separación electroforética

Todas las separaciones electroforéticas realizadas en este trabajo fueron elaboradas con geles desnaturalizantes y discontinuos de poliacrilamida (SDS-PAGE; "sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis"; Laemmli, 1970). Para ello se vertió entre los cristales del soporte 5 ml de un primer gel de separación ("running gel"), al 10 ó 12% (véase más adelante) de una solución comercial de acrilamida y bis-acrilamida (ProtoGel), 0.75 M Tris-Hcl pH 8.8, 0.1% de SDS, 0.05% de APS, y 0.05% de TEMED. Inmediatamente después de cubrió cuidadosamente con agua y se permitió la polimerización a temperatura ambiente durante 45 min. A continuación se retiró el agua y se añadió el gel concentrador ("stacking gel") al 4% de acrilamida, 166 mM Tris-Hcl pH 6.8, 0.1% de SDS, 0.2% de APS, y 0.08% de TEMED. Finalmente se introdujo un peine en el gel (todavía en estado líquido), y se permitió su polimerización durante otros 45 min. Para la preparación de estos geles, se emplearon soportes Mini-Protean® 3 Cell (minigeles de 6 × 8 cm, con 1 mm de grosor; Bio-Rad). En el gel concentrador se introdujeron peines de teflón de 1 mm de grosor, que formaron 15 pocillos (cada uno de 30 µl de capacidad) donde se cargaron las muestras cerebrales. Es importante destacar que los geles de separación se elaboraron al 12% de acrilamida cuando el peso molecular de la proteína diana era inferior a 20 kDa; el resto proteínas fueron resueltas en geles al 10% de acrilamida.

En experimentos rutinarios, volúmenes de muestra conteniendo 40 µg de proteína total (15 µg en los experimentos de distribución subcelular) fueron cargados en los pocillos elaborados en el gel de concentración. Junto a ellos fueron cargados, en el extremo izquierdo del gel, 5 µl de un estándar coloreado comercial ("Prestained SDS-PAGE Standards", Broad Range; Bio-Rad), el cual permitió identificar la banda correspondiente a la proteína diana (de masa molecular aproximada conocida) a través del corrimiento de las proteínas presentes en el marcador (8 proteínas comprendidas en el rango ≈7-210 kDa). Además, es un útil control

positivo para la posterior transferencia, pues las bandas quedan visiblemente impresas en la membrana de nitrocelulosa.

Una vez cargadas las muestras, las células Mini-Protean fueron rellenas con el tampón de electroforesis, conteniendo 25 mM de Tris-HCl pH 8.6, 0.2 M de glicina, y 0.1% de SDS. Entre los electrodos fue aplicada una corriente eléctrica inicial de 80 V, mientras las muestras se apilaban en el gel de concentración. La corriente eléctrica promueve el desplazamiento vertical de las proteínas contenidas en las muestras cerebrales a través del gel. Una vez que las proteínas traspasaron al gel de separación, momento en el cual pueden distinguirse las 8 bandas azules que componen el estándar, la corriente fue incrementada a 120 V hasta el final de la electroforesis. En el gel de separación, los poros formados por la poliacrilamida dificultan el avance de las proteínas presentes en las muestras cerebrales, de tal manera que las proteínas de menor tamaño corren con mayor velocidad que las de masa molecular elevada. Durante este procedimiento, el azul de bromofenol presente en las muestras se mueve con mayor facilidad a través del gel, formando un frente de banda que determina el punto más avanzado de la electroforesis. Cuando el frente de banda se escapó del gel de separación (aproximadamente 120-150 min) la electroforesis se dio por terminada.

Electrotransferencia

Para que las proteínas separadas (en función de su peso molecular) en el gel puedan ser inmunodetectadas, deben ser previamente transferidas a un soporte rígido. En este trabajo se emplearon membranas de nitrocelulosa con poros de 0.45 μm de diámetro (Protran, Schleicher y Schuell, Whatman). La transferencia se realizó según el procedimiento descrito por Towbin et al., 1979, aplicando un campo eléctrico perpendicular al plano del gel. Para ello, el gel fue colocado sobre la membrana de nitrocelulosa, sumergida en el tampón de transferencia, con el fin de evitar la inclusión de burbujas de aire entre el gel y la membrana, que pudieran impedir la correcta transferencia de proteínas. El binomio formado por gel y membrana fue flanqueado por tres capas de papel de cromatografía de 3 mm de grosor (Whatman), y una esponja de fibra de vidrio (Bio-Rad) a cada lado, y finalmente encerrado en un casete de transferencia (figura 3-5). Este sándwich se introdujo en su cubeta correspondiente, la cual se llenó del tampón de transferencia previamente enfriado a 4°C, conteniendo 25 mM de Tris-HCl a pH 8.3, 0.19 M de glicina y 20% de metanol. Dentro de la cubeta se introdujo también un bloque de hielo y un imán que permitiera la agitación constante del tampón, con el fin de mantener la temperatura a 4°C el mayor tiempo posible. A

continuación, la cubeta fue tapada y cubierta de hielo picado. Finalmente, el sándwich fue sometido a una corriente eléctrica constante de 110 V durante 150 min. En todo momento la temperatura de la transferencia fue controlada a través del amperaje del sistema. Por ejemplo, una transferencia normal de 2 geles con una única cubeta, en estas condiciones, comienza con 0.17-0.21 A, y termina en un rango de 0.25-0.30 A. Cuando la temperatura se dispara, se detecta un incremento rápido del amperaje. En estos casos, el tampón de transferencia es sustituido por otro previamente enfriado.

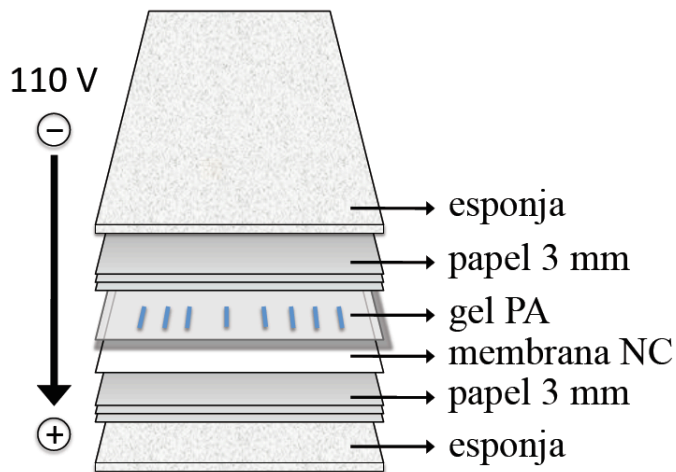


Figura 3-5. Preparación del sándwich de transferencia, incluyendo la esponja de fibra de vidrio, el papel de cromatografía Whatman de 3 mm, el gel de poliacrilamida (PA) conteniendo las proteínas y el marcador molecular, y la membrana de nitrocelulosa (NC).

Incubación con anticuerpos: *immunoblotting*

Una vez terminada la transferencia, el sándwich fue desmontado y las membranas de nitrocelulosa, ahora conteniendo las proteínas de las muestras cerebrales, fueron retiradas. En este momento se comprobó la correcta transferencia de las proteínas mediante la observación del aspecto de los marcadores moleculares. Las membranas correctamente transferidas fueron lavadas con tres baños de 5 min en tampón fosfato salino pH 7.2 (PBS; 137 mM de NaCl, 2.7 mM KCl, 12 mM de Na_2HPO_4 , y 1.38 mM de KH_2PO_4), si la proteína diana no era fosforilada, o en tampón Tris salino pH 7.6 (TBS; 20 mM Tris-HCl, 137 mM NaCl), si la proteína diana era fosforilada. A continuación, las membranas se incubaron durante 1 hora en solución bloqueadora, conteniendo 5% de leche desnatada en polvo y 0.1% de Tween-20 en PBS (para proteínas totales) o TBS (para proteínas fosforiladas). El bloqueo de las membranas previene la fijación de los anticuerpos primarios y secundarios a sitios inespecíficos de la membrana, reduciendo el ruido de fondo (*background*). Una vez bloqueadas, las membranas fueron nuevamente lavadas en PBS/TBS por triplicado y, posteriormente, incubadas durante toda la noche en presencia del anticuerpo primario contenido en la solución bloqueadora correspondiente, a una dilución apropiada para cada

anticuerpo (véase tabla 3-2). Tras 3 nuevos lavados de 5 min en PBS/TBS, las membranas fueron expuestas, durante 1 h a temperatura ambiente, al anticuerpo secundario (anti-IgG de conejo, ratón o cabra, ligado a peroxidasa de rábano) en solución bloqueadora a una dilución de 1:5000. Antes de su revelado, las membranas fueron nuevamente bañadas 3 veces en PBS/TBS.

Sistema de detección por quimioluminiscencia

La inmunorreactividad de las proteínas fue detectada con un sistema de quimioluminiscencia amplificada (ECL, Amersham). Los anticuerpos secundarios se encuentran conjugados con peroxidasa de rábano (Ab-HRP), la cual, en presencia de peróxido de hidrógeno, cataliza la reacción luminescente de oxidación del luminol (figura 3-6A).

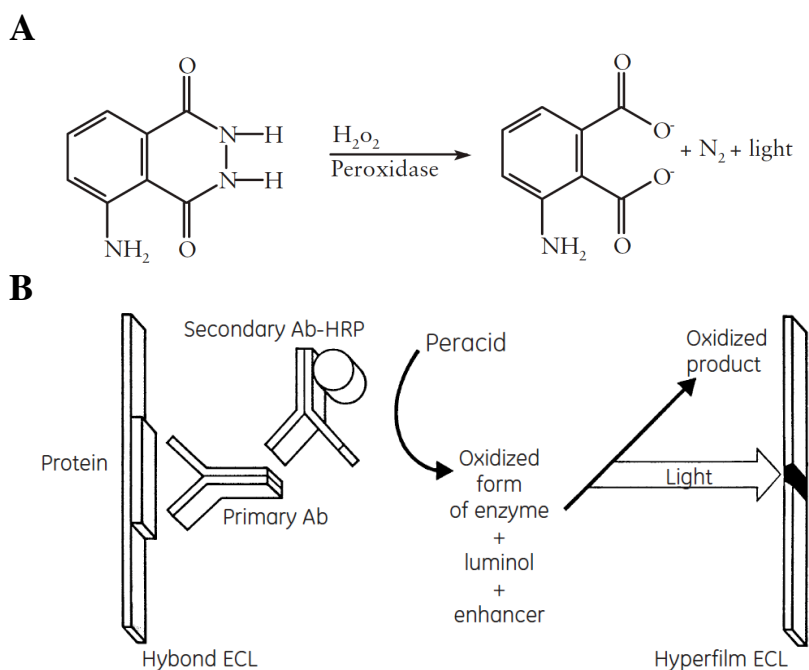


Figura 3-6. (A) Reacción de emisión de luz del luminol en combinación con el peróxido de hidrógeno catalizada por la peroxidasa (B) Detección de proteínas por quimioluminiscencia utilizando el sistema ECL. La peroxidasa de rábano (HRP) conjugada con el anticuerpo (Ab) secundario cataliza la oxidación del luminol, y la luz emitida queda impresa en la película fotográfica (Hyperfilm ECL).

Cada membrana fue incubada 2 min en 10 ml de una mezcla proporcional de los reactivos A y B de este kit. Seguidamente, las membranas fueron secadas en papel absorbente, plastificadas en un film transparente de polietileno, y encerradas en casetes de exposición membrana-película (HypercassetteTM; Amersham). A continuación, en un cuarto oscuro, se introdujo una película fotográfica sensible a la luz (autorradiogramas; Hyperfilm ECLTM; Amersham) en el casete junto a las membranas. En estas condiciones, la luz emitida por la reacción de oxidación del luminol incide sobre la película, quedando impresa a la altura en la cual los anticuerpos primario y secundario han quedado fijados a las proteínas diana, inmobilizadas en la membrana de nitrocelulosa (figura 3-6). El tiempo de exposición del film a las membranas es muy variable (1-60 min), y depende de la calidad y cantidad del anticuerpo empleado, así

como de la concentración de la proteína diana en la muestra cerebral. Tras la exposición, el film fue sumergido en el líquido revelador durante un minuto, lavado con agua, y nuevamente sumergido en el líquido fijador durante otro minuto más, obteniendo así un autorradiograma con las impresiones lumínicas de las bandas inmunorreactivas. En cada experimento se realizaron varias exposiciones con el objetivo de obtener una señal en la que las posibles variaciones en los contenidos proteicos se hallaran en un rango lineal de intensidades.

Cuantificación de las proteínas diana

Los autorradiogramas fueron escaneados con un densitómetro (GS-800 Calibrated Densitometer; Bio-Rad). El software que controla este densitómetro (Quantity One; Bio-Rad) permitió el cálculo del peso molecular de las bandas inmunodetectadas, usando como referencia las bandas trazadas por el marcador molecular. Una vez seleccionada la banda inmunorreactiva perteneciente a la proteína diana, la densidad óptica (IOD, “integrated optical density”) de la huella lumínica correspondiente a cada una de las muestras cargadas en el mismo gel fue cuantificada mediante el uso de este software. La IOD, no obstante, es una unidad de medida arbitraria, no absoluta. Por tanto, todos los cálculos de variación en los contenidos proteicos fueron realizados en comparación a muestras control cargadas en los mismos geles. Puesto que los diseños experimentales concernientes a modelos animales o estudios en cerebro humano son diferentes, la forma de cuantificar los geles se modificó respondiendo a la exigencia de cada diseño.

Cuantificación en cerebro de rata

En un autorradiograma dado, se calculó el promedio de las IODs de las muestras cerebrales correspondientes a las ratas del grupo control. En cada gel fueron cargadas al menos tres muestras control, obteniendo así un promedio representativo y fiable. A continuación, se calculó el porcentaje de variación de cada IOD perteneciente a cada una de las muestras cargadas en dicho gel con respecto a este promedio. Cada muestra fue cargada en al menos tres geles distintos, alternando las muestras control de unos geles a otros, evitando de este modo un posible sesgo. Posteriormente, se calculó, para cada muestra, el promedio de los porcentajes obtenidos en cada uno de los geles donde fue cargada. Este promedio fue considerado como una estimación final para cada muestra. Finalmente, se calculó el promedio y el error estándar de los valores finales de las ratas pertenecientes a un grupo determinado, obteniendo un valor porcentual de cada grupo experimental para la proteína diana en la región

cerebral estudiada. En la figura 3-7 se representa un experimento sin definir, analizando los datos según lo descrito.

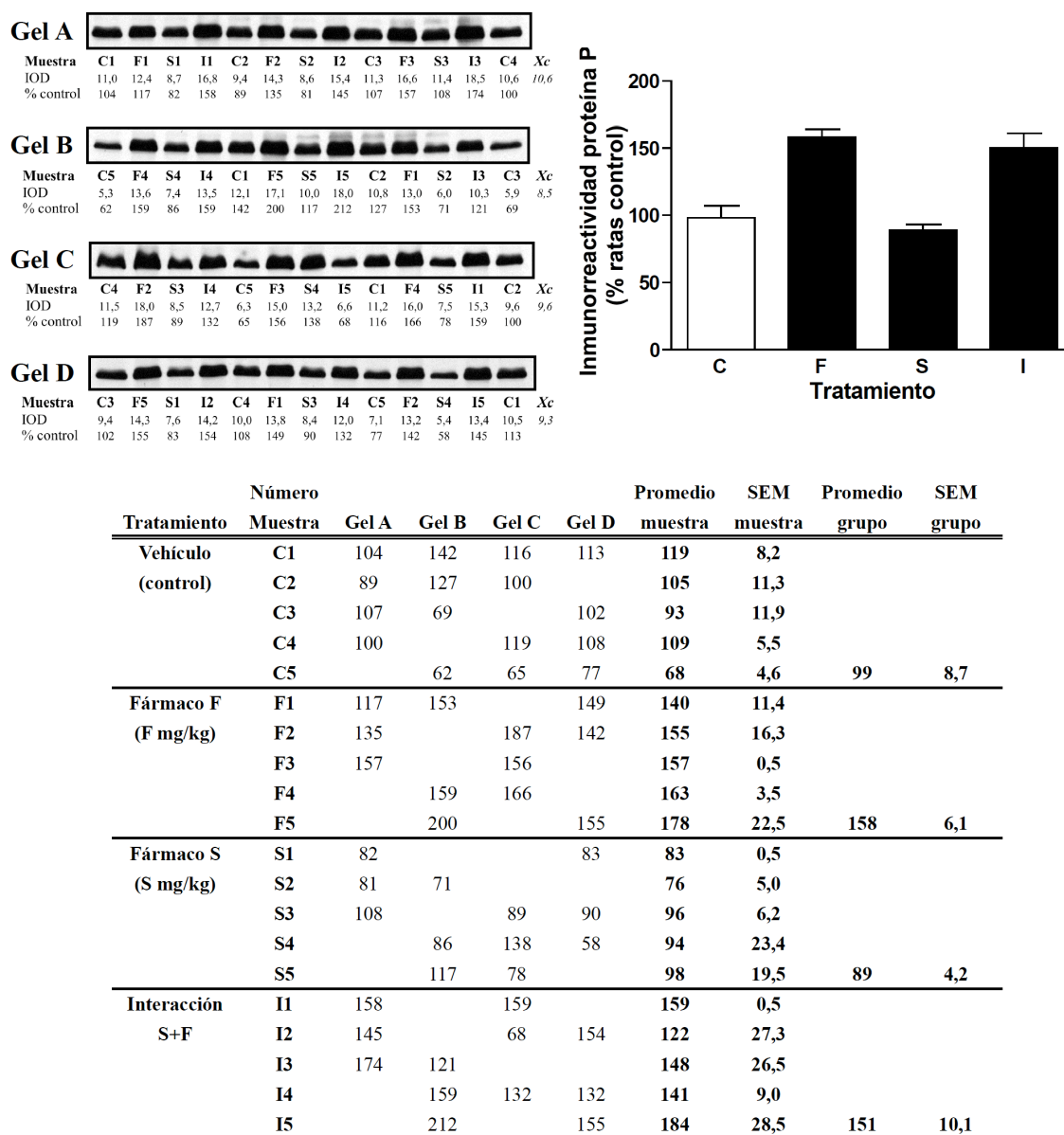


Figura 3-7. Representación de un experimento indefinido del efecto de los Fármacos F y S sobre el contenido cortical de la proteína P, e interacción entre ambos. Grupos de ratas ($n = 5$) fueron tratadas con los fármacos F (F1-5; F mg/kg, s.c., 30 min), o S (S1-5; S mg/kg, i.p., 90 min). Otro grupo de animales (I; $n = 5$) recibió las mismas dosis del Fármaco S y, 60 min más tarde, el Fármaco F. Las ratas pertenecientes al grupo control (C1-5; $n = 5$) recibieron, paralelamente, sendas inyecciones de vehículo (1 ml/kg) por las mismas vías de administración. Las ratas fueron sacrificadas en los tiempos indicados por decapitación, y las muestras cerebrales preparadas para su análisis mediante *Western blotting* con anticuerpos específicos contra la proteína P. En la tabla inferior se representa el análisis de los autorradiogramas, mostrados en el panel superior izquierdo. La gráfica superior derecha refleja que el Fármaco F incrementa ($58 \pm 6\%$) el contenido de la proteína P en la corteza cerebral de rata, mientras que el Fármaco S no parece alterarla. El tratamiento previo con el Fármaco S no alteró el incremento inducido por el Fármaco F ($51 \pm 10\%$).

Cuantificación en cerebro humano

Para el estudio de proteínas corticales en cerebro humano se escogió (a priori) un diseño experimental por pares, en el cual uno (ST o LT), dos (ST y LT) o tres (ST y dos LT) adictos fueron emparejados con uno o dos sujetos control. Los criterios de emparejamiento de sujetos han sido justificados en la sección anterior. En un experimento dado, la muestra cerebral de un adicto fue cargada en el mismo gel, junto a aquella del sujeto control con quien fue emparejado. En el autorradiograma, la IOD medida en el sujeto control fue tomada como el valor 100% y, frente a éste, se calculó el porcentaje de variación de la IOD correspondiente al adicto. Para cada una de las proteínas estudiadas, cada pareja de sujetos fue evaluada en al menos tres geles distintos. La estimación final para cada uno de los adictos fue obtenida calculando el promedio de los valores resultantes en cada uno de los geles en los que fue analizada la muestra cerebral. Con estos datos, se calculó finalmente el promedio de cada uno de los grupos y subgrupos de adictos y, consecuentemente, éstos fueron comparados frente a un valor hipotético del 100% (véase más adelante).

Reciclaje de las membranas (*stripping*) y normalización

Después de un primer uso, las membranas de nitrocelulosa permiten su reciclaje para detectar y cuantificar otras proteínas utilizando nuevos anticuerpos. Este método ("*stripping*") fue empleado de forma rutinaria después de cada experimento como control negativo, para comprobar que los posibles efectos farmacológicos observados no fueron consecuencia de errores en la carga de las muestras cerebrales en los geles. En este procedimiento es preciso seleccionar una proteína control (*housekeeping*) que permanezca inalterada tras los diferentes tratamientos farmacológicos. De forma rutinaria, se cuantificó el contenido de β -actina o, en el caso de enzimas activados por fosforilación, la forma total de la proteína.

Para ello, las membranas fueron rehidratadas en PBS durante una hora a temperatura ambiente. A continuación, se eliminaron los anticuerpos adheridos incubando las membranas (30 min a 50°C) en un tampón (*stripping buffer*) compuesto por Tris-HCl (62.5 mM), SDS (2%) y β -mercaptoetanol (100 mM). Tras 6 lavados de 10 min en PBS, las membranas fueron de nuevo incubadas (1h a temperatura ambiente) en la solución bloqueadora y, a continuación, expuestas al anticuerpo primario durante toda la noche. El procedimiento continuó según el protocolo anteriormente descrito.

La normalización de una proteína diana consiste en calcular el cociente entre la IOD de dicha proteína y la obtenida tras el *stripping* con la proteína *housekeeping* para la misma muestra en el mismo gel. El valor resultante es posteriormente analizado como se ha descrito en el punto anterior. En este trabajo, cuando las IODs de las bandas inmunorreactivas fueron normalizadas por la IOD de la β -actina correspondiente a la misma carga, se obtuvieron resultados muy similares. Aunque se ha demostrado que el contenido de β -actina no se encuentra modulado tras un tratamiento crónico de morfina en modelos animales (Ammon et al., 2003), otros estudios han documentado la alteración de distintas proteínas del citoesqueleto tras la exposición a morfina (Ferrer-Alcón et al., 2003; Marie-Claire et al., 2004; Morón et al., 2007). Además, se ha observado que algunas de las proteínas usualmente utilizadas como controles de carga en *Northern* y *Western blotting*, (p. ej. gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa y β -actina) sufrieron modulaciones muy marcadas en el cerebro de ratas sometidas a estrés agudo y crónico (Derks et al., 2008). Por ello, en este trabajo los resultados son presentados sin la normalización por β -actina.

Caracterización de anticuerpos en tejido cerebral

El WB es, posiblemente, la mejor técnica para cuantificar cambios en los contenidos de proteínas celulares. Particularmente, en tejido cerebral, ha sido empleada para cuantificar cambios en la expresión proteica, actividad enzimática, monitorización de muerte celular, localización subcelular y translocación, etc. No obstante, la fiabilidad de los resultados obtenidos mediante WB depende absolutamente de la calidad de las herramientas utilizadas, es decir, de los anticuerpos. La producción de anticuerpos específicos contra dianas proteicas es un procedimiento muy estandarizado que se ha convertido en un dominio casi exclusivo de las casas comerciales, debido al interés económico que suscitan las técnicas inmunológicas. A pesar de la validación que realizan de sus anticuerpos, en la mayoría de casos nunca son testados en tejido animal por el fabricante. Estas validaciones suelen consistir en una serie de controles positivos y negativos empleando cultivos celulares (normalmente líneas establecidas o células tumorales), con los que se obtienen muestras muy homogéneas en las que apenas se encuentra reactividad cruzada o reconocimientos inespecíficos. Durante la última década, ha habido una explosión de publicaciones en neurociencia empleando WB u otras técnicas inmunológicas. Muchas de ellas han sido tema de profundo debate por la controversia de sus resultados, y (en ocasiones) la carencia de los controles necesarios para caracterizar los anticuerpos empleados, de tal manera que han sido sugeridas ciertas recomendaciones a la hora de trabajar con estas herramientas, con el fin de estandarizar, optimizar y, en definitiva,

dar mayor credibilidad a estos estudios. Así pues, se propone realizar, para cada anticuerpo empleado en el estudio, los siguientes controles básicos (véase Saper y Sawchenko, 2003):

- El primero y más determinante ("gold standard"), consiste en testar el anticuerpo en el cerebro de ratones knock out (KO) para la proteína diana. Si el anticuerpo se une de manera específica a la muestra, debe ser descartado. Evidentemente, esto no es siempre posible, y tampoco es definitivo.
- Comprobar que el peso molecular de la banda inmunorreactiva coincide con la masa teórica de la proteína estudiada.
- Igualmente importante es realizar un test de absorción, en el cual se preincuba el anticuerpo primario con el antígeno, de tal manera que se bloquea la reactividad de las bandas reconocidas por la región específica del anticuerpo. La señal resultante tras la absorción del anticuerpo primario corresponde a bandas inespecíficas, las cuales deben ser descartadas. La señal de las bandas bloqueadas corresponde al antígeno, aunque no se puede descartar la reactividad cruzada, es decir, antígenos de secuencia similar que son igualmente reconocidas por la región específica del anticuerpo primario.
- Paralelamente, la omisión del anticuerpo primario es útil para reconocer lugares de fijación del secundario, que pueden dar lugar a una señal equivocada.
- En cualquier caso, la secuencia del antígeno empleado para inmunizar al huésped debe ser siempre facilitada y, en el caso de los anticuerpos policlonales, también el lote empleado, pues cada anti-suero policlonal corresponde a un solo huésped y, por tanto es único e irrepetible.

Aunque estas directrices (Saper y Sawchenko, 2003) están orientadas más bien para inmunohistoquímica, también deben ser aplicadas al WB. Además, en WB pueden ser empleados otros controles adicionales. Por ejemplo, el uso de proteínas recombinantes purificadas cargadas junto a las muestras, la defosforilación enzimática de la muestra cerebral con fosfatasas (si el anticuerpo tiene como diana una proteína fosforilada), etc. En el desarrollo de esta Tesis doctoral se hizo un especial énfasis en caracterizar los anticuerpos contra FADD y su forma fosforilada en la serina 191/194 (p-FADD), puesto que la inmunodetección de formas agregadas (dímeros u oligómeros) en geles desnaturizantes ha sido muy discutida. No obstante, hoy es ampliamente reconocida la existencia de formas agregadas resistentes a SDS, β -mercaptoetanol u otros agentes desnaturizantes. Además, el hecho de que la ablación genética de FADD sea letal en ratones (Yeh et al., 1998),

imposibilita realizar el control más determinante para caracterizar los anticuerpos contra esta proteína. La caracterización de algunos anticuerpos contra FADD en cerebro de rata, ratón y humano ha sido descrita anteriormente (García-Fuster et al., 2007a). A continuación se describen los controles realizados para la inmunodetección de monómeros y oligómeros de p-FADD (y otras proteínas) en muestras cerebrales.

Inmunodetección de FADD y p-Ser191/194 FADD en cerebro de rata, ratón y humano

Una de las críticas más comunes a la técnica de WB es la detección de proteínas diana en muestras tisulares de una especie empleando anticuerpos dirigidos contra la secuencia de la misma diana, pero cuyo origen corresponde a otra especie distinta. En el caso del p-FADD, no existen actualmente anticuerpos comerciales dirigidos contra la secuencia de rata. Además, aunque se conoce que en humano, FADD es fosforilado en la Ser194 por la CK1α y, en ratón, en su homóloga, la Ser191, la posición de fosforilación en el FADD de rata todavía no ha sido descrita. No obstante, las secuencias murina, de rata y humana de FADD presentan alta homología, y se ha sugerido que el FADD de rata también podría ser fosforilado en la Ser194 (figura 3-8; Zhang et al., 2004). En cualquier caso, las secuencias que flanquean a la Ser191/194 son prácticamente idénticas en las tres especies, y la habilidad de un anticuerpo dirigido contra esa secuencia proteica de cualquiera de las tres especies, esperablemente, reconocerá de forma específica la diana en las muestras tisulares de las otras dos.

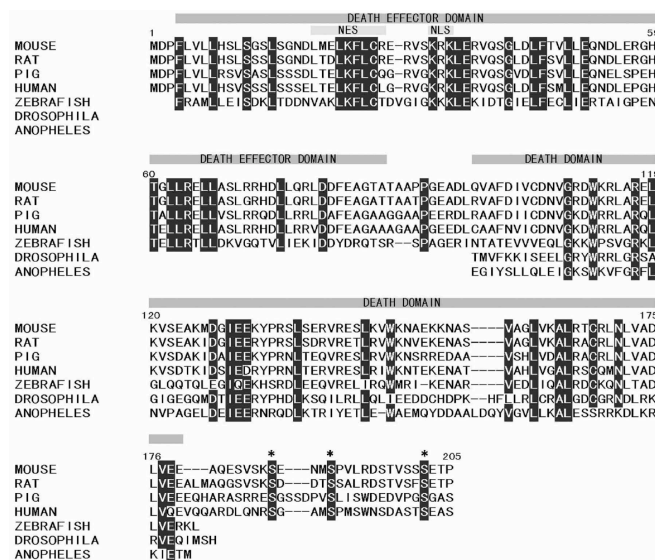


Figura 3-8. Alineamiento de las secuencias de FADD de 7 especies diferentes. Entre el FADD de rata y ratón existe un 87% de identidad de la secuencia, y un 97% de similaridad entre aminoácidos. Entre la rata y el humano, estas cifras son del 68% y el 82%, respectivamente. Los dominios funcionales (DED: "Death Effector Domain"; y DD: "Death Domain") se encuentran altamente conservados entre las distintas especies. Los aminoácidos especialmente conservados han sido sombreados. Además, las serinas conservadas en las cuatro especies de mamíferos susceptibles de ser fosforiladas (en el ratón Ser187, Ser191 y Ser202) se han marcado con un asterisco. Tomado de Zhang et al., 2004.

En este trabajo se evaluó la capacidad de reconocimiento de p-FADD en muestras corticales de rata, ratón y humano, de un anticuerpo dirigido contra un péptido conteniendo la p-Ser191 del FADD murino (arbitrariamente denominado Ab I; figura 3-9A), y otro dirigido contra el

péptido albergando la p-Ser194 del FADD humano (Ab II; figura 3-9B). El patrón de marcaje fue similar en las tres especies. Ambos anticuerpos reconocieron en rata, ratón y humano las formas oligoméricas (≈ 116 kDa) de p-FADD. En cambio, la forma monomérica (≈ 20 -23 kDa) fue reconocida exclusivamente por el Ab II, de forma débil en cerebro de roedores y más marcadamente en el humano.

De forma paralela, estas mismas muestras fueron marcadas con anticuerpos dirigidos contra la forma total de FADD de origen humano (Ab H181; figura 3-9C) y de rata (Clone 28; figura 3-9D). Ambos reconocieron principalmente la forma dimérica de FADD (≈ 55 kDa), como ha sido descrito anteriormente (García-Fuster et al., 2007a), aunque, tras exposiciones prolongadas, ambos anticuerpos marcaron también la forma oligomérica.

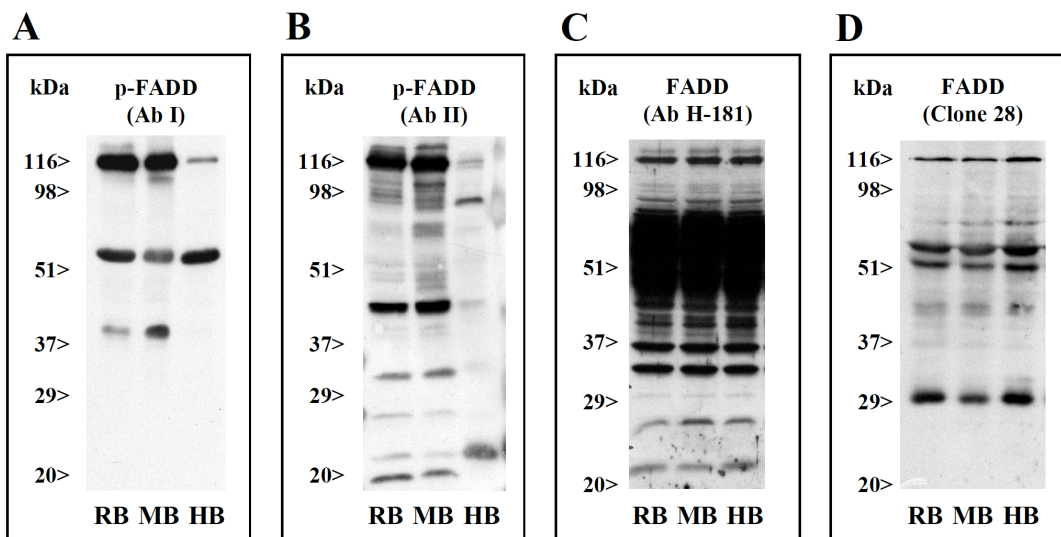


Figura 3-9. Inmunodetección de (A-B) p-FADD y (C-D) FADD en muestras corticales de rata (RB) ratón (MB) y humano (HB). Para más información véase tabla 3-2 y artículo I, figura 2.

Inmunodetección de una proteína recombinante de FADD

Una proteína recombinante de FADD de origen humano fue empleada para caracterizar la especificidad de reconocimiento de los anticuerpos contra FADD y p-FADD. Como era esperado, mientras que el anticuerpo contra la forma total reconoció la proteína recombinante mediante WB, el anticuerpo fosfo-específico fue incapaz de fijarse a esta proteína (figura 3-10). Lo más sorprendente de este experimento fue la inmunodetección de las formas oligoméricas de FADD (≈ 92 y 116 kDa), lo que demuestra la habilidad de FADD de autoasociarse *in vitro*, incluso en presencia de SDS y β -mercaptoetanol.

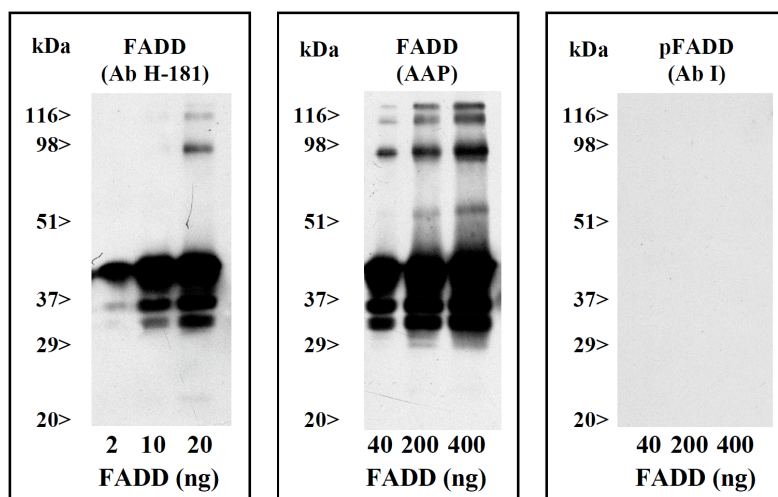


Figura 3-10. Immunodetección de una proteína recombinante de FADD con dos anticuerpos dirigidos contra la forma total de la proteína (Ab H-181 y AAP; panel izquierdo y central, respectivamente), y ausencia de señal cuando se empleó un anticuerpo fosfo-específico (Ab I; panel derecho). Véase artículo I, figura 2.

Defosforilación enzimática de las muestras cerebrales

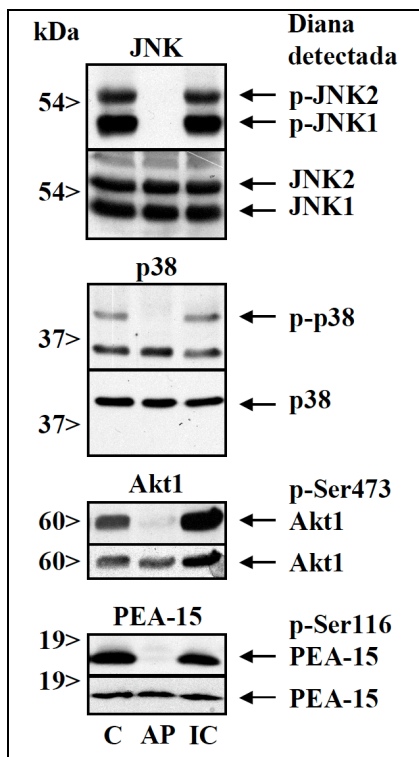
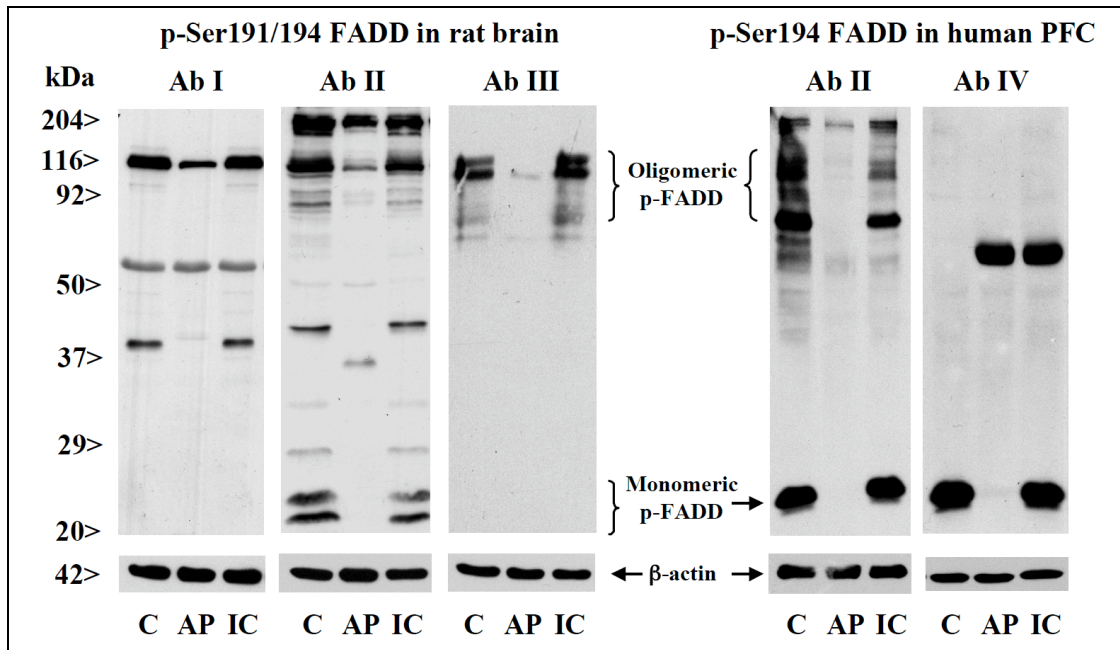
Un método sencillo y elegante para demostrar la especificidad de un anticuerpo por una forma fosforilada de la proteína diana, es la incubación previa de la muestra biológica con una fosfatasa inespecífica, de tal manera que los grupos fosfato incorporados a las proteínas son todos hidrolizados. Si la señal correspondiente a la presunta banda fosfo-específica es entonces atenuada o borrada del autorradiograma, puede entonces afirmarse que el anticuerpo reconoce de manera específica a la proteína fosforilada.

En este trabajo la especificidad de los anticuerpos fosfo-específicos fue testada incubando las muestras cerebrales en ausencia (C) o presencia (AP) de fosfatasa alcalina como se ha descrito anteriormente. Además, en otro grupo de muestras, la fosfatasa fue preincubada con un exceso de pirofosfato de sodio, sirviendo como control inhibido (IC).

En presencia de fosfatasa alcalina se eliminó total (95%-99%; Ab II y Ab III) o parcialmente (60%; Ab I) la señal de las formas oligoméricas de p-FADD, tanto en cerebro de rata como en el humano (figura 3-11). Asimismo, los anticuerpos capaces de detectar la forma monomérica en rata (Ab II) y humano (Ab II y Ab IV), también mostraron plena sensibilidad a la defosforilación enzimática. Además, la fosfatasa alcalina fue sensible a la presencia de pirofosfato de sodio, el cual bloqueó completamente su actividad fosfatasa sobre las formas de p-FADD. Cabe mencionar que la presencia de fosfatasa alcalina no alteró la inmunodensidad de β -actina, la cual se empleó como control de carga (figura 3-11).

La fosfo-especificidad de otros anticuerpos empleados en este trabajo (p-Thr183/Tyr185 JNK1/2, p-Thr180/Tyr182 p38, p-Ser473 Akt1 y p-Ser116 PEA-15) también fue demostrada (figura 3-12). Del mismo modo que ocurría para la β -actina, la inmunorreactividad de las

formas totales de estas proteínas no se encontró modulada por la presencia de la fosfatasa. La capacidad de los anticuerpos contra p-Thr202/Tyr204 ERK1/2 para reconocer específicamente las formas fosforiladas del enzima ya ha sido documentada (Ferrer-Alcón et al., 2004).



▲ **Figura 3-11.** Efecto de la defosforilación enzimática en ausencia (C; control), o presencia de fosfatasa alcalina sola (AP), o preincubada con pirofosfato de sodio en exceso (IC; control inhibido), sobre la inmunodensidad de las formas oligoméricas (116-92 kDa) y monoméricas (23-20 kDa) de p-FADD con anticuerpos específicos (Ab I-IV; ver tabla 3-2), en muestras cerebrales de rata y humano. Las membranas fueron recicladas para su incubación con β -actina como control negativo. Véase artículo I, figura 1, y artículo III, figura 1.

◀ **Figura 3-12.** Efecto de la defosforilación enzimática en ausencia (C; control), o presencia de fosfatasa alcalina sola (AP), o preincubada con pirofosfato de sodio en exceso (IC; control inhibido), sobre la inmunodensidad de (por orden de arriba a abajo) p-Thr183/Tyr185 (p-)JNK1/2, p-Thr180/Tyr182 (p-)p38, p-Ser473 Akt1, y p-Ser116 PEA-15, en la corteza cerebral de rata. Las membranas fueron recicladas para su incubación con los anticuerpos dirigidos contra las respectivas formas totales como control negativo.

En muestras cerebrales de rata y humano, los anticuerpos contra p-JNK y JNK total, reaccionaron con dos de las tres isoformas de la proteína. Así, JNK1 fue reconocida como una banda a 46 kDa (p46 JNK), mientras que otra banda expresada a 54 kDa fue identificada

como JNK2 (p54 JNK) (véase Kuan et al., 1999, 2003 para la identificación de JNK1/2/3 en cerebro de ratón).

Disociación de formas agregadas e inducción de oligomerización de FADD

La autoasociación de FADD es un fenómeno relevante en la señalización apoptótica y no apoptótica del receptor Fas. Como se ha comentado, las formas oligoméricas de esta proteína son resistentes a SDS y β -mercaptoetanol, y la autoasociación puede ocurrir en condiciones desnaturalizantes. La autoasociación de FADD es producida por la formación de uniones homotípicas a través del motivo RXDLL presente en los dominios efectores de muerte (Muppidi et al., 2006). No obstante, la secuencia de FADD presenta tres cisteínas que pueden participar en la estabilización de los homómeros. Para comprobar si existe un equilibrio dinámico entre las formas monoméricas y agregadas (dímeros/trímeros/oligómeros) de FADD y p-FADD inmunodetectadas en los WB, se indujo la ruptura de las formas agregadas mediante ciclos de congelación y descongelación en presencia de DTT (agente reductor). Este tratamiento físico-químico de las muestras cerebrales de rata indujo una reducción (20-45%) de las formas oligoméricas de p-FADD, que se tradujo en un incremento de las formas monoméricas (120-150%) (figura 3-13).

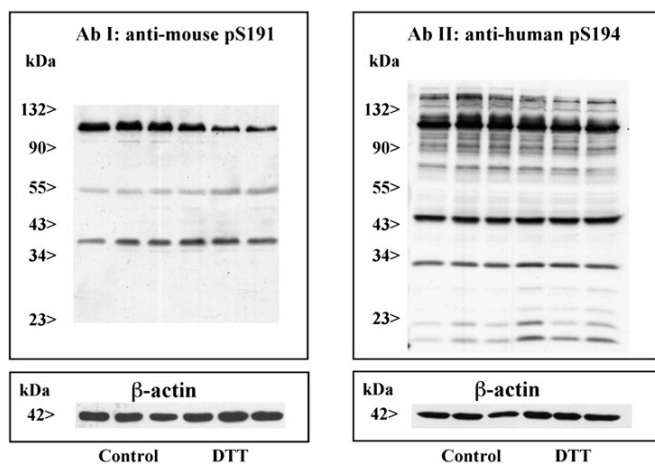


Figura 3-13. Inmunodetección de oligómeros de p-FADD (Control; muestras procedentes de tres ratas distintas) en la corteza cerebral de rata con anticuerpos específicos (Ab I y Ab II) e inducción de su desagregación mediante el sometimiento de las muestras a ciclos de congelación y descongelación en presencia de ditioneitol (DTT; 200 mM; muestras procedentes de tres ratas distintas). El procesamiento de las muestras no indujo alteración en la inmunodensidad de β -actina, que fue empleada como control de carga. Véase artículo I, figura 1

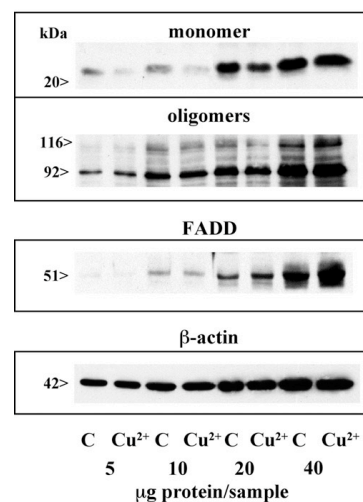


Figura 3-14. Efecto de la exposición de muestras corticales humanas a Cu^{2+} (100 μM) sobre la inmunoreactividad de las formas monomérica y oligoméricas de p-FADD (Ab II) y la forma dimérica de FADD (Ab H-181). El Cu^{2+} no indujo alteración en la inmunodensidad de β -actina, que fue empleada como control de carga. Véase artículo III, figura 1

Por otra parte se indujo la autoasociación de FADD mediante la incubación de muestras corticales humanas con sulfato de cobre. Una concentración de Cu^{2+} como la empleada en el estudio (100 μM) no promueve la precipitación de proteínas y es capaz de inducir la agregación proteica (Linder y Goode, 1991; Biasini et al., 2008). La presencia de Cu^{2+} en las muestras cerebrales disminuyó la inmunodensidad de la forma monomérica de p-FADD (12-64%), e incremento las formas oligoméricas (3-44%) y dimérica/trimérica (18-47%) de FADD (figura 3-14). Estos ensayos sugieren la existencia de un intercambio entre las formas monomérica y agregada de FADD, apoyando la bondad de los anticuerpos empleados en este estudio para reconocer dímeros y/o oligómeros de esta proteína.

Preabsorción de anticuerpos contra p-FADD y CK1 α

Con el objetivo de comprobar la selectividad de las bandas detectadas por los anticuerpos contra p-FADD (Ab II y Ab IV) y CK1 α en las muestras cerebrales, éstos fueron previamente incubados (2 h a temperatura ambiente) en ausencia ("untreated") o en exceso ("preabsorbed"; dilución 1:200; 5 veces la concentración del anticuerpo) de su péptido de bloqueo (antígeno), diluidos en solución bloqueadora. En este antisero fueron incubadas posteriormente las membranas bajo las mismas condiciones anteriormente citadas. Los autorradiogramas reflejan que la banda de 23 kDa (monomérica) y las de 92-116 kDa (oligoméricas) son reconocidas por la región específica de los anticuerpos empleados para este trabajo (figura 3-15). Asimismo, el anticuerpo contra la CK1 α , reconoció dos bandas de masas moleculares muy cercanas (≈ 37 -40 kDa), correspondientes a dos isoformas de la proteína (CK1 α y CK1 α L, respectivamente) descritas anteriormente en otros trabajos (Zhang et al., 1996).

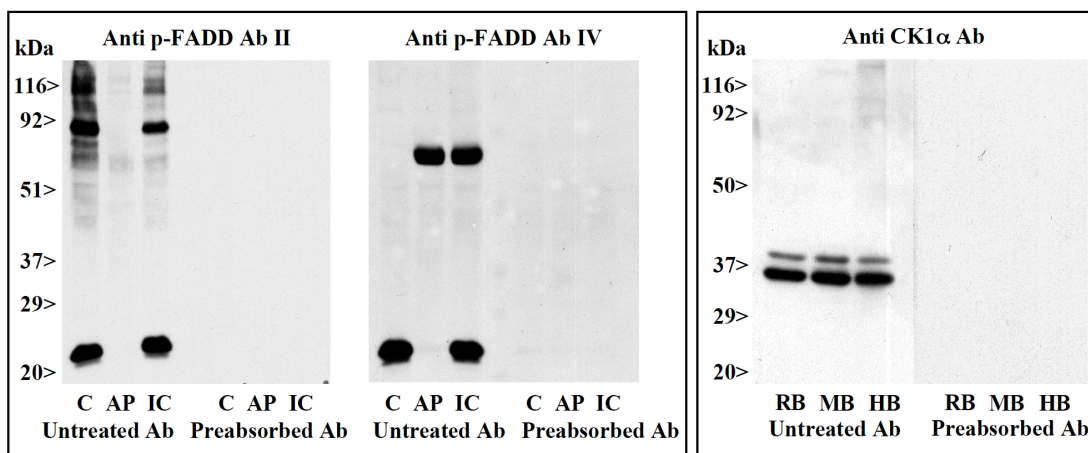


Figura 3-15. Autorradiogramas mostrando la especificidad de reconocimiento de los anticuerpos contra p-FADD (Ab II y Ab IV) y CK1 α , en la corteza cerebral de humano (HB; p-FADD), rata (RB) y ratón (MB) (CK1 α). Las membranas fueron incubadas con el anticuerpo en ausencia ("Untreated Ab") o presencia ("Preabsorbed Ab") del péptido de bloqueo en exceso. La presencia de fosfatasa alcalina (AP) eliminó la señal de las formas monomérica y oligomérica de p-FADD.

Immunodetección de alteraciones funcionales

Cuando dos anticuerpos específicos contra la misma diana proteica son capaces de detectar alteraciones en la misma dirección y magnitud ante el mismo estímulo, representa una prueba muy fiable de que: (1) ambos anticuerpos reconocen la misma diana proteica para los cuales son específicos; y (2) el efecto del estímulo sobre la diana proteica existe.

En un experimento piloto, grupos de ratas recibieron una única inyección de salino (control; 1 ml/kg; $n = 6$) o fentanilo (100 $\mu\text{g}/\text{kg}$, s.c., $n = 6$), y fueron sacrificadas a los 15 min. El análisis de las muestras corticales mediante WB con tres anticuerpos específicos contra p-Ser191/194 FADD (Ab I, Ab II y Ab III) reveló que el fentanilo indujo un incremento en la inmunodensidad de la forma oligomérica (116 kDa) de p-FADD (51 \pm 2%, 36 \pm 5% y 44 \pm 7%, respectivamente).

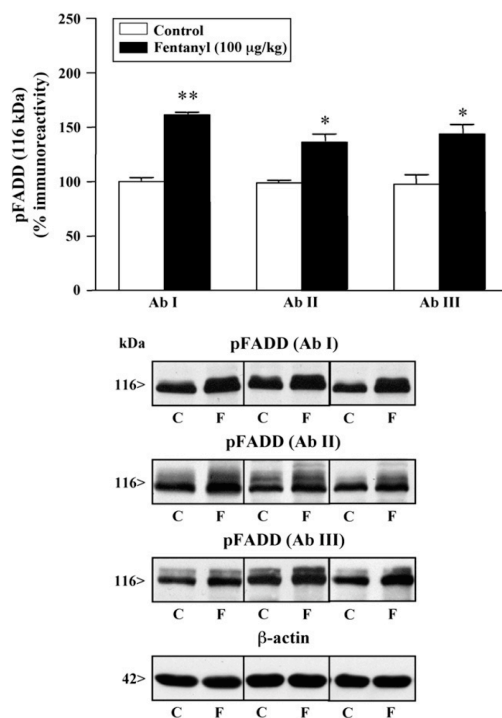


Figura 3-16. Efecto agudo de la administración de fentanilo sobre el contenido de la forma oligomérica de p-FADD (116 kDa) en la corteza cerebral de rata, medido con 3 anticuerpos específicos distintos (Ab I, Ab II y Ab III). Grupos de ratas fueron tratados con salino (C; 1ml/kg; $n = 6$) o fentanilo (F; 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$, s.c., 15 min; $n = 6$). Las columnas reflejan el promedio \pm el error estándar del porcentaje de variación frente al grupo control de n animales por grupo, con al menos 3 repeticiones por rata. * $p < 0.01$, ** $p < 0.001$ vs. control (test t de Student). En la parte inferior se muestran inmunoblots representativos del efecto del fentanilo sobre el oligómero de p-FADD medido con 3 anticuerpos específicos distintos. El tratamiento no alteró el contenido de β -actina, que fue empleada como control de carga. Véase artículo I, figura 3.

Cuantificación de las modulaciones de p-FADD en cerebro de rata y humano

En resumen, los anticuerpos contra p-Ser191/194 FADD reconocieron formas oligoméricas (resistentes a SDS y β -mercaptoetanol) de esta proteína multifuncional a 116 y 92 kDa en cerebro de rata, ratón y humano. Por el contrario, la forma monomérica pudo ser únicamente detectada con un anticuerpo (Ab II) en cerebro de rata o dos (Ab II y Ab IV) en el humano. Estas formas de p-FADD fueron sensibles a la defosforilación enzimática, y la ruptura físico-

química de los agregados proteicos presentes en las muestras cerebrales indujo una reducción de las formas oligoméricas y un paralelo incremento de las monoméricas de p-FADD. Además, la presencia de ión cobre promovió la autoasociación de FADD. Finalmente, tres anticuerpos distintos detectaron incrementos de las formas oligoméricas de p-FADD de una magnitud muy similar en la corteza cerebral de ratas tras la administración de un fármaco opioide. Con estos datos preliminares, en los siguientes experimentos que conforman esta Tesis doctoral, fueron seleccionados el Ab I para la cuantificación de los efectos farmacológicos sobre las formas oligoméricas de p-FADD el en cerebro de rata, y el Ab II en la medición de las formas monoméricas; por contra, en cerebro humano, el Ab II fue empleado para la detección y cuantificación de ambas formas de p-FADD.

La caracterización en células y tejido cerebral de otros de los anticuerpos empleados para este estudio (Fas, FADD, caspasas-3/8, Bax, MAPK, p-Ser116 PEA-15) ha sido previamente documentada (Dargusch et al., 2001; Ferrer-Alcón et al., 2004; Renganathan et al., 2005; García-Fuster et al., 2003, 2004, 2007a).

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA CK1 α

Los experimentos en los que se midió la actividad enzimática de la CK1 α fueron realizados en el Laboratorio de Biología Celular e Inmunología del Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (UAM-CSIC), por gentileza del Dr. Federico Mayor, y bajo la supervisión de la Dra. Catalina Ribas.

La actividad enzimática específica de la CK1 α en preparaciones citosólicas de la corteza cerebral de ratas control y tratadas con sufentanilo (15 μ g/kg, s.c., 30 min) se analizó mediante la incubación de las muestras corticales con ATP radiactivo ($[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$) como ha sido descrito en otros trabajos (Murga et al., 1996) con algunas modificaciones. En esta técnica, el fósforo radiactivo $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ del ATP es incorporado a un sustrato específico para la kinasa diana (péptido sintético RRKDLHDDEEDE-AMSITA), el cual es añadido en exceso, de tal manera que, tras la eliminación del ATP libre, la radiación emitida por cada muestra es proporcional al número de fósforos incorporados, o lo que es lo mismo, a la actividad kinasa específica en la muestra.

Para la evaluación de la actividad kinasa de cada una de las muestras, se preparó por triplicado una combinación de cada una de las sustancias en el orden y la cantidad que se detalla en la tabla 3-7, en un volumen final de 50 μ l.

Tabla 3-7. Elaboración de las muestras para la determinación de la actividad enzimática de la CK1 α

	Concentración		Blanco	Volumen (μ l)		
	En stock	Final		Basal	Actividad	Inhibición
Muestra cerebral	2 mg/ml	0.4 mg/ml	–	10	10	10
Substrato CK1	0.5 μ M	0.1 μ M	10	–	10	10
Inhibidor CK1	50 μ M	10 μ M	–	–	–	10
ddH₂O	–	–	30	30	20	10
Buffer radiactivo¹	5x	1x	10	10	10	10

¹Tampón conteniendo (en stock) 125 mM Hepes pH 7.5, 50 mM MgCl₂, 650 mM KCl, 1 mM Na₃VO₄, 7.5 mM NaF, 250 μ M ATP, 20 μ Ci [γ -³²P]ATP (2-3 cpm/fmol).

Estas preparaciones fueron incubadas a 30°C durante 30 min, momento en el cual las reacciones fueron detenidas añadiendo 20 μ l de ácido tricloroacético (C₂HCl₃O₂). A continuación, las reacciones fueron centrifugadas (48000 \times g, 10 min, 4°C) y los sobrenadantes resultantes fueron transferidos a papeles P-81 cuadrados de 2 \times 2 cm. Estos papeles, conteniendo al péptido, fueron lavados dos veces sumergiéndolos en medio litro de PBS durante 30 min, y una tercera vez durante toda la noche, para la eliminación del ATP radiactivo libre. Finalmente, la radiactividad (medida en cuentas por minuto; cpm) contenida en cada uno de los papeles fue cuantificada en un contador de centelleo (LS 1801; Beckman Coulter).

Para calcular la actividad de la CK1 α se estimó en primer lugar el promedio de las 3 réplicas de cada una de las 4 reacciones experimentales (blanco, basal, actividad, inhibición) elaboradas con cada muestra cerebral. Después se restó la radiactividad cuantificada en los blancos a los valores basal, actividad e inhibición correspondientes para cada muestra cerebral. Los valores obtenidos fueron divididos entre la masa de proteínas cargada en las reacciones, obteniendo así el número de descomposiciones por minuto y μ g de proteína en la muestra. Al promedio de los valores basales resultantes de las distintas muestras procedentes de ratas control (rango 182-213 cpm/ μ g), se le asignó, arbitrariamente, el 100%. Finalmente, se calculó en porcentaje de cada uno de los valores experimentales (basal, actividad e inhibición) obtenidos en cada muestra, frente al promedio de los valores basales de las ratas control.

En cada muestra cortical, la diferencia entre la radiación emitida por la reacción de actividad y la basal, corresponde a la actividad kinasa específica de la CK1 α sobre el péptido sintético.

El valor de la reacción de inhibición fue tomado como un control negativo para cada muestra cerebral, ya que la actividad kinasa sobre el péptido sintético debe ser totalmente bloqueada por el inhibidor, y por tanto, la emisión radiactiva de esta reacción debe ser igual a la de la preparación basal.

CUANTIFICACIÓN DE DOPAMINA Y METABOLITOS MEDIANTE HPLC-ED

La cuantificación de dopamina, ácido homovanílico (HVA) y ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC) en las muestras estriatales de rata fue realizada mediante la técnica de cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) con detector electroquímico (ED), siguiendo el protocolo descrito anteriormente en otro estudio (Moranta et al., 2009). Para ello, alícuotas de 10 μ l de los extractos estriatales de rata fueron sometidos al HPLC en una columna de fase reversa (Spherisorb S· ODS1 C18; tamaño de partículas de 3 μ m; 4.6 mm \times 10 cm) acoplada a una pre-columna (Tracer OSD2 C18; rango del tamaño de las partículas de 2 a 5 μ m; Teknokroma, Barcelona). La fase móvil [0.1 M KH_2PO_4 ; 2.1 mM ácido octano-1-sulfónico; 0.1 mM $\text{K}_2\text{-EDTA}$, 2 mM NaCl, y 12% (vol/vol) metanol (pH 2.7–2.8, ajustado con 85% H_3PO_4)] fue bombeada a través de la columna con un flujo de 0.8 ml/min con un sistema de liberación del solvente (M-510, Waters). Los distintos compuestos fueron detectados electroquímicamente por medio de un electrodo de carbono cristalino, aplicando un potencial de oxidación de +0.75 V contra un electrodo de referencia *in situ* de plata/cloruro de plata (ISAAC; Waters Concorde Electrochemical Detector). La corriente producida fue monitorizada a través de una interfase (Waters busSAT/IN Module) conectada a una computadora. Las concentraciones de dopamina y sus metabolitos en una muestra dada fueron calculadas interpolando la altura del pico correspondiente contra una curva estándar usando el software MillenniumTM (Waters)

ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS

Todos los datos fueron analizados mediante el uso del software PrismTM, versión 4.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, EE UU). Los resultados están expresados como promedios \pm el error estándar de la media (SEM).

Puesto que muchos de los tests empleados en bioestadística asumen una distribución Gaussiana de la población (p. ej., ANOVA), antes de aplicar estos análisis comparativos, los datos de cada una de las poblaciones experimentales fueron sometidos a un test de

normalidad. Todos los datos experimentales en este trabajo pasaron dicho test. No obstante, dada la naturaleza subjetiva de la medición, la valoración de la intensidad del síndrome de abstinencia en las ratas dependientes de morfina se consideró como una medida no paramétrica. El resto de mediciones (proteínas cerebrales, actividad enzimática, cuantificación de dopamina y metabolitos, y evaluación de la actividad locomotora) fueron consideradas paramétricas, asumiendo una distribución normal de las poblaciones experimentales. Asimismo, todos los tests estadísticos empleados fueron a dos colas, y el nivel de significancia escogido fue de $P \leq 0.05$. Para cada experimento fue empleado uno o varios de los siguientes análisis estadísticos, siempre acorde con el diseño experimental.

Análisis de datos en los experimentos con ratas

En el análisis estadístico de variables paramétricas, para la comparación de dos grupos experimentales se empleó el test *t* de Student, mientras que la comparación de más de dos grupos experimentales fue llevada a cabo con un análisis de la varianza (ANOVA). Los ANOVAs empleados fueron de varios tipos:

- ANOVA de una vía, para la comparación de una única variable,
- ANOVA de dos vías, en el caso de que hubiera dos variables, y
- ANOVA de medidas repetidas, cuando la misma variable fue medida en los mismos grupos de animales en varios momentos del experimento.

Siempre que el ANOVA resultara significativo, fue acompañado de un test (*post hoc*) de Bonferroni, el cual se empleó para detectar diferencias significativas de forma individual entre los grupos experimentales.

Para el análisis de los datos tomados en la valoración del síndrome de abstinencia se empleó el test de Kurskal Wallis, seguido del test (*post hoc*) de Dunn.

La posible correlación entre dos variables paramétricas se evaluó mediante el test de Pearson, mientras que para la posible asociación entre variables no paramétricas se utilizó el coeficiente de correlación de Spearman.

Análisis de datos en los experimentos con cerebro humano

El diseño experimental para los ensayos en cerebro humano incorpora un estudio por pares (adictos *versus* individuos sanos). Dichos emparejamientos fueron realizados *a priori* y en función de variables (PMD, sexo y edad) que podrían alterar los resultados del estudio y, por

consiguiente, se utilizó un test que tuviera en cuenta el emparejamiento. Así pues, para el análisis estadístico de los datos se aplicó un "one-sample" test t de Student (con $n-1$ grados de libertad), el cual compara el promedio del grupo experimental (en este caso un porcentaje respecto al grupo control) con un valor hipotético de 100 (véase Motulsky, 1995). Los subgrupos de adictos ST y LT fueron comparados del mismo modo con el grupo control.

RESULTADOS

ARTÍCULO I

Título Opioid receptor agonists enhance the phosphorylation state of Fas-associated death domain (FADD) protein in the rat brain: functional interactions with casein kinase Ialpha, Galpha(i) proteins, and ERK1/2 signaling

Autores García-Fuster MJ*, Ramos-Miguel A*, Miralles A, García-Sevilla JA

* MJ G-F y A R-M contribuyeron a partes iguales en este trabajo

Revista Neuropharmacology, 2008; 55: 886-899

Resumen

Estudios anteriores han sugerido que algunos fármacos opioides pueden promover acciones anti-apoptóticas a través de la reducción de FADD (García-Fuster et al., 2007), la proteína que acopla la señalización de los receptores de muerte al interior celular. La fosforilación de FADD en la serina 191/194 (p-FADD), catalizada por la CK1 α , parece regular las actividades no apoptóticas de esta proteína multifuncional. En este estudio se investigó la fosforilación de FADD en el cerebro de ratas sometidas a varios tratamientos con fármacos opioides, así como los mecanismos moleculares (CK1 α , MAPKs/ERK1/2, proteínas G $\alpha_{i/o}$) que podrían conducir a las alteraciones inducidas por estos fármacos. En el cerebro de rata, ratón y humano, varios anticuerpos contra p-FADD reconocieron las formas monoméricas y oligoméricas de esta proteína, independientemente del origen del anticuerpo. El tratamiento agudo con agonistas μ (fentanilo, sufentanilo y morfina) y δ (SNC-80) incrementó, a través de mecanismos dependientes de los receptores opioides, la inmunodensidad de las formas monomérica y oligomérica de p-FADD en la corteza cerebral de rata. A nivel subcelular, estos incrementos fueron más destacados en membranas y núcleo. La estimulación de p-FADD remitió tras el tratamiento crónico con morfina, pero no con el de SNC-80. La administración aguda o crónica del agonista κ -opioide U-50488-H no alteró los contenidos de p-FADD en la corteza cerebral de rata. La administración aguda de sufentanilo redujo la actividad catalítica y la inmunodensidad de la CK1 α en el citosol. No obstante, tanto el sufentanilo como la morfina indujeron incrementos de la kinasa de FADD en núcleo y membranas. Por el contrario, SNC-80 no alteró la localización subcelular de la CK1 α . A diferencia de FADD, la estimulación de p-FADD inducida por SNC-80 no fue bloqueada mediante la inhibición de MEK/ERK. Además, la toxina de pertusis no pudo prevenir los efectos del SNC-80 sobre FADD ni p-FADD porque la propia toxina alteró los contenidos de estas formas de la proteína en el mismo sentido que lo hizo el opioide, sugiriendo que el FADD podría ser una diana específica

de la toxina. Los resultados de este estudio sugieren que los fármacos opioides podrían ejercer acciones neuroprotectoras y/o neuroplásticas a través de la fosforilación de FADD.



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Neuropharmacology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/neuropharm

Opioid receptor agonists enhance the phosphorylation state of Fas-associated death domain (FADD) protein in the rat brain: Functional interactions with casein kinase I α , G α_i proteins, and ERK1/2 signaling

M. Julia García-Fuster^{1,2}, Alfredo Ramos-Miguel¹, Antonio Miralles, Jesús A. García-Sevilla*

Laboratori de Neurofarmacologia, Institut Universitari d'Investigació en Ciències de la Salut (IUNICS), Universitat de les Illes Balears, Cra Valldemossa km 7.5, E-07122 Palma de Mallorca, Spain; and Red Temática de Investigación Cooperativa en Salud sobre Trastornos Adictivos, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 25 October 2007

Received in revised form 2 June 2008

Accepted 28 June 2008

Keywords:

FADD phosphorylation
Opioid agonists and antagonists
Casein kinase I α
Pertussis toxin
SL327 (MEK inhibitor)
Rat brain

ABSTRACT

Opioid drugs have been proposed to promote anti-apoptotic signals in brain through inhibition of FADD protein [García-Fuster et al., 2007. Effects of opiate drugs on Fas-associated protein with death domain (FADD) and effector caspases in the rat brain: Regulation by the ERK1/2 MAP kinase pathway. *Neuro-psychopharmacology* 32, 399–411]. FADD phosphorylation by casein kinase I α (CKI α) appears to regulate its non-apoptotic activity. This study investigated the effects of opioids on p-FADD in rat brain, as well as various mechanisms that could link opioid receptors with p-FADD, including the modulation of CKI α , G α_i proteins and ERK1/2 signaling. In rat, mouse and human brains, various anti-p-FADD antibodies immunodetected the monomeric and oligomeric forms of this protein, irrespective of the antibody origin and specific Ser191 or Ser194 phosphorylation site. Acute μ - and δ -agonists increased, through specific opioid receptor mechanisms, the content of oligomeric and monomeric p-FADD forms in rat cortical homogenates (25–61%) and subcellular compartments, with most relevant effects for sufentanil in membrane (239%) and nucleus (136%). p-FADD induction vanished with repeated (5 days) morphine but not SNC-80, and opioid withdrawal induced a new (morphine) or sustained (SNC-80) stimulatory effect (32–33%). The κ -agonist (–)-U-50488H failed to stimulate p-FADD. Sufentanil reduced CKI protein and kinase activity in the cytosol (30–37%). Morphine, but not SNC-80, augmented CKI α in cytosol, membrane and nucleus (36–104%). In contrast to FADD, the ability of SNC-80 to stimulate p-FADD was not sensitive to ERK1/2 blockade. Pertussis toxin did not prevent the opposite effects of SNC-80 on p-FADD and FADD because the toxin by itself markedly altered their basal contents, indicating that FADD could be a novel toxin target. The upregulation of p-FADD induced by μ/δ -agonists could play a relevant role in the anti-apoptotic and/or neuroplastic effects of opioids.

© 2008 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Fas-associated death domain (FADD) protein was initially reported as an adaptor molecule that mediates the signaling of various death receptors belonging to the tumor necrosis factor receptor superfamily (Chinnaiyan et al., 1995; Kischkel et al., 1995). The function of FADD is essential in Fas-induced apoptosis, a fundamental process for homeostasis and development in all tissues (Sharma et al., 2000; Sastry and Rao, 2000). Upon Fas activation and receptor trimerization, a death-inducing signaling complex (DISC) is formed by recruitment of at least FADD and

initiator pro-caspase-8, which provides a molecular scaffold to induce the death signal with the activation of effector caspases (Algeciras-Schimmich et al., 2002; Lee et al., 2006; Feig et al., 2007). Notably, 23 kDa monomeric FADD has the potential to be highly oligomeric through a self-association process that appears to increase the efficiency of Fas signaling (Sandu et al., 2006; Werner et al., 2006). FADD, a postulated cytoplasmic protein (see O'Reilly et al., 2004), whose structure possesses sequences for nuclear localization and export signals (Zhang et al., 2004), may also have a function in the nucleus most probably unrelated to its pro-apoptotic activity (Screaton et al., 2003).

In addition to its well-established function in mediating apoptotic signals, Fas (Siegel et al., 2000; Lambert et al., 2003; Peter et al., 2007) and FADD have additional roles in cell growth and differentiation (Park et al., 2005; Tourneur et al., 2005; Werner et al., 2006). In fact, FADD and caspase-8 appear to be instrumental in linking Fas to non-apoptotic pathways through the activation of

* Corresponding author. Tel.: +34 971 173148; fax: +34 971 173184.

E-mail address: jesus.garcia-sevilla@uib.es (J.A. García-Sevilla).

¹ M.J.G.-F. and A.R.-M. contributed equally to this work.

² Present address: The Molecular and Behavioral Neuroscience Institute, University of Michigan, Ann Arbor, MI 48109-0720, USA.

JNK (Matsumoto et al., 2007). In the CNS, Fas/FADD stimulation has been demonstrated to promote neurite outgrowth (Desbarats et al., 2003) and neuronal branching (Zuliani et al., 2006) through ERK activation. Interestingly, FADD displays, outside the death domain, a single serine phosphorylation site (human: Ser194; mouse: Ser191), which is crucial for its non-apoptotic activity (Zhang et al., 2004). Casein kinase I α (CKI α), a serine/threonine kinase of wide subcellular distribution (Zhang et al., 1996; Knippschild et al., 2005), is the main enzyme that mediates p-Ser FADD in various cells, and through this mechanism the multifunctional protein can regulate the cell cycle and the sensitivity to antineoplastic drugs (Alappat et al., 2005). Moreover, phosphorylation of FADD also appears to be essential for its accumulation in the nucleus and export to the cytoplasm (Screaton et al., 2003; Alappat et al., 2005).

Opioid drugs were shown to induce Fas upregulation and FADD downregulation in the rat brain (Boronat et al., 2001; García-Fuster et al., 2003, 2004, 2007a). This opposite modulation suggested that possible apoptotic signals engaged by opioids through Fas (Mao et al., 2002; Liao et al., 2005; Pérez-San Emeterio et al., 2006) would be offset through FADD inhibition, which in turn was dependent on the activation of anti-apoptotic ERK1/2 signaling (García-Fuster et al., 2007a). Notably, the basal contents of Fas aggregates and FADD are increased in the cerebral cortex of δ -opioid receptor-deficient mice, indicating that this receptor can tonically inhibit the expression of Fas/FADD complex (García-Fuster et al., 2007b). The opioid modulation of p-FADD might also be relevant in mediating some anti-apoptotic signals induced by opioid receptors (Tegeeder and Geisslinger, 2004). Against this background, the aim of this study was to assess the effects of opioid drugs on brain p-FADD, and to investigate the roles of CKI α , G α_i proteins and ERK1/2 signaling in its regulation.

2. Materials and methods

2.1. Drug treatment of rats

Adult male Sprague–Dawley rats (200–250 g; housed at 22 °C, 70% humidity, and 12-h light/dark cycle) were used. The animals were treated in accordance with the European Communities Council Directive of 24 November 1986 (86/609/EEC) and in agreement with the local ethical committee. All efforts were made to minimize the number of animals used and their suffering. The rats received fentanyl (100 μ g/kg, s.c., 15 min), sufentanil (2.5–30 μ g/kg, s.c., 30 min), morphine (100 mg/kg, i.p., 2 h), SNC-80 (δ -agonist, 10 and 30 mg/kg, i.p., 30 min), or (–)-U50488H (κ -agonist, 30 mg/kg, i.p., 1 h). Other rats were injected with naloxone (10 mg/kg, i.p.) alone (90 min) or 60 min before sufentanil (15 μ g/kg), or with naltrindole (δ -antagonist, 5 mg/kg, i.p.) alone (60 min) or 30 min before SNC-80 (10 mg/kg). For the chronic treatment with morphine, the rats were injected (i.p.) three times daily during 5 days with increasing doses of the opioid (10–100 mg/kg) and killed 2 h after the last dose. After this treatment, naloxone (2 mg/kg, i.p.)-precipitated withdrawal (2 h) or spontaneous withdrawal (48 h) was induced, which resulted in the expected behavioral reaction (data not shown; Miralles et al., 2005). In other chronic experiments, the rats were treated with SNC-80 (10 mg/kg) or (–)-U50488H (10 mg/kg) once daily during 5 days. After these treatments, naltrindole (5 mg/kg, i.p., 2 h) or

nor-binaltorphimine (κ -antagonist, 5 mg/kg, i.p., 2 h)-precipitated withdrawal was induced, which resulted in a mild behavioral (κ) reaction or the absence of behavioral (δ) signs (data not shown; Milanés and Laorden, 1998; Brandt et al., 2001). Control rats received chronic saline or DMSO in parallel. The animals were killed by decapitation at the indicated times, and specimens of the cerebral cortex and corpus striatum dissected on ice, frozen in liquid nitrogen, and then stored at –80 °C.

2.2. FADD dephosphorylation, dissociation of FADD oligomers, and monitoring of apoptotic cell death

In addition to rat brain, mouse (cerebral cortex) and human (prefrontal cortex) samples were also used for the immunodetection of p-FADD with different antibodies (Table 1). The specificity of anti-p-FADD antibodies was assessed by Western blot analysis using calf intestinal mucosa alkaline phosphatase (94–118 units, Product 79390, Sigma–Aldrich) (García-Fuster et al., 2007a). The dissociation of p-FADD oligomers (disulfide-cross linked forms) to monomeric forms was assessed as described (García-Fuster et al., 2004). Briefly, rat cortical membranes were incubated (1 h at 37 °C) in the absence or presence of the lipophilic sulfhydryl alkylating reagent dithiothreitol (DTT, 200 mM) or *N*-ethylmaleimide (NEM, 1 mM), followed by a freeze/thaw treatment to –70 °C, to block native cysteine residues (rat FADD contains three cysteine residues; see Zhang et al., 2004). The potential of morphine to induce apoptosis was assessed by measuring the cleavage of poly(ADP-ribose)-polymerase (Garnett et al., 2006), using the PARP Cleavage Detection Kit (Calbiochem, Darmstadt, Germany).

2.3. Subcellular distribution of p-FADD and CKI α , and effects of opioid agonists

The subcellular localization of p-FADD and CKI α in the cerebral cortex, and the effects of sufentanil (15 μ g/kg, s.c., 30 min), morphine (100 mg/kg, i.p., 2 h) and SNC-80 (10 mg/kg, i.p., 30 min) in the different compartments were monitored by use of the Subcellular Proteome Extraction Kit (ProteoExtract™, Calbiochem) (see García-Fuster et al., 2007a). Protein concentrations were determined by the Non-Interfering Protein Assay Kit (Calbiochem). This sequential extraction method is based on the different solubility of proteins in certain subcellular compartments to yield four subproteomes enriched in cytosolic (F1, cytosolic fraction), membrane and membrane organelle-localized (F2, membrane fraction), soluble and DNA-associated nuclear (F3, nuclear fraction) and cytoskeletal (F4, cytoskeletal fraction) proteins. The efficiency and selectivity of this subcellular extraction procedure have been reported (Abdolzade-Bavil et al., 2004), and in the current rat brain study it was assessed by the immunodetection of stathmin in F1 (Di Paolo et al., 1997), Fas in F2 (a membrane receptor), nuclear protein prostate apoptosis response 4 (PAR-4) in F3 (Wang et al., 2006), and neurofilament (NF-L) in F4.

2.4. Determination of CKI α activity

The effect of sufentanil (30 μ g/kg, s.c., 30 min) on CKI activity was measured in the rat cerebral cortex using a specific peptide substrate (RRKDLHDEEEDAMSITA) and following standard procedures with some modifications (Murga et al., 1996; Izeradjene et al., 2004). Briefly, aliquots of cytosolic preparations (S2) from saline- and sufentanil-treated rats (22 and 44 μ g protein) were incubated with the peptide (0.1 μ M), in the absence or presence (10 μ M) of the CKI inhibitor D4476 in a reaction buffer (25 mM Hepes, pH 7.5; 10 mM MgCl₂; 130 mM KCl; 0.2 mM Na₃VO₄; 1.5 mM NaF; 50 μ M ATP; 4 μ Ci [γ -³²P]ATP) at 30 °C during 30 min. Reactions (50 μ l) were stopped by addition of 30% C₂HCl₃O₂. Other procedures and incorporation of [³²P] into the substrate were assessed as described (Murga et al., 1996).

2.5. Effect of pertussis toxin on SNC-80-induced changes in FADD and p-FADD

Rats were pretreated with pertussis toxin (PT, i.c.v.) to ADP-ribosylate (cysteine 350) and inactivate G $\alpha_{i/o}$ proteins (Clark and Traynor, 2006). PT (Sigma–Aldrich, P7208, Batch 034K1409) was administered essentially as described

Table 1
Characteristics of the antibodies used for the detection of FADD and other proteins in rat brain tissue

Protein	Antibody	Antigen	Host	Catalog	Batch	Company
p-FADD	Ab I	Mouse p-FADD (short peptide containing p-Ser191)	Rabbit	2785	1	Cell Signaling, USA
p-FADD	Ab II	Human p-FADD (short peptide containing p-Ser194)	Rabbit	sc-12439	C072	Santa Cruz, USA
p-FADD	Ab III	Human p-FADD (short peptide containing p-Ser194)	Rabbit	2781	2	Cell Signaling, USA
FADD	H-181	Human FADD (28–208 residues)	Rabbit	sc-5559	J-2004	Santa Cruz, USA
FADD	Clone 28	Rat FADD (97–178 residues)	Mouse	558202	08738	BD Biosciences, USA
CKI α	C-19	Human casein kinase I α (C-terminal residues)	Goat	sc-6477	K2305	Santa Cruz, USA
G α_{i2}	Clone L5	Protein-purified whole molecule	Mouse	G111	086L200	Leinco, USA
PARP	512739	Human PARP (215–228 residues)	Rabbit	512729	D33259	Calbiochem, FRG
Stathmin	CS-3352	Human stathmin (residues surrounding Ser38)	Rabbit	3352	1	Cell Signaling, USA
Fas	M-20	Mouse Fas receptor (C-terminal residues)	Rabbit	sc-716	F1306	Santa Cruz, USA
PAR-4	A10	Rat nuclear protein PAR-4 (1–334 residues)	Mouse	sc-1666	J-305	Santa Cruz, USA
Neurofilament-L	Clone NR4	Pig spinal cord	Mouse	5139	086K4823	Sigma Chemical, USA
β -actin	Clone AC-15	Human β -actin (2–16 residues)	Mouse	A1978	016K4817	Sigma Chemical, USA

(García-Sevilla et al., 1978). The rats were anesthetized with isoflurane (700 cm³/min, Abbott) and their skulls exposed by means of a midline incision. A hole was drilled on the right side 2 mm posterior to bregma and 2 mm lateral from the sagittal suture. Then PT (3 µg in 10 µl vehicle, pH 7.0) was slowly administered into the cavity of the lateral ventricle (4 mm below the surface of the skull) by means of a Hamilton syringe. The hole was closed with dental cement and the skin sutured with sterile staplers. Then the animals were housed in individual cages for recovery. Control rats received the vehicle (10 µl, i.c.v.) following the same procedure, which was verified by injection and localization of dye into the right lateral ventricle. The experiments (PT alone or followed by SNC-80) were performed 24 h after the administration of the toxin when the gross behavior of the animals was normal. The contents of FADD, p-FADD and Gα₁₂ proteins were quantified in the right cerebral cortex.

2.6. Effect of MEK inhibition on the basal contents of FADD, p-FADD and CKIα, and on SNC-80-induced changes in p-FADD

The compound SL327 is a brain-penetrating and selective inhibitor of MAP/ERK kinases (MEK1/2): IC₅₀ for MEK1/2, 0.18–0.22 µM; IC₅₀ for ERK1/2, >50 µM (Scherle et al., 2000). Groups of rats were treated with SL327 (10, 20 and 30 mg/kg, i.p., 90 min) to assess the effects of an inhibition of ERK1/2 activity on the basal contents of FADD, p-FADD and CKIα in the cortex and striatum. Other rats were treated with SL327 (20 mg/kg, i.p.) alone (90 min) or 60 min before the δ-agonist SNC-80 (10 mg/kg, 30 min) to determine the influence of an impaired ERK1/2 signaling in the regulation of p-FADD by this agonist. Control rats received DMSO or SNC-80 (10 mg/kg, i.p., 30 min). The doses of SL327 were chosen from previous studies that demonstrated effective brain ERK inhibition (Valjent et al., 2006; García-Fuster et al., 2007a).

2.7. Sample preparations, immunoblot assays, and quantitation of target proteins

Brain samples (cortex and striatum) were prepared as described (García-Fuster et al., 2007a). Proteins were determined by the BCA Assay (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA). In routine experiments, proteins (40 µg) were separated on 10% SDS-PAGE minigels (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA), which was followed by immunoblotting standard procedures (García-Fuster et al., 2003, 2007a). The primary affinity-purified antibodies (overnight incubation at 4 °C) are listed in Table 1, and were used at the appropriate dilutions (1:500–1:10 000). The secondary antibody, horseradish peroxidase-linked anti-rabbit, anti-goat or anti-mouse IgG, was incubated at 1:5000 dilution in blocking solution at room temperature for 1 h. In order to test the selectivity of anti-p-FADD and anti-CKIα antibodies with specific proteins, the corresponding antigenic peptide (sc-12439P, batch C201, and sc-6477P, batch J-1802, Santa Cruz) was preincubated in excess with the antiserum to block the binding of the antibody.

Protein immunoreactivity was detected with the ECL system and visualized by exposure to Hyperfilm (Amersham, Buckinghamshire, UK) for 60 s to 60 min. The autoradiograms were quantified by densitometric scanning (IOD, GS-800 Calibrated Densitometer, Bio-Rad). Prestained markers were run on the gels to serve as internal markers for antigen molecular-weight determinations (Harlow and Lane, 1999), using the Bio-Rad software. The amount of target proteins in brain samples of rats treated with opioid drugs was compared in the same gel with that of control rats which received saline or DMSO solution. This procedure was assessed 3–6 times in different gels (each gel with different samples from saline/DMSO- and drug-treated rats). Finally, percent changes in immunoreactivity with respect to control samples (100%) were calculated for each rat treated with the specific drug in the various gels and the mean value used as a final estimate. As a control for sample loading and protein transfer, the blots were stripped (Boronat et al., 2001) and reprobed with anti-β-actin monoclonal antibody (negative control). The brain content of this cytoskeletal protein is not altered by opioids (Ammon et al., 2003; Marie-Claire et al., 2004). Very similar results were obtained when control and experimental immunoblots (IODs) were corrected by the corresponding β-actin content (data not shown).

2.8. Data and statistical analysis

Data were analyzed with GraphPad Prism™. Results are expressed as means ± S.E.M. One-way ANOVA followed by Bonferroni's test, and Student's *t*-test were used for the statistical evaluations. Correlation coefficients were calculated to test for possible association between variables. The level of significance was chosen as $p \leq 0.05$.

2.9. Drugs and chemicals

Fentanyl citrate (Sigma–Aldrich Química, Madrid, Spain); sufentanil citrate (Janssen-Cilag, Madrid, Spain); morphine HCl (Unión Químico-Farmacéutica, Madrid, Spain); (+)-4-[(αR)-α-(2S,5R)-4-allyl-2,5-dimethyl-1-piperazinyl]-3-methoxybenzyl]-N,N-diethylbenzamide, SNC-80; (1S-trans)-3,4-dichloro-N-methyl-N-[2-(1-pyrrolidinyl)cyclohexyl]-benzene-acetamide HCl, (–)-U50488H; naloxone HCl; naltrindole HCl; nor-binaltorphimine HCl; and α-amino-(4-aminophenyl-thio)-methylene-2-(trifluoromethyl)-benzeneacetoneitrile, SL 327 (Tocris Cookson Ltd., Avonmouth, UK). Recombinant FADD (DD: 109–208 residues) with

glutathione-S-transferase (GST) tag (Abnova Corporation, Taipei, Taiwan). CKI substrate, lot B50445, and CKI inhibitor D4476, lot D22439 (Calbiochem, Darmstadt, Germany). Other materials were purchased from Cell Signaling, Amersham or Sigma.

3. Results

3.1. Immunodetection of p-FADD forms in brain tissue

Western blot analysis of rat brain tissue with anti-p-FADD antibodies revealed three major species of p-FADD: ≈ 116, 37–40, and 20–23 kDa (Fig. 1A–D; see Table 1 for antibodies I, II, and III). These putative p-FADD forms and others (≈ 204 and 92 kDa) were sensitive to enzymatic dephosphorylation (60–100%), demonstrating the specificity of p-FADD species detected in total homogenate and cytosolic brain preparations (Fig. 1A–D). Monomeric p-FADD (23 kDa) was immunodetected in rat cortex (weak signal) and striatum (strong signal), but only with Ab II (Fig. 1B,C). Preincubation of Ab II with its antigenic peptide resulted in the blockade of the various p-FADD immunoreactions (data not shown). Other bands recognized by these antibodies, but not sensitive to alkaline phosphatase or peptide competition, were considered nonspecific. Preincubation of rat cortical membranes with DTT (200 mM) or NEM (1 mM, not shown) reduced the immunodensity of high-molecular mass p-FADD forms (20–45%) and increased that of the monomer (120–150%) (Fig. 1E,F), suggesting that disulfide bonds could participate in FADD oligomerization.

Very similar patterns of p-FADD forms were immunodetected in mouse and human cerebral cortices with Abs I and II (Fig. 2A,B), which indicated that p-FADD can accurately be measured in rat brain tissue irrespectively of the antibody origin (Ab I: anti-mouse pS191; Ab II: anti-human pS194). On the other hand, rat and mouse p-FADD (i.e. ≈ 116, 37 and 23 kDa bands) were also immunodetected in brain with two antibodies recognizing total FADD protein regardless of its phosphorylation state (Fig. 2C; see also García-Fuster et al., 2007a). As expected, recombinant FADD was immunodetected with Ab H-181 (total FADD) (Fig. 2D), but not with Ab I (p-FADD) (not shown). Moreover, the μ-opioid receptor agonist fentanyl (100 µg/kg, 15 min) significantly increased the content of ≈ 116 kDa p-FADD in the rat cerebral cortex independently of the anti-p-FADD antibody used (Ab I: 61%, Ab II: 36%, Ab III: 44%) (Fig. 3).

From these experiments, various p-FADD forms were selected to further assess the effects of opioid drugs in the rat cerebral cortex. Thus, oligomeric p-FADD was mainly immunodetected with Ab I, and monomeric p-FADD with Ab II after prolonged exposure times (weak signals).

3.2. Subcellular distribution of p-FADD in rat brain

In the cerebral cortex, p-FADD forms (116 and 37 kDa) were mainly expressed in the cytosolic (F1) and/or nuclear (F3) fractions (Fig. 4E,F), and monomeric p-FADD (23 kDa) was only detected in the nucleus (F3) (Fig. 4F). The contents of these p-FADD forms were lower in the membrane (F2) and cytoskeletal compartments (F4) (Fig. 4E,F, and G for specific subcellular markers). Other bands recognized by these anti-p-FADD antibodies were most probably nonspecific or degradation products (see above). A similar subcellular distribution for dimeric FADD has been reported (García-Fuster et al., 2007a).

3.3. Effects of μ-opioid receptor agonists on the content of p-FADD in rat brain

Similarly to fentanyl (Fig. 3), acute sufentanil (15 µg/kg, 30 min) increased p-FADD content (116 kDa: 34%; 23 kDa: 24 ± 2%, $n = 3$, $p < 0.01$) in the cerebral cortex, and naloxone antagonized these

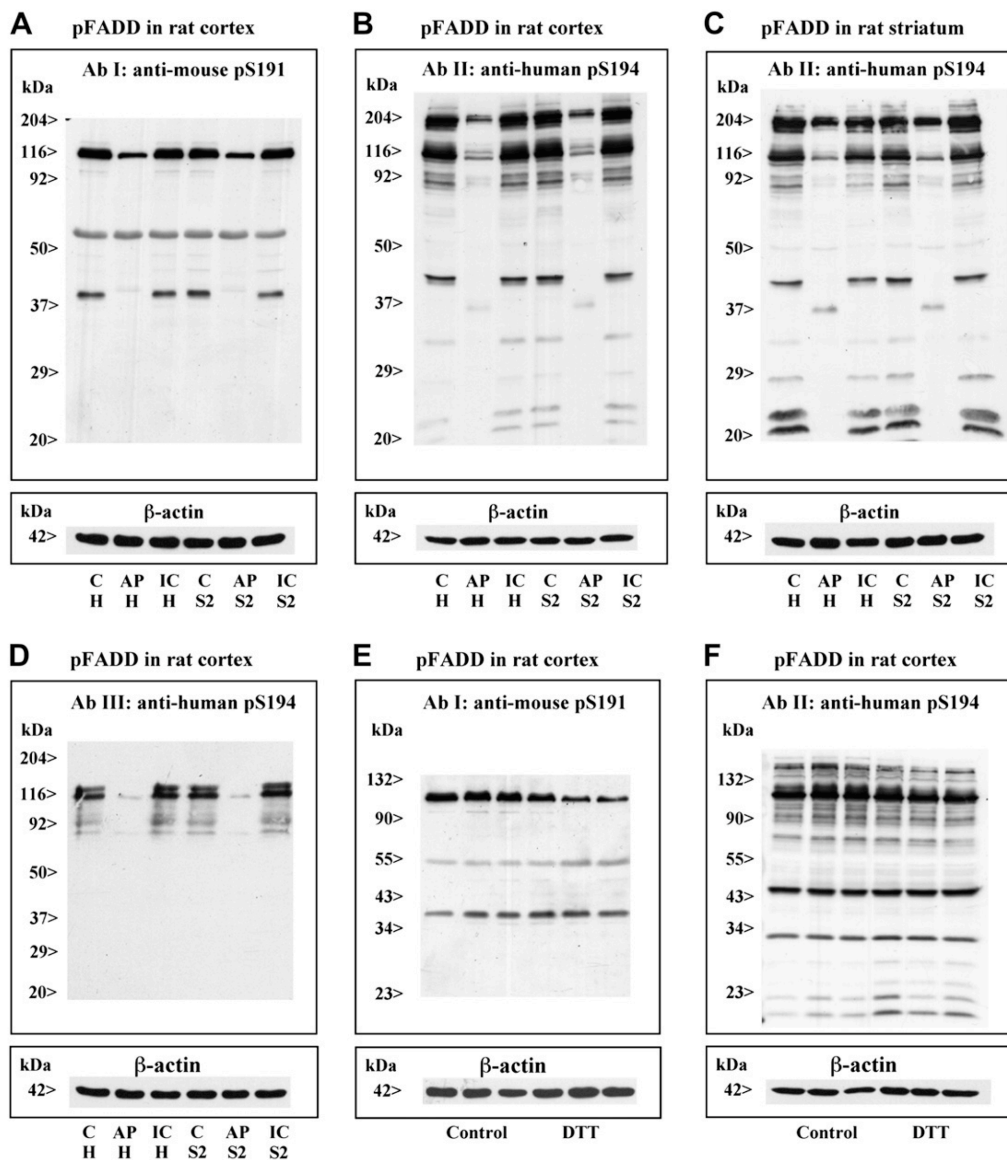


Fig. 1. (A–D) Representative autoradiograms of Western blots depicting labeling of immunodetectable p-FADD species (≈ 204 – 92 kDa, ≈ 37 – 40 kDa and ≈ 20 – 23 kDa forms) with various affinity-purified polyclonal antibody (A: Ab I; B–C: Ab II; D: Ab III; see Table 1), and the effect of protein enzymatic dephosphorylation in the rat cerebral cortex and corpus striatum. Total tissue homogenate (H) and the cytosolic fraction (S2) were incubated at 37°C for 15 min in the absence (C, control samples) or presence of alkaline phosphatase (AP, 94–118 units). Samples containing the enzyme were also incubated with 100 mM sodium pyrophosphate (IC, inhibited controls). The amount of protein loaded on the gel was $40\ \mu\text{g}$ for all samples. Note that appropriate exposure times allowed the simultaneous visualization of the various forms of p-FADD, including the ≈ 20 – 23 kDa monomeric form (Ab II). (E, F) Effect of the sulfhydryl alkylating reagent dithiothreitol (DTT, 200 mM, 1 h) on the immunodensities of p-FADD species (Ab I and II) in the rat cerebral cortex. The experiments, including β -actin immunoblots, were repeated 3–5 times with similar results. The apparent molecular masses of p-FADD forms are reported according to blot calibration with standard molecular weight markers (kDa).

effects (Fig. 4A–C). These treatments did not modify the 37 kDa p-FADD species (Fig. 4A,B) or β -actin (Fig. 4D). At the subcellular level, sufentanil increased 116 kDa p-FADD in the cytosol ($13 \pm 12\%$, $n = 4$, $p > 0.05$), membranes ($239 \pm 49\%$, $n = 4$, $p < 0.01$) and nucleus ($136 \pm 35\%$, $n = 4$, $p < 0.05$) (Fig. 4E,F), and monomeric p-FADD in the nucleus ($88 \pm 22\%$, $n = 3$, $p < 0.05$) (Fig. 4F).

Acute morphine (100 mg/kg, 2 h) also stimulated FADD phosphorylation in the cortex (116 kDa: 51%; 23 kDa: $98 \pm 11\%$, $n = 3$, $p < 0.02$) (Fig. 5A–C). In contrast, chronic morphine did not result in upregulation of these p-FADD forms (Fig. 5A–C), indicating the induction of tachyphylaxis to the repeated treatment. In these rats, naloxone-precipitated withdrawal (2 h) was associated with increased p-FADD (116 kDa: 40% vs. control; 32% vs. chronic morphine) (Fig. 5A,B). Spontaneous opioid withdrawal (48 h) did

not induce significant increases of p-FADD forms (Fig. 5A–C). None of these treatments altered the content of 37 kDa p-FADD or that of β -actin (Fig. 5A,B).

The highest dose of morphine used (100 mg/kg) did not alter the pattern of nuclear PARP cleavage observed in the cortex of saline-treated rats (Fig. 5D), indicating that caspase-3 was not activated.

3.4. Effects of a δ -opioid receptor agonist on the contents of p-FADD and FADD in rat brain

SNC-80 (10 mg/kg, 30 min) increased p-FADD in the cerebral cortex (116 kDa: 37%; 23 kDa: $47 \pm 6\%$, $n = 4$, $p < 0.01$) (Fig. 6A, and Fig. 9B for the monomeric form), and this effect was blocked

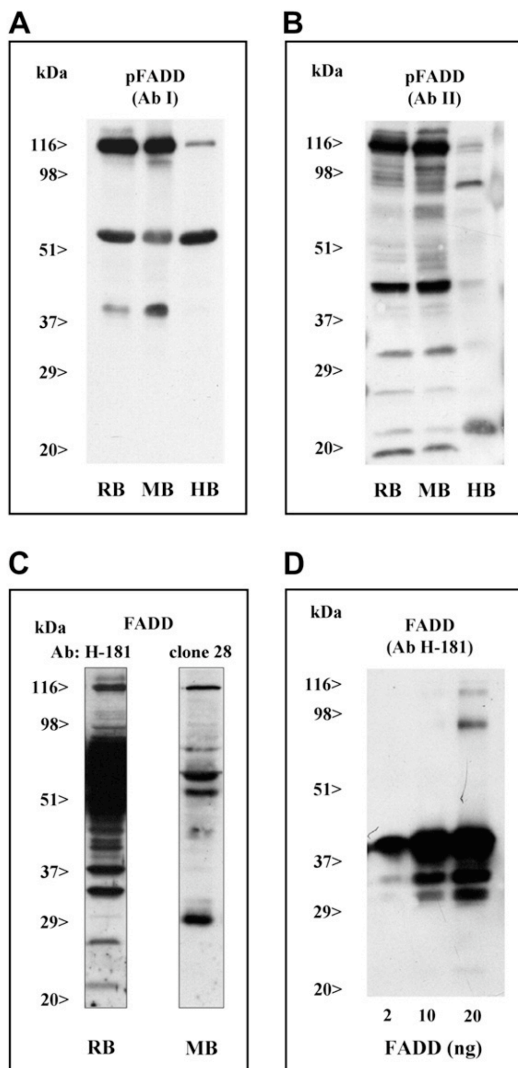


Fig. 2. (A,B) Representative immunoblots depicting labeling of p-FADD species in rat (RB), mouse (MB) and human (HB) cerebral cortex (Ab I and II). (C) Immunodetection of FADD with Ab H-181 and Ab clone 28 (total FADD protein regardless of phosphorylation state; see Table 1) in the rat (RB) and mouse (MB) cerebral cortex. Note that both antibodies revealed the presence of p-FADD species (e.g., ≈ 116 kDa band) after a prolonged exposure time (≈ 1 h). (D) Immunodetection of ≈ 37 – 40 kDa GST-tagged FADD protein (samples: 2–20 ng) with Ab H-181 (FADD) in the rat cerebral cortex.

by naltrindole (Fig. 6A). Treatment with a higher dose of SNC-80 (30 mg/kg) reduced FADD (30%) and augmented p-FADD (116 kDa: 45%; 23 kDa: $38 \pm 18\%$, $n = 4$, $p < 0.05$) (Fig. 6C–E). At the subcellular level, SNC-80 (10 mg/kg) increased 116 kDa p-FADD in the cytosol ($50 \pm 7\%$, $n = 3$, $p < 0.02$), membranes ($67 \pm 12\%$, $n = 3$, $p < 0.05$) and to a lesser extent in the nucleus ($13 \pm 5\%$, $n = 3$, $p > 0.05$), and monomeric p-FADD in the nucleus ($21 \pm 2\%$, $n = 3$, $p < 0.005$) (Fig. 6F).

The repeated treatment with SNC-80 (10 mg/kg; 5 days) also induced an increase of 116 kDa p-FADD (34%) in the cortex (Fig. 6B). The sustained chronic effect of SNC-80 was in contrast with the development of tachyphylaxis associated with chronic morphine treatment (Fig. 5). In chronic SNC-80-naltrindole withdrawn rats, the content of 116 kDa p-FADD (33%) was much like that quantified after the chronic treatment (Fig. 6B).

As reported for sufentanil and morphine, SNC-80 did not modify the content of 37 kDa p-FADD or that of β -actin (Fig. 6A,B; and data not shown).

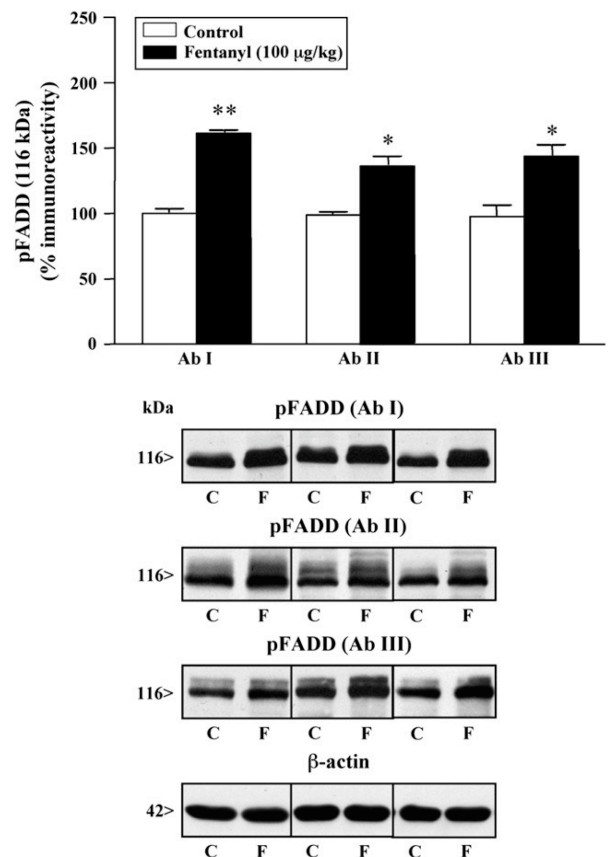


Fig. 3. Acute effect of fentanyl on p-FADD content (≈ 116 kDa species) quantified with Ab I, Ab II and Ab III (see Table 1) in the rat cerebral cortex (same brain samples). Groups of treatments: saline (C, $n = 6$), fentanyl (F, 100 μ g/kg, s.c., 15 min; $n = 6$). Columns are means \pm S.E.M. of n experiments per group with an animal per experiment, and expressed as percentage of saline-treated rats. * $p < 0.01$, ** $p < 0.001$ vs. control (Student's t -test). Bottom: representative immunoblots of p-FADD and β -actin for each set of experiments.

3.5. Effects of a κ -opioid receptor agonist on the contents of p-FADD and FADD in rat brain

Treatment with a high dose of (–)-U50488H (30 mg/kg, 1 h) decreased the content of FADD (39%), but it failed to stimulate FADD phosphorylation (oligomeric and monomeric forms) in the cerebral cortex (Fig. 7A,B). Furthermore, repeated treatment with (–)-U50488H (10 mg/kg; 5 days) and κ -antagonist-precipitated withdrawal were not associated with alterations p-FADD forms in brain (Fig. 7C).

Similarly to sufentanil, morphine and SNC-80, (–)-U50488H did not alter the content of 37 kDa p-FADD or that of β -actin (Fig. 7B,C).

3.6. Effects of opioid receptor agonists on the content of casein kinase α in rat brain

In rat, mouse and human cerebral cortices, CKI α was immunodetected as a doublet of $\approx 37/40$ kDa, sensitive to antigenic peptide competition (data not shown), which corresponded to CKI α and CKI α L isoforms (Fig. 8A) (see Zhang et al., 1996). CKI α was more abundantly expressed in the cytosol and nucleus (Fig. 8C).

The μ -agonist sufentanil (2.5–30 μ g/kg, 30 min) induced modest but sustained decreases in CKI α content in the cerebral cortex (18% at the highest dose, $p < 0.05$) (Fig. 8A). In sufentanil-treated rats (30 μ g/kg), the stimulation of cortical cytosolic CKI activity was reduced compared with that in controls (37%, $p < 0.001$) (Fig. 8B).

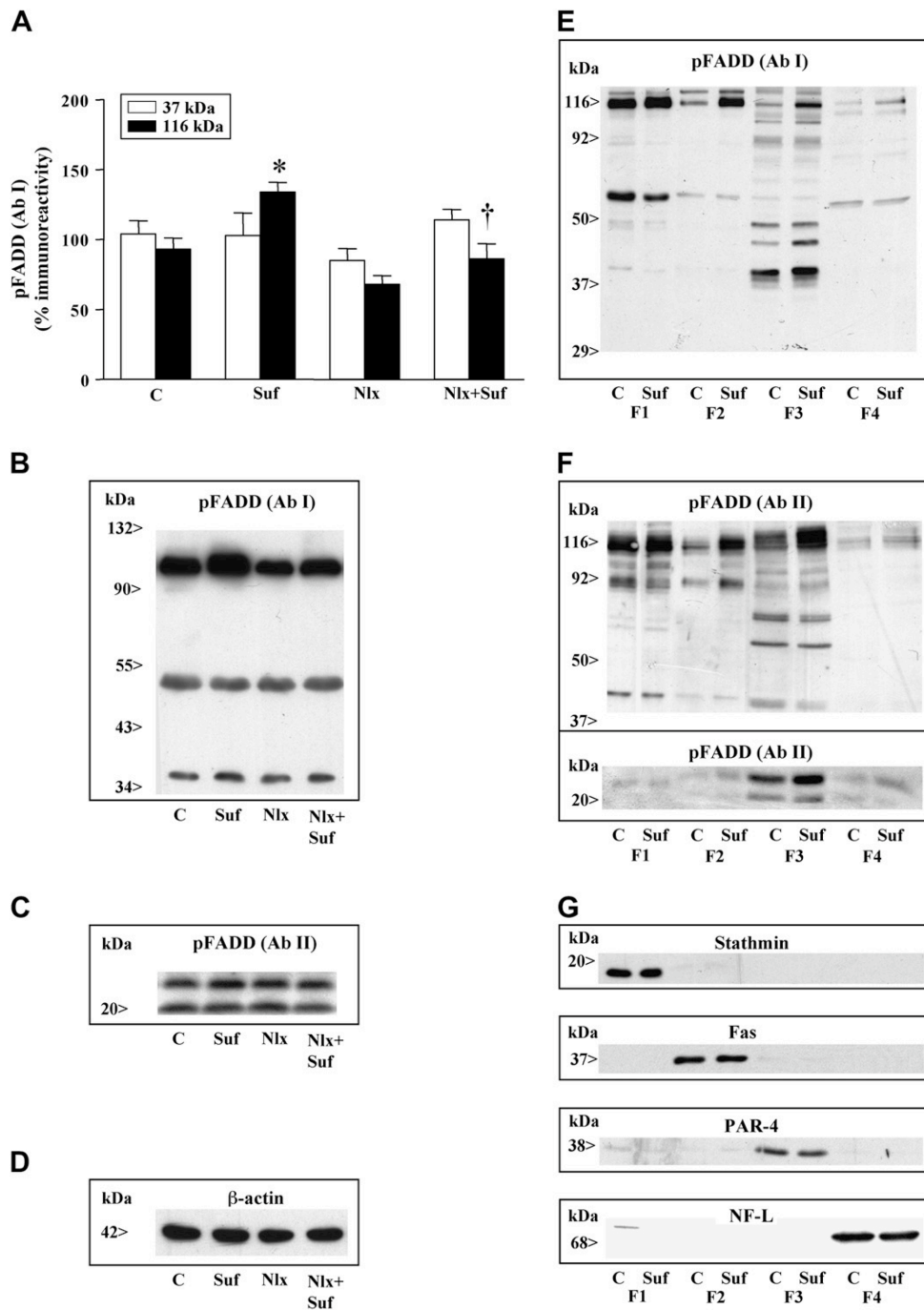
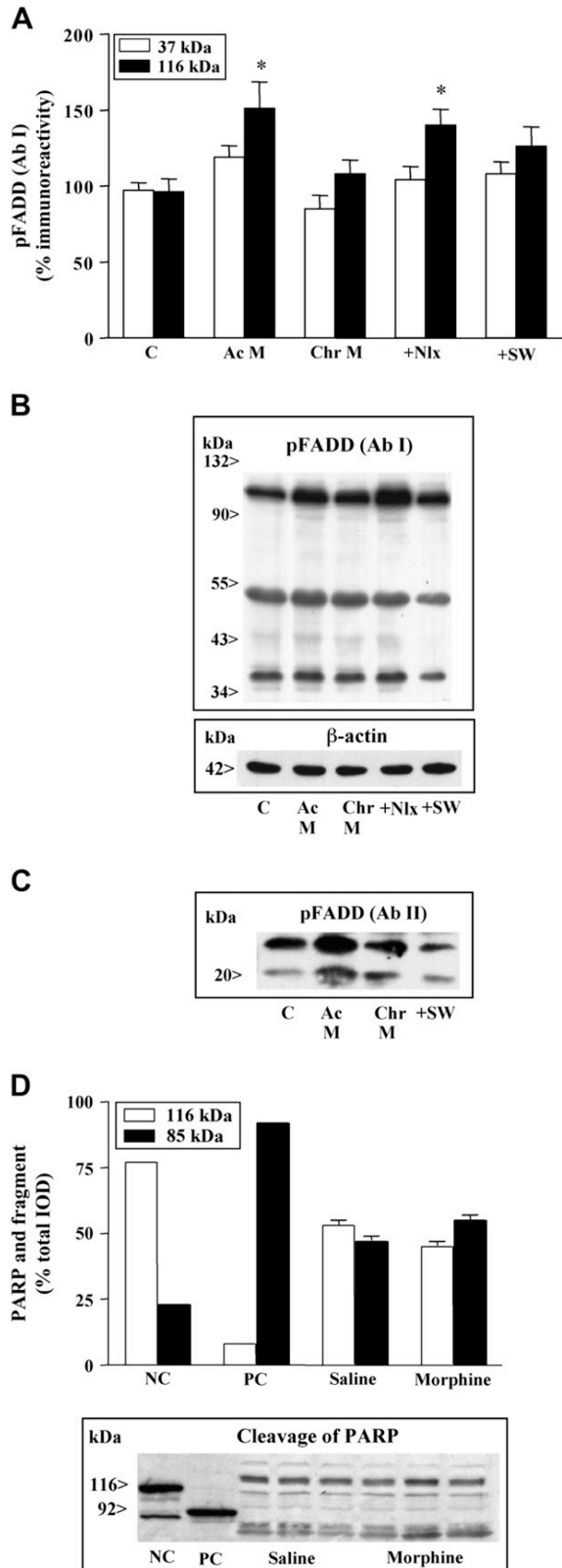


Fig. 4. (A–C) Acute effect of sufentanil on p-FADD content (Ab I) and antagonism by naloxone in rat cerebral cortex. (A) Groups of treatments: saline (C, $n = 6$), sufentanil (Suf, 15 $\mu\text{g}/\text{kg}$, s.c., 30 min; $n = 4$), naloxone (Nlx, 10 mg/kg, i.p., 60 min; $n = 4$) and Nlx + Suf ($n = 4$). Columns are means \pm S.E.M. of n experiments per group with an animal per experiment, and expressed as percentage of saline-treated rats. For ≈ 116 kDa p-FADD, but not the ≈ 37 kDa band, ANOVA detected a significant difference between the groups of treatments [$F(3,14) = 8.80$, $p = 0.0019$]. * $p < 0.05$ vs. control, and † $p < 0.05$ vs. sufentanil (ANOVA followed by Bonferroni’s test). (B–D) Representative immunoblots of p-FADD species and β -actin. (E, F) Representative immunoblots depicting the subcellular localization of p-FADD (E: Ab I; F: Ab II) in the cerebral cortex of control rats (C), and the acute effects of sufentanil (Suf, 15 $\mu\text{g}/\text{kg}$, s.c., 30 min) on p-FADD content in the various compartments (F1: cytosolic fraction; F2: membrane/organelle fraction; F3: nuclear fraction; F4: cytoskeletal fraction). (G) Immunoblots of selective subcellular markers: stathmin (F1), Fas receptor (F2), PAR-4 (F3) and NF-L (F4).

In contrast, the δ -agonist SNC-80 (10 mg/kg, 30 min) and the κ -agonist (–)-U50488H (10 and 30 mg/kg, 30 min) did not alter the content of CKI α (data not shown). Similarly, chronic (5 days) treatments with morphine (10–100 mg/kg), SNC-80 (10 mg/kg) and (–)-U50488H (10 mg/kg) did not result in significant modulations of CKI α in the cortex (data not shown). At the subcellular level,

sufentanil (15 $\mu\text{g}/\text{kg}$) reduced CKI α in the cytosol ($30 \pm 3\%$, $n = 3$, $p < 0.01$) with a concomitant increase in membranes ($43 \pm 11\%$, $n = 3$, $p < 0.05$) but not in nucleus ($9 \pm 11\%$, $n = 3$, $p > 0.05$) (Fig. 8C). A high dose of morphine (100 mg/kg) increased CKI α in the cytosol ($104 \pm 9\%$, $n = 3$, $p < 0.01$), membranes ($62 \pm 11\%$, $n = 3$, $p < 0.05$) and nucleus ($36 \pm 6\%$, $n = 3$, $p < 0.05$) (Fig. 8D).



SNC-80 (10 mg/kg) did not alter CKI α content in any subcellular compartment (Fig. 8E).

3.7. Effects of pertussis toxin on FADD basal contents and on δ -opioid receptor-induced changes in FADD and p-FADD in rat brain

PT was used as a tool to assess the involvement of inactivation of G $\alpha_{i/o}$ proteins in the in vivo modulation of FADD and p-FADD by SNC-80. Unexpectedly, PT (3 μ g, 24 h) markedly reduced the basal content of FADD (63%) and augmented that of p-FADD (116 kDa: 41%; 23 kDa: 45 \pm 6%, n = 4, p < 0.05) in the cerebral cortex (Fig. 9A,B). In the same brain samples, PT did not alter the expression of native, glycosylated and aggregated Fas receptor forms to which FADD is coupled (data not shown). PT decreased the amount of G α_{i2} proteins in the cortex (24%) (Fig. 9C).

As expected, SNC-80 (10 mg/kg) resulted in downregulation of FADD and upregulation of p-FADD forms in the cortex (Fig. 9A,B). In PT-pretreated rats, however, the effects of SNC-80 on FADD and p-FADD were not attenuated (Fig. 9A,B). None of these treatments (PT, SNC-80, PT + SNC) altered the content of 37 kDa p-FADD or that of β -actin in the cortex (Fig. 9A,B).

3.8. Effects of MEK inhibition on δ -opioid receptor-induced changes in p-FADD in rat brain

Brain MEK1/2 inhibition with SL327 was shown to prevent the downregulation of FADD induced by SNC-80, demonstrating the involvement of ERK1/2 activation in this regulation (García-Fuster et al., 2007a). Therefore, the influence of MEK-ERK signaling in the regulation of p-FADD by SNC-80 was investigated. MEK1/2 inhibition with SL327 (10, 20 and 30 mg/kg, 90 min) did not alter the basal contents of FADD, p-FADD (except a marginal increase with the highest dose) and CKI α in the cerebral cortex (Fig. 10A,B) or corpus striatum (data not shown).

As expected, SNC-80 (10 mg/kg) induced upregulation of oligomeric and monomeric p-FADD in the cortex (Fig. 10A,B). Pretreatment with SL327 (20 mg/kg), however, did not prevent the increases of p-FADD forms induced by SNC-80, but instead the effects were slightly potentiated (Fig. 10A,B). Similar results were obtained in the striatum (data not shown). None of these treatments (SL327, SNC-80, SL + SNC) altered the content of 37 kDa p-FADD or that of β -actin in the cortex (Fig. 10A,C).

4. Discussion

4.1. Immunodetection and subcellular localization of phosphorylated FADD in brain

Monomeric and oligomeric (\approx 116 kDa) p-FADD forms were immunodetected in rat, mouse and human brain tissue irrespective of the antibody origin, anti-mouse or anti-human, and the specific Ser191 or Ser194 phosphorylation site that lies outside the FADD apoptotic region. To our knowledge the equivalent p-Ser on rat

Fig. 5. (A) Acute, chronic, and withdrawal effects of morphine on p-FADD content (Ab I) in the rat cerebral cortex. Groups of treatments: saline (C, n = 9), acute morphine (Ac M, 100 mg/kg, i.p., 2 h; n = 5), and chronic morphine (Chr M, 10–100 mg/kg for 5 days; n = 9) followed by naloxone (+Nlx, 2 mg/kg; n = 6)-precipitated (2 h) or spontaneous (+SW, 48 h; n = 4) opioid withdrawal. Columns are means \pm S.E.M. of n experiments per group with an animal per experiment, and expressed as percentage of saline-treated rats. For \approx 116 kDa p-FADD, but not the \approx 37 kDa band, ANOVA detected a significant difference between the groups of treatments [$F(4,28)$ = 4.10, p = 0.0094], *p < 0.05 vs. control (ANOVA followed by Bonferroni's test). (B, C) Representative immunoblots of p-FADD species and β -actin. (D) Acute effects of saline and morphine (100 mg/kg, 2 h; n = 3) on PARP cleavage in the rat cerebral cortex. NC: negative control (whole cell extract of human HL60 leukemia cells). PC: positive control (etoposide-induced apoptosis in HL60 cells).

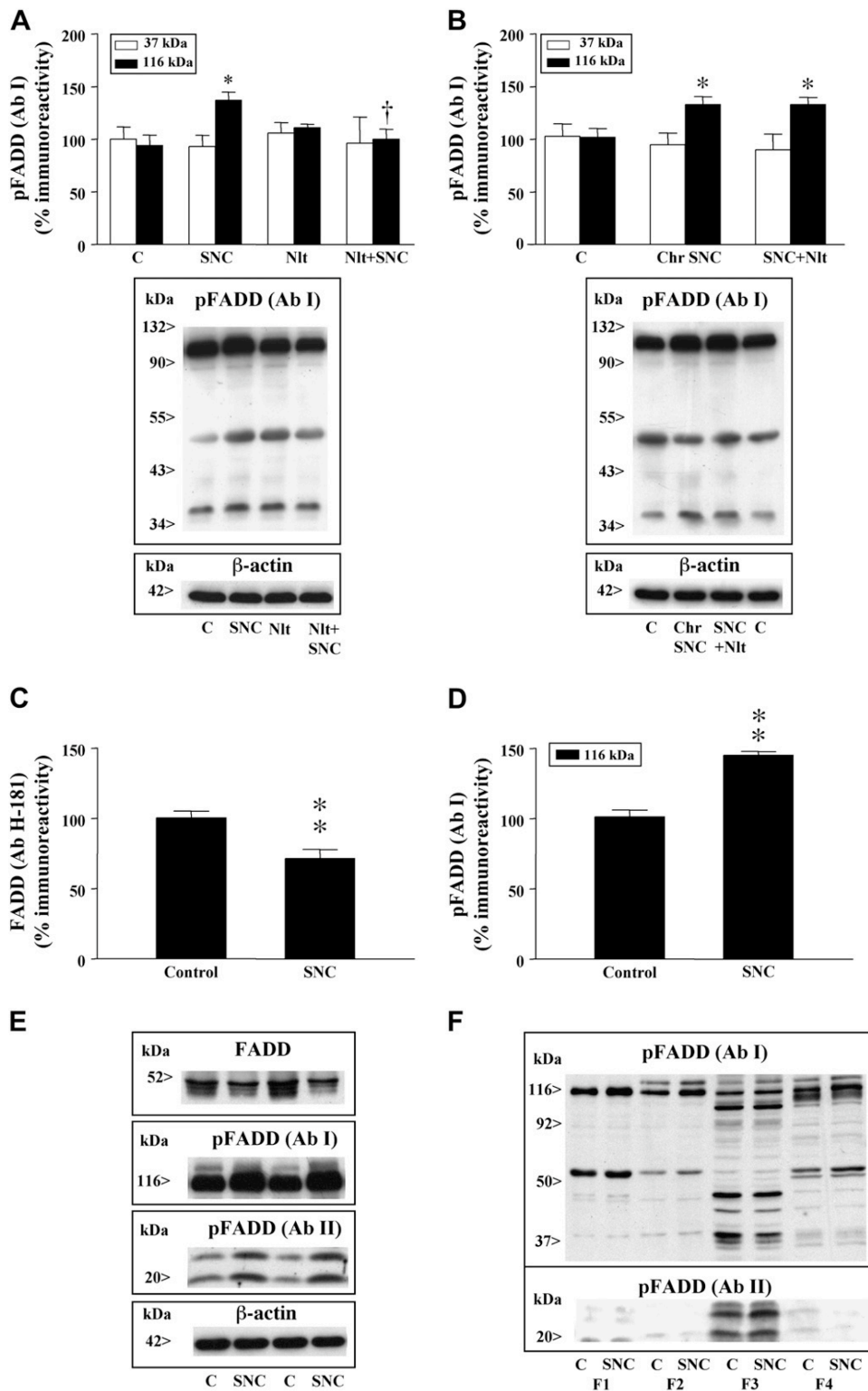


Fig. 6. Acute, chronic and withdrawal effects of SNC-80 on p-FADD content (Ab I) in the rat cerebral cortex. (A) Antagonism by naltrindole. Groups of treatments: vehicle (C, $n = 5$), SNC-80 (SNC, 10 mg/kg, i.p., 30 min; $n = 6$), naltrindole (Nlt, 5 mg/kg, 60 min; $n = 3$) and Nlt + SNC ($n = 5$). Columns are means \pm S.E.M. of n experiments per group with an animal per experiment, and expressed as percentage of saline-treated rats. For ≈ 116 kDa p-FADD, but not the ≈ 37 kDa band, ANOVA detected a significant difference between the groups of treatments [$F(3,15) = 5.30, p = 0.010$]; * $p < 0.05$ vs. control; † $p < 0.05$ vs. SNC-80 (ANOVA followed by Bonferroni's test). (B) Chronic effects of vehicle (C, $n = 8$) and SNC-80 (Chr, SNC 10 mg/kg for 5 days; $n = 4$) followed by naltrindole (SNC + Nlt, 5 mg/kg)-precipitated (2 h) opioid withdrawal ($n = 5$). Other details as above. ANOVA, [$F(2,14) = 5.40, p = 0.017$]; * $p < 0.05$ vs. control. (C, D) Opposite acute effects of SNC-80 (30 mg/kg, 30 min; $n = 7$) on FADD (C, Ab H-181) and p-FADD (D, Ab I) in the rat cerebral cortex (C, control, $n = 6$). ** $p < 0.005$ vs. the corresponding control (Student's t -test). (E) Representative immunoblots of FADD, p-FADD species (Ab I and Ab II) and β -actin. (F) Representative immunoblots for the effect of SNC (10 mg/kg, 30 min) on the subcellular content of p-FADD (Ab I and Ab II) in the rat cerebral cortex (F1: cytosol; F2: membrane; F3: nucleus; F4: cytoskeleton). The corresponding immunoblots of selective subcellular markers are shown in Fig. 8E.

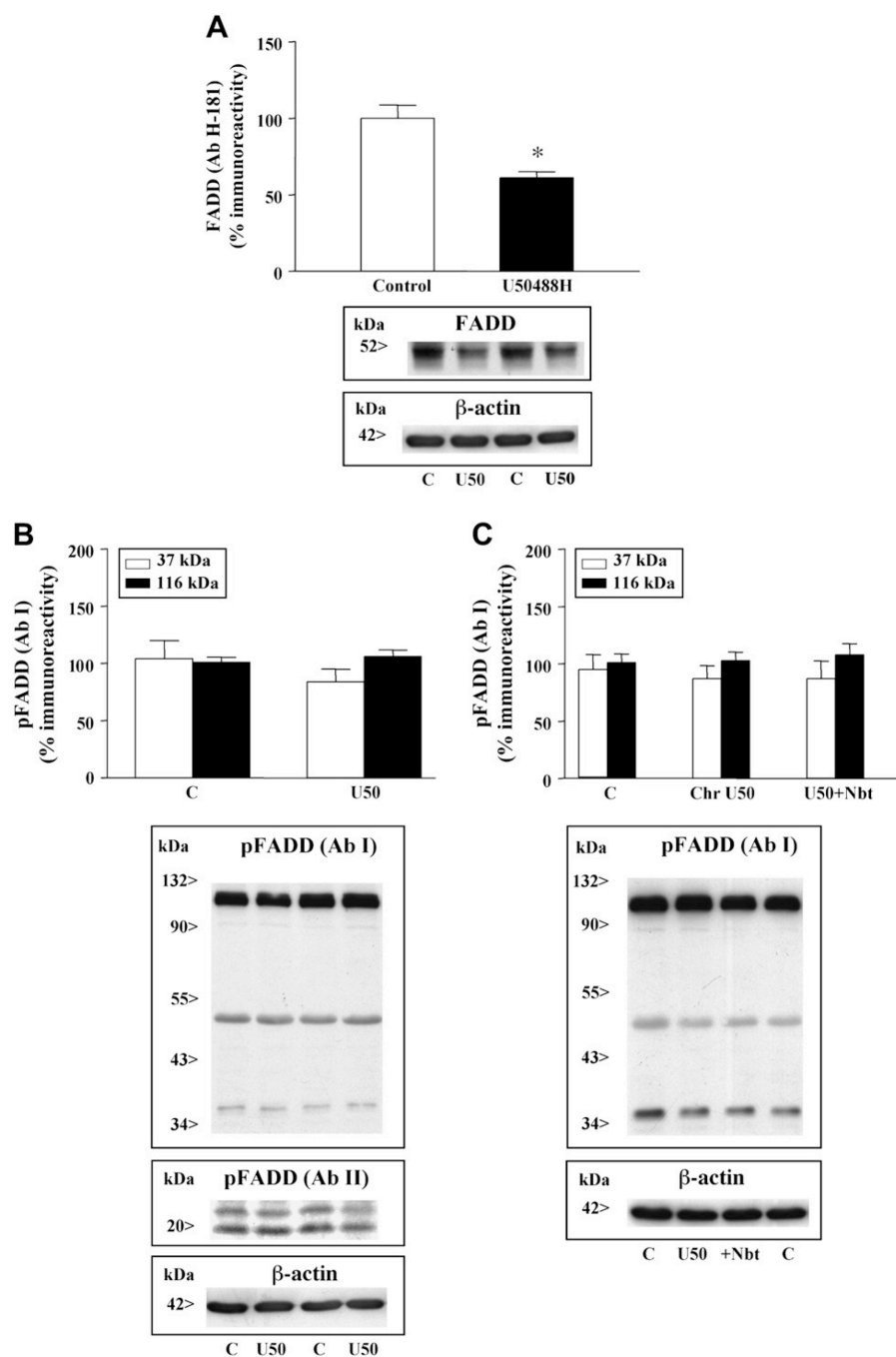


Fig. 7. Acute effects of (–)-U50488H on FADD (A, Ab H-181) and p-FADD (B, Ab I) contents in the rat cerebral cortex. Groups of treatments: saline (C, $n = 5$) and (–)-U50488H (U50, 30 mg/kg, i.p., 60 min, $n = 6$). Columns are means \pm S.E.M. of n experiments per group with an animal per experiment, and expressed as percentage of saline-treated rats. * $p < 0.005$ vs. the corresponding control (Student's t -test). (C) Chronic effects of saline (C, $n = 5$) and (–)-U50488H (Chr U50, 10 mg/kg for 5 days, $n = 5$) followed by nor-binaltorphimine (U50 + Nbt, 5 mg/kg)-precipitated (2 h) opioid withdrawal ($n = 5$) on p-FADD (Ab I) in the rat cerebral cortex. Other details as above. ANOVA did not detect significant differences between the groups of treatments for p-FADD forms [$F(2,12) = 0.08$ – 0.20 , $p = 0.90$]. Bottom (A–C): representative immunoblots of FADD, p-FADD species (Ab I and Ab II) and β -actin.

FADD has not been mapped yet. However, there exists a good homology between rat and mouse FADD (87% sequence identity, 92% amino acid similarity) as well as rat and human FADD (68% identity, 82% similarity) (Zhang et al., 2004). This fact strongly suggests that one of the adjacent Ser194-Ser195 on rat FADD (Zhang et al., 2004) could be the specific phosphorylation site that, being recognized by the antibodies used, would mediate the anti-apoptotic function in this species. In a previous study, FADD (Ab

H-181) was recognized as a homo-dimer/trimer in the mammalian brain (García-Fuster et al., 2007a). In the current study, ≈ 116 kDa oligomeric FADD was also identified, after prolonged film time exposures, in rat and mouse brain tissue with two antibodies recognizing total FADD protein (Ab H-181; Ab clone 28) regardless of its phosphorylation state. These data indicated that the adaptor FADD has the capacity to be oligomeric in brain, being expressed as self-associated high-order structures. It has been demonstrated

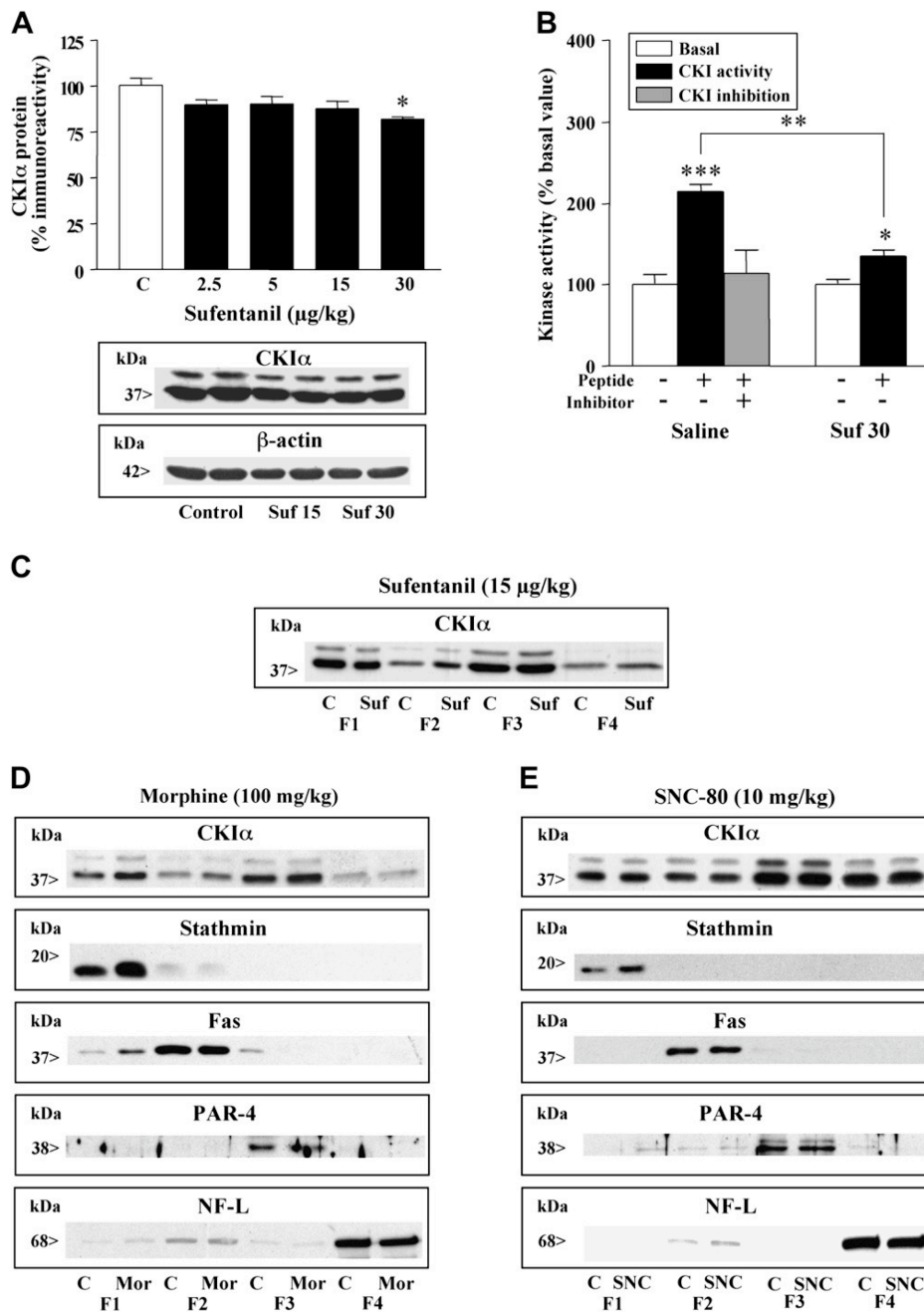


Fig. 8. (A) Dose-response for the acute effect of sufentanil on casein kinase I α (CKI α) protein content in the rat cerebral cortex. Groups of treatments: saline (C, $n = 6$) and sufentanil (Suf, 2.5–30 $\mu\text{g}/\text{kg}$, s.c., 30 min, $n = 4$ for each group). Columns are means \pm S.E.M. of n experiments per group with an animal per experiment, and expressed as percentage of saline-treated rats. ANOVA detected a significant difference between the groups of treatments [$F(4,17) = 3.30$, $p = 0.037$]. * $p < 0.05$ vs. control (ANOVA followed by Bonferroni's test). A post-test for linear trend with increasing sufentanil doses was also significant ($p = 0.007$). Bottom: representative immunoblots of CKI α and β -actin (C, Suf 15 and suf 30 in duplicate). (B) Cortical cytosolic CKI activity in saline- and sufentanil (Suf, 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$)-treated rats. Columns are means \pm S.E.M. of three experiments (two concentrations of protein in duplicate), and expressed as percentage of the corresponding basal kinase activity (saline: 99 ± 12 cpm/ μg protein; Suf: 192 ± 13 cpm/ μg protein). Basal kinase activity for Suf reflects the activity of multiple kinases. CKI activity: specific peptide substrate phosphorylation. CKI inhibition: CKI activity in the presence of CKI inhibitor D4476. For other details see Section 2. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. corresponding basal value or when compared saline vs. sufentanil on CKI activity (Student's t -test). (C–E) Representative immunoblots for the effects of sufentanil (15 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 30 min), morphine (100 mg/kg, 2 h) and SNC-80 (10 mg/kg, 30 min) on the subcellular content of CKI α protein in the rat cerebral cortex (F1: cytosol; F2: membrane; F3: nucleus; F4: cytoskeleton), with the corresponding blots of selective subcellular markers, except for sufentanil which are shown in Fig. 4G.

that FADD self-association, possibly dimers of receptor trimers, is functionally important for Fas signaling (Carrington et al., 2006; Muppidi et al., 2006; Sandu et al., 2006).

Since FADD couples Fas with initiator caspases in association with the plasma membrane, it was assumed that the adaptor was a cytoplasmic protein. Cell studies have shown that FADD or p-

FADD is exclusively localized in the cytoplasm (O'Reilly et al., 2004), in cytoplasm and nucleus (Gómez-Angelats and Cidlowski, 2003; Alappat et al., 2005; Lee et al., 2006; Yoo et al., 2007) or solely within the nucleus (Screaton et al., 2003; Bhojani et al., 2005; Osborn et al., 2007), including that of neurons (Takagi et al., 2007). In rat brain, FADD was mainly localized in cytosol and nucleus

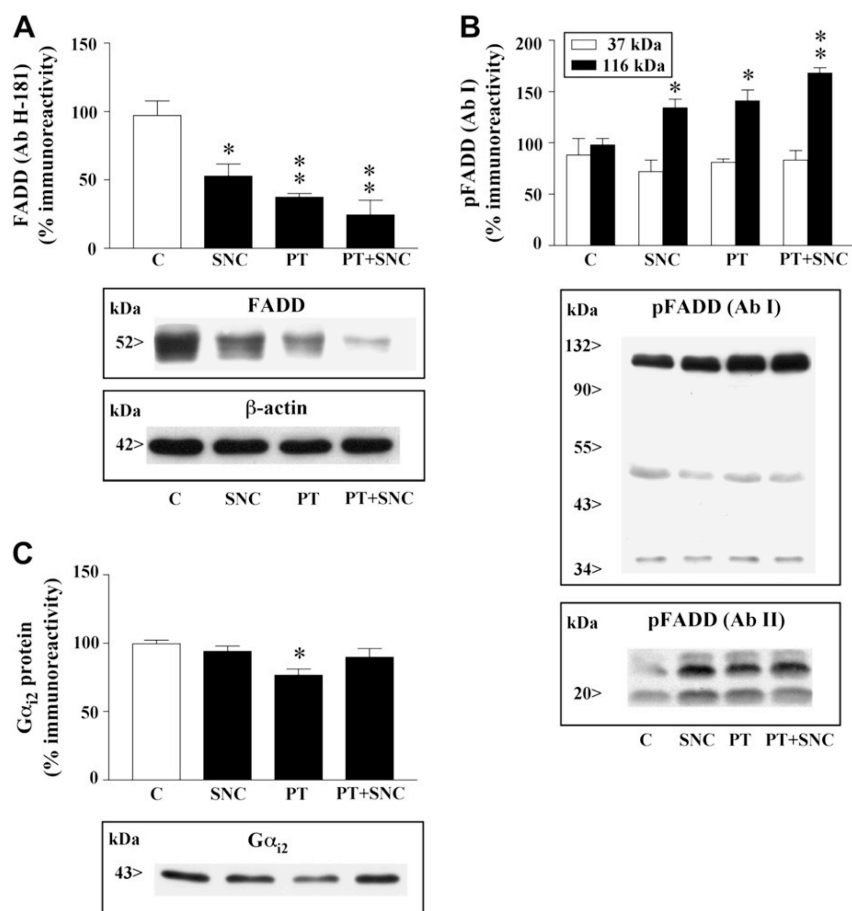


Fig. 9. (A, B) Effects of pertussis toxin (PT) on the contents of FADD (Ab H-181) and p-FADD (Ab I and Ab II), and lack of effects of the toxin on the downregulation of FADD and the upregulation of p-FADD induced by SNC-80 in the rat cerebral cortex. Groups of treatments: vehicle (C, $n = 5$), SNC-80 (SNC, 10 mg/kg, i.p., 30 min; $n = 5$), PT (3 μ g, i.c.v., 24 h; $n = 5$) and PT + SNC ($n = 4$). Columns are means \pm S.E.M. of n experiments per group with an animal per experiment, and expressed as percentage of vehicle-treated rats. ANOVA detected significant differences between the groups of treatments for FADD [$F(3,15) = 15.1, p = 0.0001$] and 116 kDa p-FADD [$F(3,15) = 11.2, p = 0.004$], but not for the 37 kDa p-FADD band. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.001$ when compared with the corresponding vehicle group (ANOVA followed by Bonferroni's test). (C) Effects of SNC-80 and PT (alone or in combination with the opioid) on $G\alpha_{12}$ immunodensity in the rat cerebral cortex. Groups of treatments as above. ANOVA [$F(3,15) = 4.59, p = 0.012$]. * $p < 0.05$ when compared with the control group. Bottom (A–C): representative immunoblots of FADD, p-FADD species, $G\alpha_{12}$ proteins and β -actin.

(García-Fuster et al., 2007a). In the present study, oligomeric p-FADD followed a similar pattern and the monomeric p-form was detected in the nucleus, a localization associated with its non-apoptotic action (Screaton et al., 2003; Alappat et al., 2005; Werner et al., 2006).

4.2. μ/δ -Opioid receptor agonists enhance the phosphorylation state of FADD in brain

Acute treatments with the μ -agonists fentanyl, sufentanil and morphine and the δ -agonist SNC-80 stimulated, through specific receptor mechanisms, the phosphorylation of oligomeric and monomeric FADD in cortical homogenates and, depending of the opioid, in the cytosolic, membrane and nuclear compartments. The induction of p-FADD vanished with repeated morphine, but not SNC-80, and opioid withdrawal induced a new (morphine) or sustained (SNC-80) stimulatory effect. In contrast, the κ -agonist (–)-U50488H failed to increase p-FADD in the cortex. These opioid treatments did not modulate the content of a 37 kDa p-FADD form, most probably a proteolytic product of oligomeric p-FADD.

Sufentanil, morphine and SNC-80 (acute, chronic and/or withdrawal effects) increased the content of oligomeric p-FADD (116 kDa; Ab I) with a concomitant decrease of FADD (Ab H-181) in

the same cortical samples ($r = -0.42; n = 30; p = 0.018$; present data and García-Fuster et al., 2007a). This inverse relationship suggests that these opioids induced an increase in the ratio of p-FADD to FADD in rat brain. However, the κ -agonist (–)-U50488H failed to show a similar tendency (present data and García-Fuster et al., 2007a). The observed changes in the immunoreactivity of p-FADD and total FADD are likely to be due to changes in the phosphorylation status of the protein induced by the opioids or eventually to other changes of unknown nature. Recent in vitro studies with cancer cells have also reported the induction of p-FADD by paclitaxel, and that the balance between p-FADD and FADD can affect cell survival (Shimada et al., 2004, 2005). The current results support the concept of an interconversion between non-phosphorylated FADD and p-FADD after opioid treatment. In fact, FADD dephosphorylation resulted in an increased immunoreactivity of the non-phosphorylated form using Ab H-181 (García-Fuster et al., 2007a).

Sufentanil reduced total FADD in the cytosolic and nuclear compartments (García-Fuster et al., 2007a). In the present study, sufentanil markedly increased oligomeric p-FADD in membrane and nucleus, as well as nuclear monomeric p-FADD, suggesting a translocation of these p-forms to the nuclear compartment. FADD phosphorylation does not play a role in Fas signaling leading to

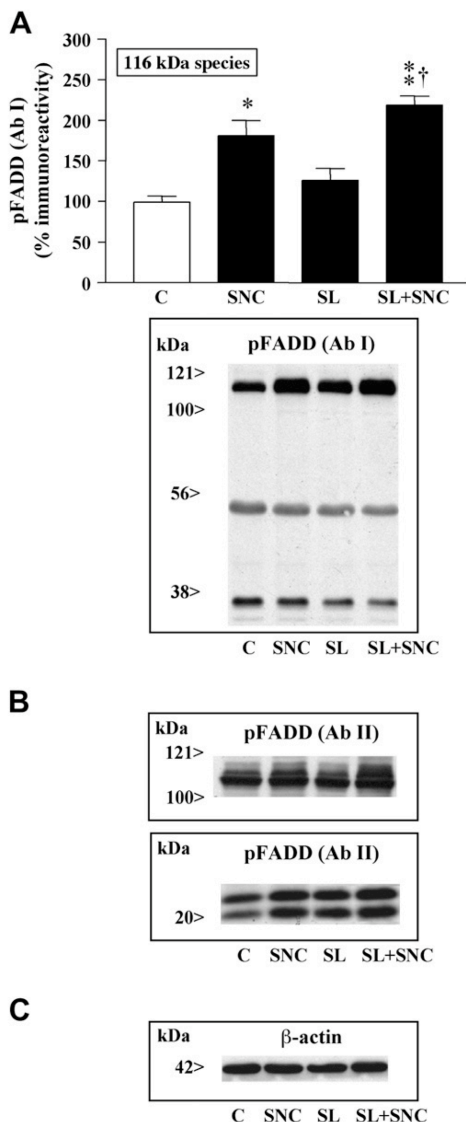


Fig. 10. (A) Effects of SL 327 (a selective MEK1/2 inhibitor) on the upregulation of 116 kDa p-FADD (Ab I and Ab II) content induced by SNC-80 in the rat cerebral cortex. Groups of treatments: vehicle (C, $n = 5$), SNC-80 (SNC, 10 mg/kg, i.p., 30 min; $n = 5$), SL 327 (SL, 20 mg/kg, i.p., 90 min; $n = 7$) and SL + SNC ($n = 5$). Columns are means \pm S.E.M. of n experiments per group with an animal per experiment, and expressed as percentage of vehicle-treated rats. ANOVA detected a significant difference between the groups of treatments [$F(3,18) = 14.0$, $p < 0.001$]. * $p < 0.01$; ** $p < 0.001$ when compared with the vehicle group; † $p < 0.001$ when compared with the SL 327 group (ANOVA followed by Bonferroni's test). Bottom (A–C): representative immunoblots of p-FADD (Ab I and Ab II) and β -actin.

apoptosis (Scaffidi et al., 2000), but it can regulate several non-apoptotic activities (Zhang et al., 2004; Alappat et al., 2005). In fact, a high dose of morphine that markedly increased p-FADD did not induce apoptosis, at least through the activation of caspase-3 and the subsequent PARP cleavage in rat cortex. This result was in line with previous negative findings dealing with the cleavage of procaspases-8/3 by various opioids and treatments (García-Fuster et al., 2007a). It has been suggested that the nuclear localization of p-FADD may be a regulatory mechanism where FADD is sequestered to abrogate Fas apoptotic signaling (Screaton et al., 2003; Bhojani et al., 2005). In contrast to sufentanil, SNC-80 did not increase nuclear p-FADD although the δ -opioid receptor could induce anti-apoptotic actions through its inhibitory endogenous tone on Fas/FADD complex (García-Fuster et al., 2007b).

These findings strongly suggest that the upregulation of p-FADD induced by μ - and especially δ -agonists might contribute to their anti-apoptotic (Tsao and Su, 2001; Narita et al., 2006) and neuroprotective effects (Zhang et al., 2002; Ma et al., 2005; Narita et al., 2006) (see Tegeder and Geisslinger, 2004; Barry and Zuo, 2005). Emerging evidence also suggests that apoptotic proteins can regulate brain synaptic plasticity (Gilman and Mattson, 2002). In this context, morphine-induced locomotor sensitization was associated with an increased p-FADD/FADD ratio in the rat corpus striatum and cerebral cortex (Ramos-Miguel et al., 2007), which supports the functional significance to the present findings.

4.3. Molecular interactions between opioid receptor signaling and FADD in brain

Because opioid receptors do not directly interact with FADD, various molecular mechanisms were explored in an attempt to clarify the positive signaling of opioids on FADD phosphorylation. CKI α is the main enzyme that phosphorylates specific Ser residues on FADD, and this interaction regulates FADD nuclear localization and non-apoptotic activities (Alappat et al., 2005). Therefore, the modulation of CKI α by opioids was investigated in rat cortex. The key results indicated that sufentanil induced a translocation of CKI α from the cytosol (protein and activity decreased) to the membrane (protein increased), and that morphine upregulated the content of this kinase in the cytosolic, membrane and nuclear compartments. In contrast, SNC-80, which also increased p-FADD in cytosol/membrane, did not alter CKI α content in any cellular compartment. Although CKI α could mediate the acute phosphorylation of FADD induced by μ -agonists, another kinase distinct from CKI (Scaffidi et al., 2000; Hua et al., 2003; Osborn et al., 2007) may be responsible for the observed effects of the δ -agonist SNC-80.

Opioid receptors transduce their signals via $G_{i/o}$ proteins (Law et al., 2000). SNC-80 was shown to stimulate ERK1/2 activation in vitro through a PT-sensitive mechanism (Audet et al., 2005). The inhibitory effect of SNC-80 on brain FADD was mediated through a mechanism fully dependent on ERK1/2 activation (García-Fuster et al., 2007a), which in turn is crucial in protecting against Fas/FADD-mediated apoptosis (Holmström et al., 1999, 2000). In the present study, the MEK inhibitor SL327 did not prevent the upregulation of p-FADD induced by SNC-80, indicating that ERK1/2 signaling is not required for this modulation. As mentioned, other kinases are responsible for the exclusive phosphorylation of FADD. On the other hand, it was anticipated that PT would block the opposite effects of SNC-80 on FADD and p-FADD in brain. Surprisingly, PT by itself markedly altered the basal levels of FADD (downregulation) and p-FADD (upregulation), precluding the net effects of its interaction with the δ -agonist which, contrary to the expectations, were not attenuated. To note that FADD does not contain any specific amino acid sequence with the cysteine residue that is required for ADP-ribosylation by PT (for G-proteins, see Fields and Casey, 1997). This finding revealed that brain FADD is a novel target of PT, whose mechanism of action remains uncertain. Interestingly, PT, presumably by blocking $G_{\alpha_{i2}}$ signaling, was shown to impair neuroepithelial cell proliferation in the embryonic mouse brain, without altering cell death in the cortex (Shinohara et al., 2004), a finding that could be related, in part, to the toxin effects on FADD. Similarly, PT was reported to block etorphine-induced apoptosis in SK-N-SH cells (Yin et al., 1997), which could also be explained by the marked decrease in FADD induced by the toxin. It is worth noting that the opposite modulation of p-FADD and FADD induced by PT was similar to that reported for opioid drugs, which may indicate that a variety of agents shared common mechanisms for FADD regulation.

Acknowledgements

This study was supported by grant SAF2008-01311 (Programa Nacional de Biomedicina, MICINN and FEDER, Madrid, Spain). The research was also funded by Red Temática de Investigación Cooperativa en Salud (RETICS, Instituto de Salud Carlos III, MSC, Madrid; Red de Trastornos Adictivos, Grupo RD06/001/003), and by Delegación del Gobierno para el Plan Nacional sobre Drogas (Project 2007/I032, MSC, Madrid). A.R.-M. was supported by a predoctoral FPI fellowship (MEC, Madrid). We thank Dr. Federico Mayor Jr. and Dr. Catalina Ribas (Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa”, CSIC-UAM, Madrid) for help with the CK1 α activity assays. We also thank Mr. Andrés Davison for technical assistance. J.A.G.-S. is a member of the Institut d'Estudis Catalans (Barcelona, Catalonia, Spain).

References

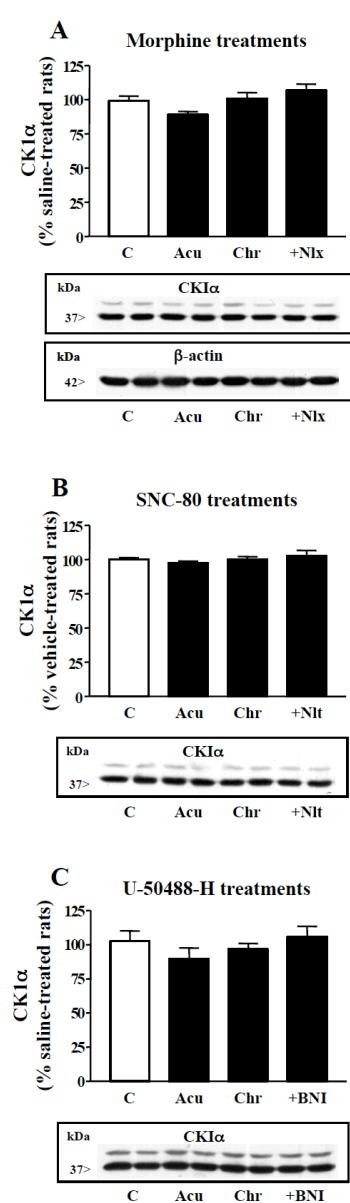
- Abdolzade-Bavil, A., Hayes, S., Goretzki, L., Kröger, M., Anders, J., Hendriks, R., 2004. Convenient and versatile subcellular extraction procedure, that facilitates classical protein expression profiling and functional protein analysis. *Proteomics* 4, 1397–1405.
- Alappat, E., Feig, C., Boyerinas, B., Volkland, J., Samuels, M., Murmann, A.E., Thorburn, A., Kidd, V.J., Slaughter, C.A., Osborn, S.L., Winoto, A., Tang, W.J., Peter, M.E., 2005. Phosphorylation of FADD at serine 194 by CK1 α regulates its nonapoptotic activities. *Molecular Cell* 19, 321–332.
- Algeciras-Schimmich, A., Shen, L., Barnhart, B.C., Murmann, A.E., Burkhardt, J.K., Peter, M.E., 2002. Molecular ordering of the initial signaling events of CD95. *Molecular Cell Biology* 22, 207–220.
- Ammon, S., Mayer, P., Riechert, U., Tischmeyer, H., Höllt, V., 2003. Microarray analysis of genes expressed in the frontal cortex of rats chronically treated with morphine and after naloxone precipitated withdrawal. *Molecular Brain Research* 112, 113–125.
- Audet, N., Paquin-Gobeil, M., Landry-Paquet, O., Schiller, P.W., Piñeyro, G., 2005. Internalization and Src activity regulate the time course of ERK activation by delta opioid receptor ligands. *Journal of Biological Chemistry* 280, 7808–7816.
- Barry, U., Zuo, Z., 2005. Opioids: Old drugs for potential new applications. *Current Pharmaceutical Design* 11, 1343–1350.
- Bhojani, M.S., Chen, G., Ross, B., Beer, D.G., Rehemtulla, A., 2005. Nuclear localized phosphorylated FADD induces cell proliferation and is associated with aggressive lung cancer. *Cell Cycle* 4, 1478–1481.
- Boronat, M.A., García-Fuster, M.J., García-Sevilla, J.A., 2001. Chronic morphine induces up-regulation of the pro-apoptotic Fas receptor and down-regulation of the anti-apoptotic Bcl-2 oncoprotein in rat brain. *British Journal of Pharmacology* 134, 1263–1270.
- Brandt, M.R., Furness, M.S., Rice, K.C., Fischer, B.D., Negus, S., 2001. Studies of tolerance and dependence with the δ -opioid agonist SNC80 in rhesus monkeys responding under a schedule of food presentation. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 299, 629–637.
- Carrington, P.E., Sandu, C., Wei, Y., Hill, J.M., Morisawa, G., Huang, T., Gavathiotis, E., Wei, Y., Werner, M.H., 2006. The structure of FADD and its mode of interaction with procaspase-8. *Molecular Cell* 22, 599–610.
- Chinnaiyan, A.M., O'Rourke, K., Tewari, M., Dixit, V.M., 1995. FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. *Cell* 81, 505–512.
- Clark, M.J., Traynor, J.R., 2006. Mediation of adenylyl cyclase sensitization by PTX-insensitive G α phaoA, G α phai1 or G α phai3. *Journal of Neurochemistry* 99, 1494–1504.
- Desbarats, J., Birge, R.B., Minouni-Rongy, M., Weistein, D.E., Palerme, J.S., Newell, M.K., 2003. Fas engagement induces neurite growth through ERK activation and p35 upregulation. *Nature Cell Biology* 5, 118–125.
- Di Paolo, G., Lutjens, R., Osen-Sand, A., Sobel, A., Catsicas, S., Grenningloh, G., 1997. Differential distribution of stathmin and SCG10 in developing neurons in culture. *Journal of Neuroscience Research* 50, 1000–1009.
- Feig, C., Tchikov, V., Schütze, S., Peter, M.E., 2007. Palmitoylation of CD95 facilitates formation of SDS-stable receptor aggregates that initiate apoptosis signaling. *EMBO Journal* 26, 221–231.
- Fields, T.A., Casey, P.J., 1997. Signalling functions and biochemical properties of pertussis toxin-resistant G-proteins. *Biochemical Journal* 321, 561–571.
- García-Fuster, M.J., Ferrer-Alcón, M., Miralles, A., García-Sevilla, J.A., 2003. Modulation of Fas receptor proteins and dynamin during opiate addiction and induction of opiate withdrawal in rat brain. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 368, 421–431.
- García-Fuster, M.J., Ferrer-Alcón, M., Miralles, A., García-Sevilla, J.A., 2004. Deglycosylation of Fas receptor and chronic morphine treatment up-regulate high molecular mass Fas aggregates in the rat brain. *European Journal of Pharmacology* 496, 63–69.
- García-Fuster, M.J., Miralles, A., García-Sevilla, J.A., 2007a. Effects of opiate drugs on Fas-associated protein with death domain (FADD) and effector caspases in the rat brain: Regulation by the ERK1/2 MAP kinase pathway. *Neuropharmacology* 55, 399–411.
- García-Fuster, M.J., Ferrer-Alcón, M., Martín, M., Kieffer, B.L., Maldonado, R., García-Sevilla, J.A., 2007b. Effects of constitutive deletion of opioid receptors on the basal densities of Fas and Fas-associated protein with death domain (FADD) in the mouse brain: A δ -opioid tone inhibits FADD. *European Neuropharmacology* 17, 366–374.
- García-Sevilla, J.A., Ahtee, L., Magnusson, T., Carlsson, A., 1978. Opiate-receptor mediated changes in monoamine synthesis in rat brain. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 30, 613–621.
- Garnett, T.O., Filippova, M., Duerksen-Hughes, P.J., 2006. Accelerated degradation of FADD and procaspase 8 in cells expressing human papilloma virus 16 E6 impairs TRAIL-mediated apoptosis. *Cell Death and Differentiation* 13, 1915–1926.
- Gilman, C.P., Mattson, M.P., 2002. Do apoptotic mechanisms regulate synaptic plasticity and growth-cone motility? *Neuromolecular Medicine* 2, 197–214.
- Gómez-Angelats, M., Cidlowski, J.A., 2003. Molecular evidence for the nuclear localization of FADD. *Cell Death and Differentiation* 10, 791–797.
- Harlow, E., Lane, D., 1999. *Using Antibodies: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Holmström, T.H., Tran, S.E.F., Johnson, V.L., Ahn, N.G., Chow, S.C., Eriksson, J.E., 1999. Inhibition of mitogen-activated kinase signaling sensitizes HeLa cells to Fas receptor-mediated apoptosis. *Molecular Cell Biology* 19, 5991–6002.
- Holmström, T.H., Schmitz, I., Söderström, T.S., Poukkula, M., Johnson, V.L., Chow, S.C., Krammer, P.H., Eriksson, J.E., 2000. MAPK/ERK signaling in activated T cells inhibits CD95/Fas-mediated apoptosis downstream of DISC assembly. *EMBO Journal* 19, 5418–5428.
- Hua, Z.C., Sohn, S.J., Kang, C., Cado, D., Winoto, A., 2003. A function of Fas-associated death domain protein in cell cycle progression localized to a single amino acid at its C-terminal region. *Immunity* 18, 513–521.
- Izeradjene, K., Douglas, L., Delaney, A.B., Houghton, J.A., 2004. Casein kinase I attenuates tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis by regulating the recruitment of Fas-associated death domain and procaspase-8 to the death-inducing signaling complex. *Cancer Research* 64, 8036–8044.
- Knippschild, U., Gocht, A., Wolff, S., Huber, N., Löhler, J., Stöter, M., 2005. The casein kinase 1 family: participation in multiple cellular processes in eukaryotes. *Cell Signalling* 17, 675–689.
- Kischkel, F.C., Hellbardt, S., Behrmann, I., Germer, M., Pawlita, M., Krammer, P.H., Peter, M.E., 1995. Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO Journal* 14, 5579–5588.
- Lambert, C., Landau, A.M., Desbarats, J., 2003. Fas beyond death: A regenerative role for Fas in the nervous system. *Apoptosis* 8, 551–562.
- Law, P.Y., Wong, Y.H., Loh, H.H., 2000. Molecular mechanisms and regulation of opioid receptor signaling. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 40, 389–430.
- Lee, K.-H., Feig, C., Tchikov, V., Schickel, R., Hallas, C., Schütze, S., Peter, M.E., Chan, A.C., 2006. The role of receptor internalization in CD95 signaling. *EMBO Journal* 25, 1009–1023.
- Liao, D., Lin, H., Law, P.Y., Loh, H.H., 2005. Mu-opioid receptors modulate the stability of dendritic spines. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 102, 1725–1730.
- Ma, M.C., Qian, H., Ghassemi, F., Zhao, P., Xia, Y., 2005. Oxygen-sensitive delta-opioid receptor-regulated survival and death signals: novel insights into neuronal preconditioning and protection. *Journal of Biological Chemistry* 280, 16208–16218.
- Mao, J., Sung, B., Ji, R.-R., Lim, G., 2002. Neuronal apoptosis associated with morphine tolerance: Evidence for an opioid-induced neurotoxic mechanism. *Journal of Neuroscience* 22, 7650–7661.
- Marie-Claire, C., Courtin, C., Roques, B.P., Noble, F., 2004. Cytoskeletal genes regulation by chronic morphine treatment in rat striatum. *Neuropharmacology* 29, 2208–2215.
- Matsumoto, N., Imamura, R., Suda, T., 2007. Caspase-8 and JNK-dependent AP-1 activation is required for Fas ligand-induced IL-8 production. *FEBS Journal* 274, 2376–2384.
- Milanés, M.V., Larden, M.L., 1998. Effects of U-50,488H withdrawal on catecholaminergic neurones of the rat ventricle. *British Journal of Pharmacology* 124, 1060–1064.
- Miralles, A., Esteban, S., Sastre-Coll, A., Moranta, D., Asensio, V.J., García-Sevilla, J.A., 2005. High-affinity binding of β -carbolines to imidazole I $_{2B}$ receptors and MAO-A in rat tissues: Norharman blocks the effect of morphine withdrawal on DOPA/noradrenaline synthesis in the brain. *European Journal of Pharmacology* 518, 234–242.
- Muppidi, J.R., Lobito, A.A., Ramaswamy, M., Yang, J.K., Wang, L., Wu, H., Siegel, R.M., 2006. Homotypic FADD interactions through a conserved RXDLL motif are required for death receptor-induced apoptosis. *Cell Death and Differentiation* 13, 1641–1650.
- Murga, C., Ruiz-Gómez, A., García-Higuera, I., Kim, C.M., Benovic, J.L., Mayor Jr., F., 1996. High affinity binding of β -adrenergic receptor kinase to microsomal membranes. *Journal of Biological Chemistry* 271, 985–994.
- Narita, M., Kuzumaki, N., Miyatake, M., Sato, F., Wachi, H., Seyama, Y., Suzuki, T., 2006. Role of δ -opioid receptor function in neurogenesis and neuroprotection. *Journal of Neurochemistry* 97, 1494–1505.
- O'Reilly, L.A., Divisekera, U., Newton, K., Scalzo, K., Kataoka, T., Puthalalath, H., Ito, M., Huang, D.C.S., Strasser, A., 2004. Modifications and intracellular trafficking of FADD/MORT1 and caspase-8 after stimulation of T lymphocytes. *Cell Death and Differentiation* 11, 724–736.

- Osborn, S.L., Sohn, S.J., Winoto, A., 2007. Constitutive phosphorylation mutation in Fas-associated death domain (FADD) results in early cell cycle defects. *Journal of Biological Chemistry* 282, 22786–22792.
- Park, S.-M., Schickel, R., Peter, M.E., 2005. Nonapoptotic functions of FADD-binding death receptors and their signaling molecules. *Current Opinion in Cell Biology* 17, 610–616.
- Pérez-San Emeterio, E., Tramullas, M., Hurlé, M.A., 2006. Modulation of apoptosis in the mouse brain after morphine treatments and morphine withdrawal. *Journal of Neuroscience Research* 83, 1352–1361.
- Peter, M.E., Budd, R.C., Desbarats, J., Hedrick, S.M., Hueber, A.-O., Newell, M.K., Owen, L.B., Pope, R.M., Tschopp, J., Wajant, H., Wallach, D., Wiltrout, N., Zörnig, M., Lynch, D.H., 2007. The CD95 receptor: Apoptosis revisited. *Cell* 129, 447–450.
- Ramos-Miguel, A., Miralles, A., García-Sevilla, J.A., 2007. Morphine-induced locomotor sensitization increases FADD phosphorylation in rat brain. *European Neuropsychopharmacology* 17 (Suppl. 4), S251–S252.
- Sandu, C., Morisawa, G., Wegorzewska, I., Huang, T., Arechiga, A.F., Hill, J.M., Kim, T., Walsh, C.M., Werner, M.H., 2006. FADD self-association is required for stable interaction with an activated death receptor. *Cell Death and Differentiation* 13, 2052–2061.
- Sastry, P.S., Rao, K.S., 2000. Apoptosis and the nervous system. *Journal of Neurochemistry* 74, 1–20.
- Scaffidi, C., Volkland, J., Blomberg, I., Hoffmann, I., Krammer, P.H., Peter, M.E., 2000. Phosphorylation of FADD/MORT1 at serine 194 and association with a 70-kDa cell cycle-regulated protein kinase. *Journal of Immunology* 164, 1236–1242.
- Scherle, P.A., Ma, W., Lim, H., Dey, S., Traskos, J.M., 2000. Regulation of cyclooxygenase-2 induction in the mouse uterus during decidualization. *Journal of Biological Chemistry* 275, 37086–37092.
- Screaton, R.A., Kiessling, S., Sanson, O.J., Millar, C.B., Maddison, K., Bird, A., Clarke, A.R., Frisch, S.M., 2003. Fas-associated death domain protein interacts with methyl-CpG binding domain protein 4: A potential link between genome surveillance and apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 100, 5211–5216.
- Sharma, K., Wang, R.X., Zhang, L.Y., Yin, D.L., Luo, X.Y., Solomon, J.C., Jiang, R.F., Markos, K., Davidson, W., Scott, D.W., Shi, Y.F., 2000. Death the Fas way: regulation and pathophysiology of CD95 and its ligand. *Pharmacology and Therapeutics* 88, 333–347.
- Shimada, K., Matsuyoshi, S., Nakamura, M., Ishida, E., Kishi, M., Konishi, N., 2004. Phosphorylation of FADD is critical for sensitivity to anticancer drug-induced apoptosis. *Carcinogenesis* 25, 1089–1097.
- Shimada, K., Matsuyoshi, S., Nakamura, M., Ishida, E., Konishi, N., 2005. Phosphorylation status of Fas-associated death domain-containing protein (FADD) is associated with prostate cancer progression. *Journal of Pathology* 206, 423–432.
- Shinohara, H., Udagawa, J., Morishita, R., Ueda, H., Otani, H., Semba, R., Kato, K., Asano, T., 2004. Gi2 signaling enhances proliferation of neural progenitor cells in the developing brain. *Journal of Biological Chemistry* 279, 41141–41148.
- Siegel, R.M., Ka-Ming Chang, F., Chun, H.J., Lenardo, M.J., 2000. The multifaceted role of Fas signaling in immune cell homeostasis and autoimmunity. *Nature Immunology* 1, 469–474.
- Takagi, Y., Kikuta, K.-I., Nozaki, K., Fujimoto, M., Hayashi, J., Hashimoto, N., 2007. Neuronal expression of Fas-associated death domain protein and caspase-8 in the peridural parenchyma of cerebral arteriovenous malformations. *Journal of Neurosurgery* 106, 275–282.
- Tegeder, I., Geisslinger, G., 2004. Opioids as modulators of cell death and survival - Unraveling mechanisms and revealing new indications. *Pharmacological Reviews* 56, 351–369.
- Tourneur, L., Buzyn, A., Chiocchia, G., 2005. FADD adaptor in cancer. *Medical Immunology* 4, 1, doi:10.1186/1476-9433-4-1.
- Tsao, L.-I., Su, T.-P., 2001. Hibernation-induced peptide and cell death: [D-Ala², D-Leu³] enkephalin blocks Bax-related apoptotic processes. *European Journal of Pharmacology* 428, 149–151.
- Valjent, E., Corvol, J.-C., Trzaskos, J.M., Girault, J.-A., Hervé, D., 2006. Role of the ERK pathway in psychostimulant-induced locomotor sensitization. *BMC Neuroscience* 7, 20, doi:10.1186/1471-2202-7-20.
- Wang, G., Silva, J., Krishnamurthy, K., Bieberich, E., 2006. A novel isoform of prostate apoptosis response 4 (PAR-4) that co-distributes with F-actin and prevents apoptosis in neural stem cells. *Apoptosis* 11, 315–325.
- Werner, M.H., Wu, C., Walsh, C.M., 2006. Emerging roles for the death adaptor FADD in death receptor avidity and cell cycle regulation. *Cell Cycle* 5, 2332–2338.
- Yin, D.-L., Ren, X.-H., Zheng, Z.-L., Pu, L., Jiang, L.-Z., Ma, L., Pei, G., 1997. Etorphine inhibits cell growth and induces apoptosis in SK-N-SH cells: involvement of pertussis toxin-sensitive G proteins. *Neuroscience Research* 29, 121–127.
- Yoo, N.J., Lee, S.H., Jeong, E.G., Lee, J.W., Soung, Y.H., Nam, S.W., Kim, S.H., Lee, J.Y., Lee, S.H., 2007. Expression of nuclear and cytoplasmic phosphorylated FADD in gastric cancers. *Pathology Research and Practice* 203, 73–78.
- Zhang, J., Gross, S.D., Schroeder, M.D., Anderson, R.A., 1996. Casein kinase I α and α L: Alternative splicing-generated kinases exhibit different catalytic properties. *Biochemistry* 35, 16319–16327.
- Zhang, J., Gibney, G.T., Zhao, P., Xia, Y., 2002. Neuroprotective role of delta-opioid receptors in cortical neurons. *American Journal of Physiology. Cell Physiology* 282, C1225–C1234.
- Zhang, J., Zhang, D., Hua, Z., 2004. FADD and its phosphorylation. *IUBMB Life* 56, 395–401.
- Zuliani, C., Kleber, S., Klusmann, S., Wenger, T., Kenzelmann, M., Schreglmann, N., Martínez, A., del Río, J.A., Soriano, E., Vodrazka, P., Kuner, R., Groene, H.J., Herr, I., Krammer, P.H., Marín-Villalba, A., 2006. Control of neuronal branching by the death receptor CD95 (Fas/Apo-1). *Cell Death and Differentiation* 13, 31–40.

Material complementario (Artículo I)

Efecto de la administración aguda, crónica y abstinencia de agonistas μ -, δ -, y κ -opioides sobre el contenido de CK1 α en la corteza cerebral de rata

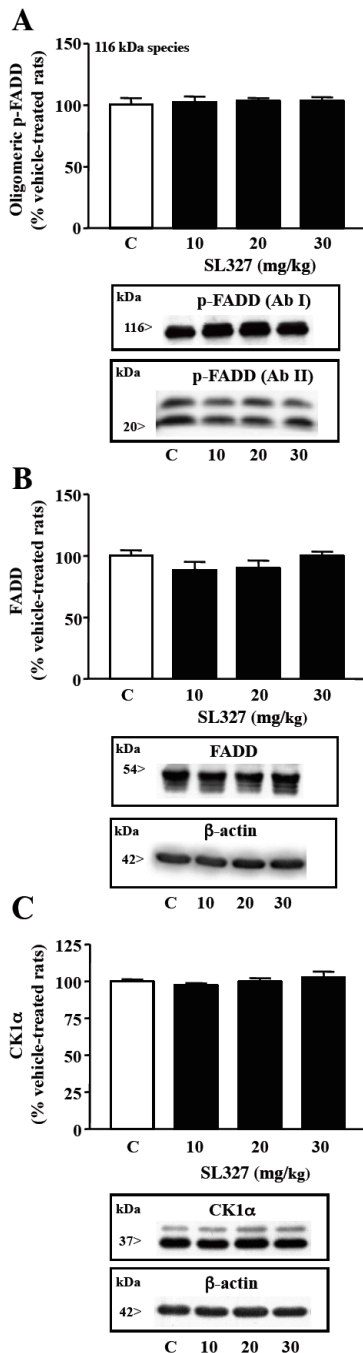
La CK1 α es el principal enzima que cataliza la fosforilación de FADD en la Ser191/194 (Alappat et al., 2005), aunque podrían existir otras (Scaffidi et al., 2003). En estos experimentos se investigó la posible modulación de esta kinasa tras tratamientos agudos y crónicos con diversos agonistas μ -(morfina), δ -(SNC-80) y κ -(U-50488-H) opioides, así como en la abstinencia precipitada por antagonista.



De forma aguda o crónica, ninguno de los tres agonistas opioides indujo modulaciones significativas sobre la inmunodensidad de la CK1 α en la corteza cerebral de las ratas en comparación con aquéllas que recibieron salino (figura S1-1). La abstinencia inducida por la administración de los antagonistas (naloxona, naltrindol o nor-binaltorfimina), tampoco alteró el contenido de la kinasa en la misma región cerebral. Estos resultados no podrían explicar las alteraciones observadas en la fosforilación de FADD en las mismas muestras corticales.

◀ **Figura S1-1.** Efecto de la administración aguda (Acu) o crónica (Chr) de (A) morfina (Acu: 100 mg/kg, i.p., 2 h, n = 5; Chr: 10-100 mg/kg, 5 días, n = 9), (B) SNC-80 (Acu: 10 mg/kg, i.p., 30 min, n = 6; Chr: 10 mg/kg/día, 5 días, n = 4), y (C) U-50488-H (Acu: 30 mg/kg, i.p., 60 min n = 6; Chr: 10 mg/kg/día, 5 días, n = 5), e precipitación de la abstinencia tras los tratamientos crónicos con antagonista (+Nlx, naloxona, 2 mg/kg, n = 6; +Nlt, naltrindol, 5 mg/kg, n = 5; +BNI, nor-binaltorfimina, 5 mg/kg, n = 5) sobre los contenidos de CK1 α en la corteza cerebral de rata. Las ratas control (C, n = 5-6) recibieron salino (μ -, κ -) o DMSO (δ -) en lugar del agonista. Las columnas representan el promedio \pm el error estándar (SEM) de los valores obtenidos en las ratas pertenecientes a cada grupo. Debajo de cada gráfica (A/B/C) se muestra un autorradiograma representativo del efecto de los tratamientos sobre la CK1 α , con dos ratas por grupo. Ninguno de estos tratamientos alteró la inmunodensidad de la β -actina, que se empleó como control de carga (immunoblot representativo en A).

Efecto de la inhibición de MEK1/2 sobre los contenidos basales de FADD, p-FADD y CK1 α en la corteza cerebral de rata



El SL 327 es un inhibidor de MEK1/2 capaz de atravesar la barrera hematoencefálica, e impedir la activación de ERK1/2 en distintas regiones cerebrales. El bloqueo de esta vía de señalización podría proporcionar alguna pista sobre los mecanismos de acción de los fármacos opioides, los cuales median parte de sus actividades a través de esta vía.

En este experimento preliminar, con el objetivo de optimizar la dosis del inhibidor en futuros experimentos, se investigó la modulación de las formas de FADD y su kinasa en el cerebro de ratas sometidas a tratamiento agudo con SL 327 (10, 20, 30 mg/kg, i.p., 90 min, n = 5-7). Ninguna de las dosis empleadas del inhibidor alteró de forma significativa la densidad de p-FADD, FADD o CK1 α en la corteza cerebral de estos animales (figura S1-2).

En el estriado, sólo la dosis mayor de SL 327 incrementó la fosforilación de FADD en la serina 191/194 (figura 6, artículo IV).

◀ **Figura S1-2.** Efecto de la inhibición farmacológica de MEK1/2 con SL 327 (10, 20, 30 mg/kg, i.p., 90 min) en (A) la fosforilación de las formas monomérica y oligomérica de FADD, (B) las formas totales de FADD, y (C) la CK1 α , en la corteza cerebral de rata. Las columnas representan el promedio \pm el error estándar (SEM) de los valores obtenidos en las ratas pertenecientes a cada grupo (n = 5-7), y representados en porcentaje respecto al grupo control (C, n = 5). Debajo de cada gráfica (A/B/C) se muestra un autorradiograma representativo del efecto de los tratamientos sobre las proteínas diana, con una rata por grupo. Ninguno de estos tratamientos alteró la inmuno densidad de la β -actina, que se empleó como control de carga (immunoblots representativo en B y C).

ARTÍCULO II

Título Regulation of the extrinsic and intrinsic apoptotic pathways in the prefrontal cortex of short- and long-term human opiate abusers

Autores García-Fuster MJ, Ramos-Miguel A, Rivero G, La Harpe R, Meana JJ, García-Sevilla JA

Revista Neuroscience, 2008; 157: 105-119

Resumen

La adicción a opiáceos es un trastorno crónico caracterizado por la aparición de conductas complejas, tales como tolerancia, dependencia y sensibilización a la droga, así como vulnerabilidad a la recaída y alta mortalidad. La inducción de muerte neuronal por parte de estas sustancias podría explicar algunas de estas conductas prototípicas del adicto. No obstante, en animales de laboratorio, la capacidad de los opiáceos de producir apoptosis en neuronas es todavía un tema controvertido. Este estudio en cerebro humano post mórtem, ha examinado el estado de algunas de las proteínas más relevantes asociadas a las vías apoptóticas extrínseca (receptor Fas, FADD, caspasa-8 y FLIP), e intrínseca (citocromo c, Bcl-2, Bax y AIF), así como los mecanismos efectores en los cuales convergen (caspasa-3, fragmentación de PARP-1), en la corteza prefrontal de un numeroso grupo (n = 36) bien caracterizado de consumidores de heroína y metadona de corto (ST) y largo (LT) plazo. El análisis mediante *Western blotting* reveló un incremento en las proteínas anti-apoptóticas FLIP_L y Bcl-2 en las muestras cerebrales de los sujetos ST y LT, en comparación con los sujetos sanos con quienes fueron emparejados en función del sexo, edad y PMD, y una reducción en las proteínas pro-apoptóticas FADD y citocromo c. Estas alteraciones, junto con la ausencia de la activación de los mecanismos efectores, sugieren que el consumo de opiáceos no activa los mecanismos (extrínsecos o intrínsecos) canónicos de muerte celular programada en la corteza prefrontal humana. Por el contrario, los resultados indican una activación de los mecanismos de neuroprotección, que podrían estar implicados en la inducción de cambios neuroadaptativos en la corteza prefrontal de los adictos a opiáceos.

REGULATION OF THE EXTRINSIC AND INTRINSIC APOPTOTIC PATHWAYS IN THE PREFRONTAL CORTEX OF SHORT- AND LONG-TERM HUMAN OPIATE ABUSERS

M. J. GARCÍA-FUSTER,^{a1} A. RAMOS-MIGUEL,^a
G. RIVERO,^{a,b} R. LA HARPE,^c J. J. MEANA^b
AND J. A. GARCÍA-SEVILLA^{a*}

^aLaboratorio de Neurofarmacología, IUNICS, Universitat de les Illes Balears, and Red Temática de Investigación Cooperativa en Salud (Trastornos Adictivos), Cra. Valldemossa km 7.5, E-07122 Palma de Mallorca, Spain

^bDepartamento de Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad del País Vasco, and Centro de Investigación Biomédica en Red sobre Salud Mental (CIBERSAM), E-48109 Leioa, Bizkaia, Spain

^cCentre Universitaire Romand de Médecine Légale—Site Genève, Faculté de Médecine, Université de Genève, Avenue de Champel 9, CH-1211 Genève 4, Switzerland

Abstract—Opiate addiction is a chronic medical disorder characterized by drug tolerance and dependence, behavioral sensitization, vulnerability to compulsive relapse, and high mortality. In laboratory animals, the potential effect of opiate drugs to induce cell death by apoptosis is a controversial topic. This postmortem human brain study examined the status of the extrinsic and intrinsic apoptotic pathways in the prefrontal cortex of a large group of well-characterized heroin or methadone abusers. In these subjects ($n=36$), the immunoccontent of apoptosis-1 protein (Fas) death receptor did not differ from that in age-, gender-, and postmortem delay-matched controls. In contrast, Fas-associated protein with death domain (FADD), the mediator of the death signal, was significantly decreased in the same brain samples (all addicts: 30%, $n=36$; short-term abuse (ST): 31%, $n=15$; long-term abuse (LT): 29%, $n=21$). The initiator caspase-8 was not altered, but FLIP_L (Fas-associated protein with death domain-like interleukin-1 β -converting enzyme-inhibitory protein), a dominant inhibitor of caspase-8, was increased in LT addicts (19%). In the intrinsic pathway, the pro-apoptotic mitochondrial proteins Bax (Bcl-2-associated X protein) and AIF (apoptosis-inducing factor) remained unchanged, but cytochrome c was decreased (all addicts: 25%; ST: 31%; LT: 20%) and anti-apoptotic B-cell leukemia 2 (Bcl-2) increased in LT addicts (24%). The content of executioner caspase-3 and the pattern of cleavage of the nuclear enzyme poly-(ADP-ribose)-

polymerase-1 (PARP-1) were similar in opiate addicts and control subjects. Taken together, the data revealed that the extrinsic and intrinsic canonical apoptotic pathways are not abnormally activated in the prefrontal cortex of opiate abusers. Instead, the chronic modulation of some of their components (downregulation of FADD and cytochrome c; upregulation of FLIP_L and Bcl-2) suggests the induction of non-apoptotic actions by opiate drugs related to phenomena of synaptic plasticity in the brain. These neurochemical adaptations could play a major role in the development of opiate tolerance, sensitization and relapse in human addicts. © 2008 IBRO. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

Key words: opiate addiction, postmortem human brain, Fas receptor apoptotic pathway, mitochondrial apoptotic pathway, pro- and anti-apoptotic proteins.

Opiate addiction is a chronic medical disorder classically characterized by opiate tolerance and dependence, behavioral sensitization, vulnerability to compulsive relapse, and high mortality. Drug addiction, including opiates, is also defined as a form of drug-induced neural plasticity (Kalivas and O'Brien, 2008) in which specific and long-term neurochemical adaptations could play major roles in the development of drug tolerance, sensitization and relapse. Besides, opiates and other drugs of abuse induce various forms of neurotoxicity, which can result in serious brain dysfunctions in most subjects (Gruber et al., 2007; Nutt et al., 2007).

Structural brain imaging studies in opiate-dependent subjects have reported ventricular and cortical volume loss (Pezawas et al., 1998), as well as decreased gray matter density in bilateral prefrontal and temporal cortex (Lyo et al., 2006). Similarly, children (9 to 14-year-old) who had been exposed to heroin *in utero* displayed smaller intracranial and brain volumes, including a reduced cortical thickness of the anterior cingulate and lateral orbitofrontal cortex of the right hemisphere (Walhovd et al., 2007). These structural abnormalities could be associated with the behavioral and neuropsychological dysfunctions of the prefrontal cortex observed in chronic opiate addicts or after prenatal exposure to heroin (Gruber et al., 2007; Walhovd et al., 2007; Yücel et al., 2007).

The potential effect of opiate drugs to induce cell death by apoptosis is a controversial issue (Tegeader and Geisslinger, 2004). However, increased apoptosis in brains of opiate addicts might play a role in the mechanisms underlying the reported loss of gray matter density in these

¹ Present address: The Molecular and Behavioral Neuroscience Institute, University of Michigan, Ann Arbor, MI 48109–0720, USA.

*Corresponding author. Tel: +34-971-173148; fax: +34-971-173184. E-mail address: jesus.garcia-sevilla@uib.es (J. A. García-Sevilla).

Abbreviations: AIF, apoptosis-inducing factor; Bax, Bcl-2-associated X protein; Bcl-2, B-cell leukemia 2; DISC, death-inducing signaling complex; ECL, enhanced chemiluminescence; FADD, Fas-associated protein with death domain; Fas, apoptosis-1 protein; FLIP, Fas-associated protein with death domain-like interleukin-1 β -converting enzyme-inhibitory protein; IOD, integrated optical density; LT, long-term abuse; MAM, 6-monoacetylmorphine; PARP-1, poly-(ADP-ribose)-polymerase-1; PMD, postmortem delay; ST, short-term abuse; UIB, University of the Balearic Islands.

0306-4522/08 © 2008 IBRO. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved. doi:10.1016/j.neuroscience.2008.09.002

subjects (Lyo et al., 2006). In the CNS, classical apoptosis can be initiated through the extrinsic (e.g. apoptosis-1 protein (Fas) death receptor) and intrinsic (mitochondrial proteins) pathways, which converge to the activation of executioner caspases (e.g. caspases-3/7) with the final cleavage of the majority of downstream cellular substrates (Sastry and Rao, 2000; Krantic et al., 2007; Kumar, 2007; Burke, 2008). Chronic exposure to μ -opioid receptor agonists was reported to induce upregulation of various pro-apoptotic proteins in brain tissue of laboratory animals, which was compatible with the induction of cell death (Boronat et al., 2001; Mao et al., 2002; García-Fuster et al., 2003, 2004; Pérez-San Emeterio et al., 2006; Cunha-Oliveira et al., 2007; Tramullas et al., 2007). However, the association between chronic heroin or morphine exposure and neuronal death remains inconclusive (see Liao et al., 2005; García-Fuster et al., 2007; Tramullas et al., 2008). Moreover, the possible induction of apoptotic cell death in brains of human opiate addicts remains unknown. This approach is particularly relevant because animal models of opiate addiction cannot fully reproduce the features and framework of opiate intake in humans.

To test the hypothesis that human opiate addiction results in upregulation of canonical apoptotic pathways, the content of relevant proteins of the extrinsic (Fas receptor, FADD adaptor [Fas-associated protein with death domain], caspase-8, FLIP_L [Fas-associated protein with death domain-like interleukin-1 β -converting enzyme]-inhibitory protein]), intrinsic (B-cell leukemia 2 (Bcl-2), Bcl-2-associated X protein (Bax), cytochrome c, AIF [apoptosis-inducing factor]), and executioner (caspase-3) death signaling, as well as the monitoring of cell death (cleavage of the nuclear enzyme PARP-1 [poly-(ADP-ribose)-polymerase-1]), were measured in a large series of postmortem brains of well-characterized opiate abusers. These 10 molecular targets, including the examination of the ratio of anti-apoptotic Bcl-2 to pro-apoptotic Bax, were chosen for analysis because they are prototypic molecules of the various families of apoptotic signaling proteins, and also because some of them were previously shown to be upregulated by opiate drugs in brains of laboratory animals (see above). The prefrontal cortex (Fuster, 2001) was selected for examination (Ferrer-Alcón et al., 2003, 2004) because it is directly related with the mesocorticolimbic dopaminergic system and the rewarding and addictive properties of opioids, and, in addition, it plays an important role in cognitive control (e.g. executive control over drug use) (Miller and Cohen, 2001; Williams et al., 2001; Volkow et al., 2003; Everitt et al., 2007; Schoenbaum and Shaham, 2008).

The results reveal that the molecular machineries of the main apoptotic pathways are not abnormally activated in the prefrontal cortex of long-term opiate addicts. In contrast, the chronic adaptations of some of these proteins could suggest non-apoptotic actions, induced by opiate drugs, associated with phenomena of synaptic plasticity in the brain. Preliminary results of the present study were

reported to the 20th ECNP Congress (García-Sevilla et al., 2007).

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Subject selection and brain samples

Consecutive human brains from opiate abusers and control subjects were obtained at autopsies performed in the "Centre Universitaire Romand de Médecine Légale–Site Genève" (1999–2004), University of Geneva, Geneva, Switzerland. Brain specimens were obtained following all the legal procedures of the "République et Canton de Genève," and the study was also approved by the research and ethical review boards of the Department of Psychiatry, University of Geneva. All experiments with postmortem brain samples were performed in the "Laboratorio de Neurofarmacología–IUNICS," University of the Balearic Islands (UIB, Spain), after formal approval from the Ethical Committee of Clinical Investigation (CEIC) and in accordance with the guidelines of the UIB. Postmortem brain tissue from a medical examiner's office has been shown to provide the best standards of tissue quality for this type of study (Stan et al., 2006). For all subjects, specimens of the right prefrontal cortex (Brodmann's area 9, middle frontal gyrus) were carefully dissected to include only gray matter (no more than a 1-mm white-matter border was included), and immediately stored at -80°C until the assays. The right prefrontal cortex was selected for convenience to keep in line with previous studies (Ferrer-Alcón et al., 2003, 2004). Similar gray matter reductions have been demonstrated in the right and left prefrontal cortex (Brodmann's areas 8–10) of opiate-dependent subjects (Lyo et al., 2006). In healthy subjects, on the other hand, cognitive operations (memory tasks) have been shown to induce asymmetric activations of the two prefrontal cortices (reviewed in Fuster, 2001).

Brain samples were collected from 36 well-characterized opiate abusers who had died of an accidental heroin or methadone overdose, except three subjects (Table 1). A history of opiate abuse was made with the following criteria: the presence of opiates and metabolites in blood samples; the police reports following interviews with family members; and the medical histories of the subjects when available from the Health Authority (most methadone abusers had been registered in a methadone maintenance program; Perret et al., 2000). Retrospective search for other psychiatric diagnoses (comorbidity) allowed the identification of three opioid addicts who had been diagnosed (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders-IV, American Psychiatric Association, 2000, Axis I disorders) with major depressive disorder, although postmortem toxicology screening did not reveal the presence of antidepressant drugs (Table 1). Quantitative analysis of opiates, cocaine, ethanol and other drugs (e.g. antidepressants, antipsychotics, amphetamines, cannabinoids) were mainly carried out on blood and hair specimens at the Toxicology Unit (STS 390, Swiss Testing, University of Geneva) by means of radioimmunoassay with subsequent gas chromatography/mass spectrometry confirmation (Table 1; for comparison with similar data on blood opiates see Goldberger et al., 1994; Merrill et al., 1996; Repetto and Repetto, 1997; Perret et al., 2000; Fugelstad et al., 2003). Opiate abusers died within a short period of time, as revealed by the high concentrations of 6-monoacetylmorphine (MAM) and free morphine or methadone in blood (see Goldberger et al., 1994; Fugelstad et al., 2003). Toxicology in hair samples (usually scalp hair) was used for segmental analysis (3–25 cm) to obtain an indication of drug exposure over the last several months (Boumba et al., 2006). In 21 opiate abusers (Table 1), segmented hair analysis of MAM (range, 0.2–20 ng/mg), morphine (range, 0.1–4.5 ng/mg) or methadone (range, 0.2–135 ng/mg) indicated a long-term abuse (LT) of opiates (6–24 months before death; subgroup LT) (Ferrer-Alcón et al., 2004; Pujol et al., 2007). In 11

Table 1. Demographic characteristics and toxicological data of individual short-term and long-term opiate abusers

Paired subjects	Sex/age	PMD	Total blood opiates ($\mu\text{g/ml}$)	Other drugs ($\mu\text{g/ml}$), ethanol (g/l)	Hair opiates and other drugs (ng/mg)
1	M/45 (M/38)	57 (59)	Met (0.35)	Eth (0.45)+Cit (0.2)	None
2	F/41 (F/49)	60 (77)	Mor (0.94)	Ven (0.5)	None
3	M/33 (M/36)	38 (44)	Met (0.2)	Eth (1.36)	None
4	M/44 (M/39)	29 (25)	Mor (0.3)	Eth (1.17)	None
5 ^a	M/29 (M/38)	63 (77)	Mor (0.3)	None	None
6	M/28 (M/27)	2 (10)	Mor (0.9)	None	None
7	F/35 (M/38)	62 (77)	Mor (0.25)	None	None
8	M/40 (M/40)	12 (12)	Met (0.3)	Eth (0.62)	None
9	M/51 (M/56)	16 (16)	Mor (0.35)	Eth (1.99)	None
10	F/32 (F/23)	43 (55)	Mor (1.45)	None	None
11	M/33 (M/29)	22 (25)	Mor (0.9)	None	None
12	M/32 (M/27)	22 (20)	Mor (0.6)+Cod (0.3)	None	None
13	M/30 (M/34)	37 (42)	Mor (0.2)	Eth (1.45)	None
14	M/18 (M/20)	20 (21)	Met (0.3)	Cit (0.1)	None
15	F/33 (F/26)	14 (10)	Met (2.2)	Olz (1.1)	None
16 ^a	F/45 (F/44)	60 (46)	Met (3.7)+Cod (4.3)	Eth (0.35)+Lmp (0.2)	Met (3.3)+Cod (14)
17	M/31 (M/36)	48 (44)	Mor (0.07) ^b	None	MAM (0.2)+Coc (14)
18	F/37 (M/39)	34 (25)	Met (0.25)	Eth (3.7)	MAM (1.6)+Coc (8)
19 ^a	F/24 (M/38)	75 (77)	Met (0.5)	None	Met (0.2)+MAM (0.4)
20	M/36 (F/35)	3 (8)	Mor (0.74)	Clo (0.4)	Mor (0.6)+MAM (1.9)+Met (0.5)
21	M/34 (M/38)	86 (77)	Mor (0.85)	Eth (1.72)	Met (0.7)+MAM (0.5)+Coc (0.8)
22	M/42 (M/48)	5 (16)	Met (4.3)	None	Met (65)+Coc (0.9)
23	M/50 (M/56)	28 (16)	Mor (0.13)+Met (0.4)	None	Mor (4.5)+MAM (20)+Met (0.6)
24	F/46 (M/52)	32 (28)	Mor (0.9)	None	Mor (0.4)+MAM (0.2)+Met (0.8)+Cod (13)
25	M/24 (F/23)	53 (55)	Mor (1.2)	THC (0.007)	Mor (0.3)+MAM (1.5)+Coc (4.5)
26	M/34 (M/30)	3 (10)	Met (0.3)	None	Met (0.4)+Mor (1.8)+MAM (0.8)
27	F/33 (F/30)	16 (15)	Met (1.4)	Ven (2.5)	Met (0.4)
28	F/20 (M/34)	51 (42)	Mor (0.4)	Eth (1.2)+Ven (0.3)	Mor (0.1)+MAM (0.4)+Coc (0.9)
29	M/25 (F/25)	7 (16)	Mor (0.3)	Eth (1.77)	Mor (0.2)+MAM (1.7)+Met (135)+MDMA (6.2)
30	M/47 (M/51)	96 (93)	Met (3.3)	Qua (10.5)	Met (8.7)+Coc (0.9)
31	F/35 (F/26)	12 (10)	Met (1.7)	Flu (0.5)	Met (20)+Mor (0.8)+MAM (0.5)
32	F/36 (M/39)	8 (8)	Mor (0.11) ^b	Coc (0.08)	Mor (0.5)+MAM (0.6)+Cod (2.7)+Coc (13)
33	F/30 (F/39)	40 (34)	Met (0.25)+Mor (0.15)	None	Met (1.9)+Mor (1.4)+MAM (2.5)+Coc (40)
34	F/26 (F/39)	33 (34)	Met (1.4)	Coc (<0.1)	NT
35	F/35 (M/41)	25 (27)	Met (0.3) ^b	Mir (0.35)	Met (11)+Mor (0.7)+MAM (0.8)+Coc (29)
36	F/48 (M/46)	29 (29)	Mor (0.55)+Met (0.6)	Cit (1.5)+Olz (0.3)	MAM (1.4)+Coc (21)
	Addicts: 20M/16F 35 \pm 1 years	34 \pm 4 h	Mor (0.55 \pm 0.09, <i>n</i> =21)		
	Controls: 18M/9F 37 \pm 2 years	35 \pm 5 h	Met (0.99 \pm 0.26, <i>n</i> =15)		

Data (sex, M, male, F, female; age in years; PMD, in hours) of the respective matched control subject presented in parentheses. Opiate abusers 1–15 were ex-opiate addicts or naive subjects with no history of opiate abuse (group ST, short-term abuse), and opiate abusers 16–36 had a history of chronic opiate addiction (group LT, long-term abuse). Blood data for antidepressant (Cit, Clo, Flu, Mir, Ven) and antipsychotic (Olz) drugs corresponded to therapeutic concentrations. Some subjects were also positive for benzodiazepines and THC in urine specimens. NT: not tested.

^a Opiate abusers with a confirmed diagnosis of major depressive disorder, recurrent (subjects 5, 16 and 19).

^b Death not due to opiate overdose (subject 17, myocardial infarction; subject 32, homicide, strangulation; subject 35, not determined).

The cause of death of opiate abusers (except three) was an accidental overdose of heroin [detection of MAM and free morphine (Mor) in blood] or methadone (Met, detection of Met and its metabolite 2-ethylidene-1,5-dimethyl-3,3-diphenylpyrrolidone in blood). Quantitative determinations of opiates and other drugs in blood and hair samples were performed as indicated in Experimental Procedures.

Cit, citalopram; Clo, clomipramine; Coc, cocaine; Cod, codeine; Eth, ethanol; Flu, fluoxetine; Lmp, levomepromazine; MDMA, 3,4-methylenedioxymethamphetamine; Mir, mirtazapine; Olz, olanzapine; Qua, methaqualone; Qui, quinine; THC, Δ 9-tetrahydrocannabinol; Thio, thioridazine; Ven, venlafaxine.

of these chronic opiate abusers, cocaine was also detected in hair samples (range: 0.9–40 ng/mg) but not in blood samples (except marginal residues in two subjects; see Repetto and Repetto, 1997), which indicated a continued exposure to opiates with past (last year before death) psychostimulant abuse (polydrug abusers). In 15 opiate abusers (Table 1), hair screening did not reveal the presence of opiates, cocaine or other drugs, indicating a short-

term abuse (ST), if any, of opiates or cocaine in these subjects (<than 2 weeks or non-tolerant ex-addicts; subgroup ST). Ethanol was found in blood samples of some opiate abusers (Table 1), but evidence of ethanol dependence was not obtained in medical records. Other psychotropic drugs were detected in blood and/or hair samples of these subjects (e.g. therapeutic concentrations of antidepressants and antipsychotics) (Table 1).

Control brain samples were obtained from 27 healthy subjects dying in the same period of time and who met the following criteria: sudden and unexpected death (e.g. traffic and car accidents, myocardial infarction, gunshot wounds, and homicide); appropriate postmortem delay (PMD), age and gender to match one or two subjects in the opiate abuser subgroups; absence of history of drug abuse, ethanol dependence or neuropsychiatric disorder; and negative toxicological screening with the exception of ethanol (range, 0.03–2.34 g/l, $n=12$).

Opiate abusers and matched controls died within a short period of time. Low brain pH is assumed to be an indicator of severe terminal conditions (Hardy et al., 1985). However, the agonal state of these subjects was minimal, and brief deaths generally show normal brain pH with minor influence on gene expression changes (Preece and Cairns, 2003; Li et al., 2004).

The demographics for the definitive pairs of subjects (ST and LT opiate abusers and their respective matched controls) are summarized in Table 1. To confirm some results, the contents of Fas and FADD were also measured in the prefrontal cortex (Brodmann's area 9) of an independent series of LT opiate addicts (PMD: 21 ± 2 h; age: 34 ± 2 years, $n=12$) who were matched with the appropriate control subjects (PMD: 22 ± 2 h; age: 37 ± 3 years, $n=12$) (Table 2; see Ferrer-Alcón et al., 2004 for other details of these subjects).

Brain sample preparation

Human brain samples were prepared as described previously with some modifications (Ferrer-Alcón et al., 2004). Briefly, 175–300 mg of prefrontal cortex was homogenized in 50 mM Tris–HCl buffer, pH 6.8, containing 1 mM EDTA, 2% SDS, various protease inhibitors (1.3 mM pepabloc, 10 μ g/ml of each leupeptin, pepstatin A and antipain, and 5 μ g/ml E64) and two phosphatase inhibitors (1 mM cantharidin and 1 mM sodium orthovanadate). Aliquots of this mixture were combined with solubilization loading buffer [50 mM Tris–HCl (pH 6.8), 1.5% SDS, 10% glycerol, 2.5% β -mercaptoethanol and 0.1% Bromophenol Blue] to reach a final protein concentration of 3 μ g/ μ l. The mixtures were denatured at 95 °C for 5 min and stored at –80 °C until use. Protein concentrations were

determined by the biuret reaction using bicinchoninic acid for colorimetric detection of cuprous cation (BCA, Protein Assay Reagent, Pierce Chemical Company, Rockford, IL, USA).

Functional assay for apoptotic cell death

The possible induction of abnormal cell death in the prefrontal cortex of opiate abusers, relative to that in control subjects, was assessed by measuring the cleavage of the nuclear enzyme PARP-1 (Tewari et al., 1995; Putt et al., 2005), using the PARP-1 Cleavage Detection Kit (Calbiochem, Darmstadt, Germany). This functional assay measures the cleavage of the death substrate PARP-1 (116 kDa) into a specific 85 kDa fragment, whose basal content is increased after the activation of caspase-3, the main executioner protease of various apoptotic pathways (see Garnett et al., 2006; Kumar, 2007). PARP-1 and cleaved fragment were assessed by Western blot analysis (see below).

Effects of PMD, age, and gender on apoptotic proteins: Other variables affecting human tissue quality

PMD (time period from death to the storage of the brain specimen) and the age of subject at death represent well-known potential confounding variables in postmortem human brain studies (Grange-Midroit et al., 2002; Stan et al., 2006). To assess the effects of these factors on the density of apoptotic proteins and PARP-1 in the prefrontal cortex, an independent series of healthy subjects (nine men, four women) with different PMD (range 5–102 h) and age (range 15–52 years) was used. These subjects were recruited as above (see healthy control subjects), including in all cases a negative screening for ethanol in blood samples.

It is known that freezing, storage, and thawing can induce tissue sample damage (Grange-Midroit et al., 2002). In the prefrontal cortex of control subjects and opiate abusers, the uniform expression of the death substrate PARP-1 (116 kDa) (Fig. 9B) suggested the (antemortem) induction of little DNA damage, a good indicator of cell viability (Putt et al., 2005). Moreover, the

Table 2. Demographic characteristics, toxicological data, and FADD content in the prefrontal cortex of an independent series of long-term opiate abusers

Paired subjects	Sex/age	PMD	Blood opiates (μ g/ml)	Other drugs (μ g/ml)	Hair opiates and cocaine (ng/mg)	FADD content (% matched control)	
						Ab H-181	Ab N-18
1	M/25 (M/20)	26 (35)	Mor (1.1)	None	MAM (0.9)	68	89
2	M/26 (M/27)	20 (22)	Met (0.3)	None	Met (0.6)	72	67
3	M/26 (M/27)	13 (22)	Mor (2.0)	None	MAM (0.4)+Met (4.0)	65	56
4	M/40 (M/48)	16 (24)	Met (0.8)	Qui (1.2)	Met (0.8)	78	86
5	M/33 (M/40)	16 (24)	Mor (1.5)	None	MAM (0.4)+Met (14)	69	81
6	M/44 (M/44)	19 (19)	Mor (0.6)	None	Mor (0.2)	80	90
7	M/32 (M/36)	29 (29)	Mor (1.6)	None	Mor (0.7)+Coc (1.0)	79	76
8	M/42 (M/44)	28 (19)	Met (0.4)	None	Met (13.5)	48	25
9	M/42 (F/50)	18 (10)	Mor (0.8)	None	Mor (0.4)	107	84
10	M/46 (F/50)	13 (10)	Mor (0.8)	Coc (0.2)	Mor (0.2)+Coc (6.5)	53	103
11	F/28 (M/23)	13 (17)	Met (1.4)	None	Met (4.7)+Coc (0.9)	59	60
12	M/29 (M/35)	38 (29)	Met (0.4)	None	Met (1.3)+Mor (0.8)	80	77
	Addicts: 11M/1F 34 \pm 2 years	21 \pm 2 h			Mean \pm S.E.M.	72 \pm 5**	75 \pm 6*
	Controls: 10M/2F 37 \pm 3 years	22 \pm 2 h					

Data of matched control subjects presented in parentheses as for Table 1. The cause of death of opiate addicts was an accidental overdose of heroin or methadone. Other details as for Table 1.

* $P < 0.005$ (one-sample *t*-test).

** $P < 0.001$ (one-sample *t*-test).

variability of protein immunoreactivity among control subjects (only for proteins not affected by PMD) was low (e.g. $100 \pm 6\%$ for cytochrome c in the group of 27 control subjects). These observations can be taken as general indicators of the good tissue quality of the postmortem human brain samples used in this study.

Western blot assay

The apoptotic proteins were quantified by immunoblot analysis as described previously with minor modifications (Ferrer-Alcón et al., 2004; García-Fuster et al., 2007). In routine experiments, human brain proteins (40 μg , total homogenate assay) were resolved on 10% sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis minigels (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) and blotted on nitrocellulose membranes. The membranes were incubated in phosphate-buffered saline containing 5% nonfat dry milk, 0.2% Tween-20, and 0.5% bovine serum albumin to block nonspecific protein-binding sites. Then, the blots were incubated in blocking solution containing the primary antibody (overnight at 4 °C), followed by the appropriate peroxidase-linked secondary antibody (1 h at 24 °C). Bound antibody (specific immunoreactivity) was detected with the enhanced chemiluminescence Western blot detection system (ECL; Amersham, Buckinghamshire, UK) and visualized by exposure to autoradiographic film (Amersham ECL Hy-perfilm) for 1–10 min (autoradiograms).

The primary antibodies (epitope-affinity purified) are listed in Table 3, and were used at the appropriate dilutions (1:500–1:10,000). Horseradish peroxidase–linked anti-rabbit or anti-goat IgG (1:5000–10,000 dilution) and anti-mouse IgG (1:5000–8000 dilution) were used as secondary antibodies. The characterization of some of these antibodies (Fas, FADD, caspases, Bax) in brain tissue has been reported (Dargusch et al., 2001; García-Fuster et al., 2003, 2004, 2007). In order to test the selectivity of other antibodies with specific proteins (FLIP, cytochrome c, AIF), the corresponding antigenic peptide was preincubated in excess with the antiserum to block the binding of the antibody (not shown) or the target proteins were identified with positive controls (see Figs. 4A, C and 9B). As a control for sample loading and protein transfer, the blots were stripped (Boronat et al., 2001) and reprobated with anti- β -actin monoclonal antibody (see comment below).

Quantification of target proteins

The autoradiograms were quantified by densitometric scanning (GS-800 Imaging Densitometer, Bio-Rad) of the immunoreactive bands (integrated optical density (IOD) units). Prior to analysis, the linearity of protein concentration for Western blotting was

ascertained by resolution of various concentrations of protein, which resulted in good linear relations (i.e. total protein loaded, usually 20–60 μg , versus IOD units). The relative content of apoptotic proteins in the human prefrontal cortex was investigated in pairs of opiate abusers and control subjects, who were matched as much as possible for PMD, age and gender (Tables 1 and 2). In a given experiment, the amount of a target protein (40 μg protein of total homogenate) of one (ST or LT) or two (ST and LT) or three (ST and two LT) opiate abusers was compared with that of one or two control subjects, which were run together on the same gel. This quantification procedure was repeated three to four times for each pair of subjects (in some cases with other matched controls) in different gels to confirm the results. Finally, percent changes in immunoreactivity with respect to control samples (100%) were calculated for each opiate abuser in each gel, and the mean value of the different gels was used as a final estimate.

Similar results were obtained after data normalization with the IOD of the corresponding β -actin band. Although the brain content of β -actin was not modified by morphine exposure (Ammon et al., 2003), other studies have reported alterations of various cytoskeletal proteins after chronic morphine administration (Ferrer-Alcón et al., 2003; Marie-Claire et al., 2004; Morón et al., 2007). For this study, therefore, it was decided to report the original data without any normalization.

Data and statistical analysis

All series of data were analyzed with the program GraphPad Prism, version 4.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA). Results are expressed as mean \pm S.E.M. The experimental design of this study incorporated the pairing of subjects (opiate abusers and healthy controls) matched for different variables (see Tables 1 and 2), and consequently a statistical test that takes pairing into account was performed. A two-tailed one-sample *t*-test (with *N*–1 degrees of freedom), which compares the experimental mean (percent of control) with a hypothetical value of 100 (Motulsky, 1995), was used for the statistical evaluations. The subgroups of ST and LT opiate abusers were similarly compared with the corresponding matched controls. Pearson's correlation coefficients were calculated to test for possible association between variables. The level of significance was chosen at *P*=0.05.

Reagents

Acrylamide (Protogel) was from Conda (Madrid, Spain). Other materials such as secondary antibodies, ECL reagents, and au-

Table 3. Antibodies used for the detection and quantification of apoptotic and other proteins in the human brain

Protein	Antibody	Antigen	Host	Catalog	Batch	Company
Fas	M-20	Mouse Fas (C-residues)	Rabbit	sc-716	D-219, H-301	Santa Cruz, USA
Fas	C-20	Human Fas (300–319 residues)	Rabbit	sc-715	D-172	Santa Cruz, USA
FADD	H-181	Human FADD (28–208 residues)	Rabbit	sc-5559	J-2004, C-112	Santa Cruz, USA
FADD	N-18	Human FADD (N-residues)	Goat	sc-1172	H-231	Santa Cruz, USA
Caspase-8/p20	H-134	Human caspase-8 (217–350 residues)	Rabbit	sc-7890	F-1604	Santa Cruz, USA
Caspase-3/p20	H-277	Human caspase-3 (1–277 residues)	Rabbit	sc-7148	H-011	Santa Cruz, USA
FLIP-S/L	G-11	Human FLIP (1–202 residues)	Mouse	sc-5276	F-0404	Santa Cruz, USA
FLIP-S/L	H-202	Human FLIP (1–202 residues)	Rabbit	sc-8347	H-3005	Santa Cruz, USA
Bcl-2	DC21	Human Bcl-2 (1–205 residues)	Rabbit	sc-783	B-141	Santa Cruz, USA
Bcl-2	N-19	Human Bcl-2 (N-residues)	Rabbit	sc-492	C-082	Santa Cruz, USA
Bax	N-20	Human Bax (1–171 residues)	Rabbit	sc-493	G-101	Santa Cruz, USA
Cytochrome c	7H8.2C12	Pigeon cytochr c (93–104 residues)	Mouse	556433	59671	BD Pharmigen, USA
AIF	D-20	Mouse AIF (C-residues)	Goat	sc-9416	A282	Santa Cruz, USA
PARP	512739	Human PARP (215–228 residues)	Rabbit	512729	D33259	Calbiochem, FRG
β -Actin	Clone AC-15	Human β -actin (2–16 residues)	Mouse	A1978	016K4817	Sigma Chemical, USA

toradiography films were purchased from Cell Signaling or Amersham. All other chemicals were from Sigma.

RESULTS

Effects of PMD, age, and gender on apoptotic proteins in the human brain

In preliminary experiments, the influence of PMD on the immunoreactive content of apoptotic proteins and PARP-1 was assessed to determine the pattern of post-mortem degradation. In the prefrontal cortex of 13 healthy subjects (see Experimental procedures), the densities of Fas receptor (glycosylated and aggregated forms), adaptor FADD (monomeric and dimeric forms), caspase-8, caspase-3, and PARP-1 declined as a function of PMD (range 5–102 h) (Figs. 1A–3A, and 8A–9A), following the usually observed linear decay model for most brain proteins (e.g. see Grange-Midroit et al., 2002; and Ferrer-Alcón et al., 2003 for other decay models). In marked contrast, this range of PMD (5–102

h) did not significantly alter the contents of FLIP_L, Bcl-2, Bax, cytochrome c, and AIF in the same brain samples (Figs. 4B, 5A, C, 6A, 7A). Other human brain studies have also reported little or no correlation between PMD and the content of various apoptotic proteins (caspases-3/8/9, FLIP, cytochrome c) in the frontal cortex and cerebellum of healthy subjects (Engidawork et al., 2001). The age (range, 15–52 years) and gender (nine men, four women) of the subjects did not alter the expression of apoptotic proteins in the human brain (data not shown). See Experimental Procedures for other parameters concerning the quality of the human brain samples.

It should be noted that there was no difference in PMD and age between the control (PMD: 34±4 h, age: 35±1 years) and opiate abuser (PMD: 35±5 h, age: 37±2 years) groups (Tables 1 and 2). Therefore, it is unlikely that these variables may have influenced the results of the study.

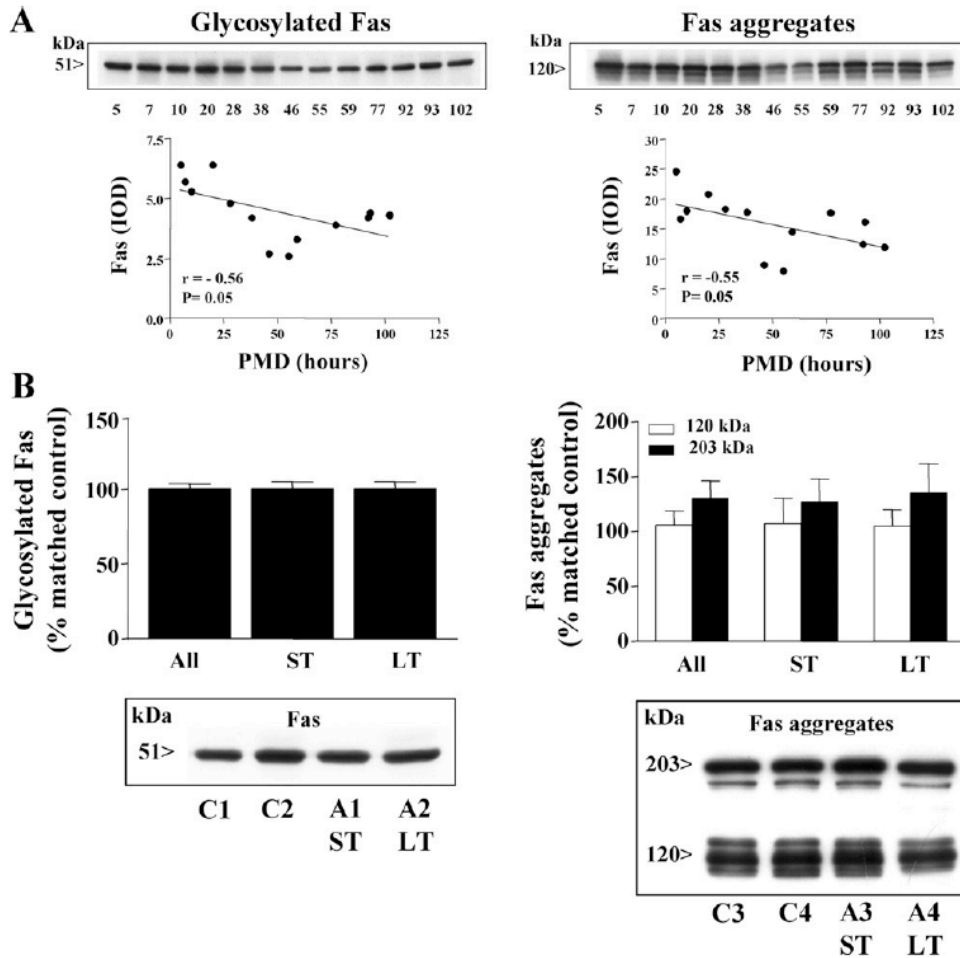


Fig. 1. (A) Representative immunoblots for the effect of PMD on the content of glycosylated Fas (~51 kDa, mature receptor form) and Fas receptor aggregates (~120 kDa, relevant forms in receptor signaling) in brains of healthy subjects (prefrontal cortex, Brodmann's area 9), and correlation analyses between PMD (5–102 h) and protein immunodensity expressed as IOD units (13 subjects: nine men, four women; age: 15–52 years). The experiment was repeated with similar results. (B) Immunodensities of glycosylated Fas and Fas receptor aggregates (120 kDa and 203 kDa) in the prefrontal cortex of opiate abusers (all addicts, $n=36$; ST, $n=15$; LT, $n=21$) as mean±S.E.M. (bars) percentages of the contents in matched controls. Bottom: representative immunoblots for Fas receptors forms in ST and LT opiate abusers (A1–A4) and matched controls (C1–C4): paired subjects 8, 22, 11, and 34 in Table 1. The molecular masses of Fas receptor forms were estimated from referenced standards.

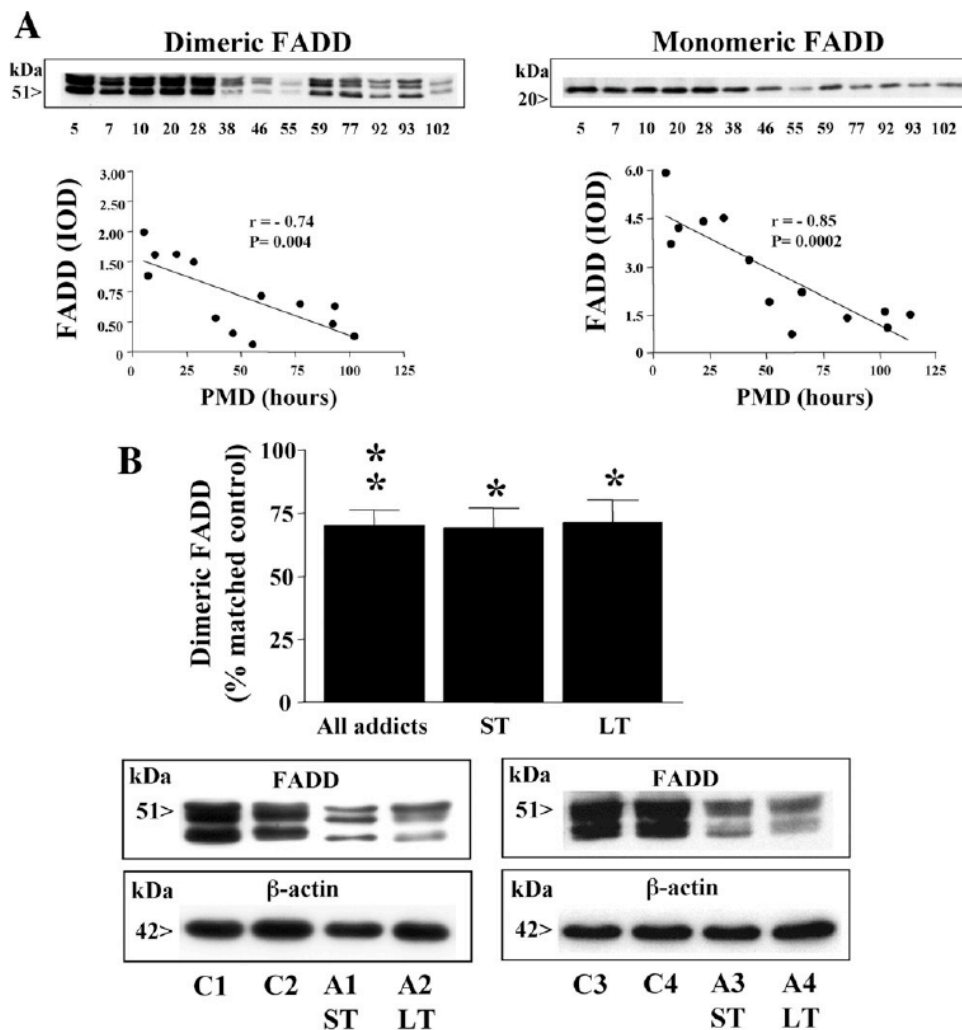


Fig. 2. (A) Representative immunoblots for the effect of PMD on the content of dimeric (~51 kDa) and monomeric (~23 kDa) FADD in brains of healthy subjects (see Fig. 1A for other details). (B) Immunodensity of dimeric FADD in the prefrontal cortex of opiate abusers (all addicts, $n=36$; ST, $n=15$; LT, $n=21$) as mean \pm S.E.M. (bars) percentages of the contents in matched controls. * $P<0.005$, ** $P<0.001$ when compared with the corresponding matched controls (one-sample t -test). Bottom: representative immunoblots for dimeric FADD and β -actin in ST and LT opiate abusers (A1, opiate abuser; A2, opiate and cocaine abuser; A3 and A4, opiate abusers) and matched controls (C1–C4): paired subjects 15, 32, 12, and 27 in Table 1. The molecular masses of FADD and β -actin were estimated from referenced standards.

Short- and long-term regulation of the extrinsic apoptotic pathway (Fas, FADD, caspase-8, FLIP_L) in the prefrontal cortex of opiate abusers

The immunodensities of Fas receptor forms (glycosylated receptor and Fas aggregates) in the prefrontal cortex of opiate abusers did not significantly differ from those quantified in age-, gender-, and PMD-matched controls (Fig. 1B). In addition, the contents of these Fas receptor forms were very similar in ST and LT opiate abusers (Fig. 1B). In contrast, FADD content (homodimeric form), the Fas adaptor for apoptotic signaling, was decreased in the same brain samples (all addicts: $30\pm 6\%$, $P<0.001$, $n=36$; ST: $31\pm 8\%$, $P<0.005$, $n=15$; LT: $29\pm 9\%$, $P<0.005$, $n=21$) (Fig. 2B). Significant decreases in FADD were observed in men ($22\pm 7\%$, $P<0.01$, $n=20$) and women ($38\pm 8\%$, $P<0.001$, $n=16$), with no significant difference between genders ($P>0.05$). In drug-free opiate abusers (i.e. no

drugs other than opiates detected in blood samples; Table 1) similar decreases in FADD were measured (all addicts: $37\pm 8\%$, $P<0.001$, $n=16$; ST: $40\pm 9\%$, $P<0.005$, $n=10$; LT: $31\pm 12\%$, $P=0.05$, $n=6$) (Fig. 2B, see immunoblot, right).

In these opiate abusers, the density of initiator caspase-8, which together with Fas and FADD conform the death-inducing signaling complex (DISC), was not different from that in matched controls, and no differences were quantified between ST and LT subjects (Fig. 3B). Notably, FLIP_L, a dominant-negative inhibitor of caspase-8 (Fig. 4A), was significantly increased in opiate abusers and especially in LT addicts (all addicts: $13\pm 4\%$, $P<0.01$, $n=35$; ST: $6\pm 6\%$, $P>0.05$, $n=15$; LT: $19\pm 5\%$, $P<0.01$, $n=20$) (Fig. 4C). In drug-free LT opiate abusers, similar subtle increases in FLIP_L content were quantified ($26\pm 16\%$, $P>0.05$, $n=6$).

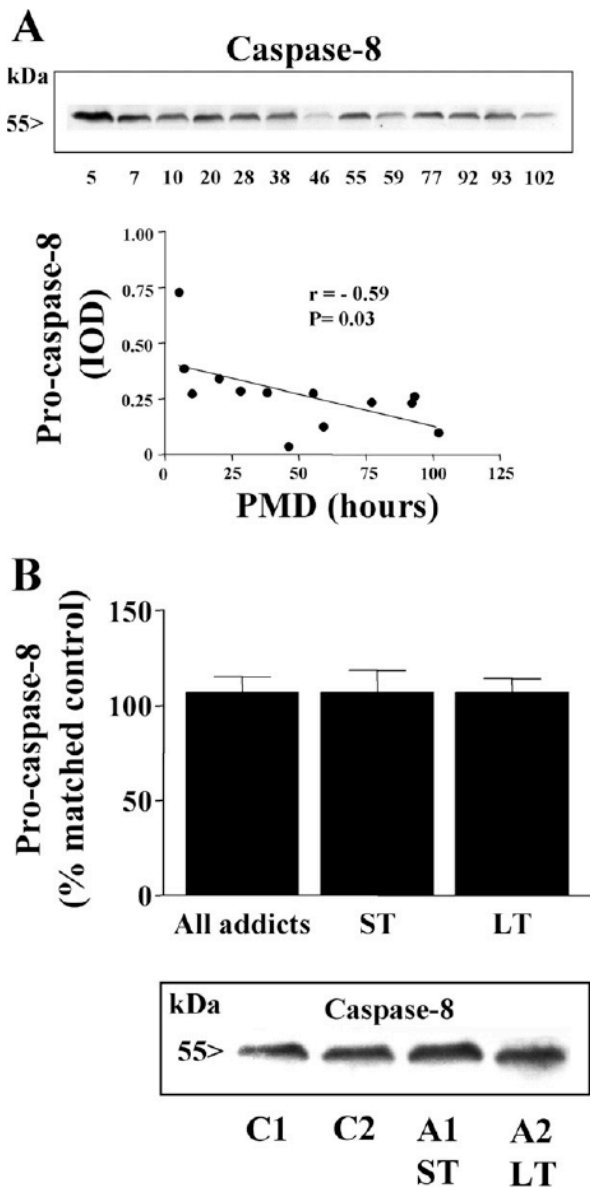


Fig. 3. (A) Representative immunoblot for the effect of PMD on the content of initiator caspase-8 (≈ 57 kDa) in brains of healthy subjects (see Fig. 1A for other details) (B) Immunodensities of caspase-8 in the prefrontal cortex of opiate abusers (all addicts, $n=36$; ST, $n=15$; LT, $n=21$) as mean \pm S.E.M. (bars) percentages of the contents in matched controls. Bottom: representative immunoblot for caspase-8 in ST and LT opiate abusers (A1–A2) and matched controls (C1–C2): paired subjects 13 and 26 in Table 1. The molecular mass of caspase-8 was estimated from referenced standards.

In an independent series of LT opiate addicts and matched controls (Table 2), the content of glycosylated Fas in the prefrontal cortex was slightly reduced ($12 \pm 7\%$, $P > 0.05$, $n=12$) and that of dimeric FADD significantly downregulated (Table 2). In this series of LT opiate addicts, the brain content of FADD was quantified with two anti-FADD antibodies, which measured similar decreases (Ab H-181: $28 \pm 5\%$, $P < 0.001$, $n=12$; Ab N-18: $25 \pm 6\%$, $P < 0.005$, $n=12$) (Table 2). The combined results for FADD (two independent series of experimental subjects)

clearly indicated that the content of this crucial adaptor protein of various death receptors was markedly reduced in the prefrontal cortex of LT opiate abusers (Ab H-181: $30 \pm 6\%$, $P < 0.001$, $n=33$).

Short- and long-term regulation of the intrinsic apoptotic pathway (Bcl-2, Bax, cytochrome c, AIF) in the prefrontal cortex of opiate abusers

The immunodensity of Bcl-2, an anti-apoptotic mitochondrial protein, was increased in the prefrontal cortex of opiate abusers compared with matched controls (all addicts: $17 \pm 7\%$, $P < 0.02$, $n=33$) (Fig. 5B). This increase in Bcl-2 was associated with LT ($24 \pm 8\%$, $P < 0.02$, $n=19$) but not ST ($7 \pm 10\%$, $P > 0.05$, $n=14$) opiate abuse (Fig. 5B). In drug-free LT opiate abusers, a similar increase in Bcl-2, although not significant, was quantified ($34 \pm 19\%$, $P > 0.05$, $n=6$). In these groups of opiate abusers (all addicts, ST and LT; including the subgroups of drug-free subjects), the density of pro-apoptotic Bax was not significantly altered (increases: 7 – 15% , $P > 0.05$) (Fig. 5D). In opiate abusers, the ratio of Bcl-2 to Bax (an index that measures the balance between cell survival and cell death; Oltvai et al., 1993; Korsmeyer et al., 1993) was close to unity (all addicts: $1.12 \pm 0.05\%$, $n=33$; ST: $1.09 \pm 0.08\%$, $n=14$; LT: $1.15 \pm 0.07\%$, $n=19$), indicating the absence of vulnerability to apoptosis. In drug-free LT opiate abusers, in contrast, a higher Bcl-2/Bax ratio was obtained (suggesting cell apoptosis lower than normal), although this ratio did not significantly differ from unity (LT: $1.31 \pm 0.18\%$, $P=0.14$, $n=6$).

Notably, the content of cytochrome c, a potent activator of caspases, was significantly reduced in the same brain samples of opiate abusers (all addicts: $25 \pm 5\%$, $P < 0.001$, $n=36$; ST: $31 \pm 6\%$, $P < 0.001$, $n=15$; LT: $20 \pm 7\%$, $P < 0.01$, $n=21$) (Fig. 6B). Significant decreases in cytochrome c were observed in men ($31 \pm 7\%$, $P < 0.001$, $n=20$) and women ($18 \pm 5\%$, $P < 0.005$, $n=16$), with no significant difference between genders ($P > 0.05$). In drug-free opiate abusers, the downregulation of cytochrome c was even greater (all addicts: $37 \pm 5\%$, $P < 0.0001$, $n=16$; ST: $38 \pm 7\%$, $P < 0.001$, $n=10$; LT: $36 \pm 5\%$, $P < 0.005$, $n=6$).

In all groups and subgroups of opiate abusers, the density of AIF, the main mitochondrial mediator of caspase-independent apoptosis, was not different from that measured in matched controls (increases: 2 – 5% , $P > 0.05$) (Fig. 7B).

Short- and long-term regulation of executioner caspase-3, and monitoring of apoptotic cell death, in the prefrontal cortex of opiate abusers

The content of pro-caspase-3, the principal executioner protease in mammals, was similar in the prefrontal cortex of opiate abusers and matched controls, and no differences were quantified between ST and LT addicts (increases: 2 – 16% , $P > 0.05$) (Fig. 8B). In these subjects, short- or long-term exposure to opiate drugs did not result in the activation of caspase-3, mainly because no proteolytic processing of the protease to its active fragment (20 kDa) was identified in the experiments (Fig. 8B).

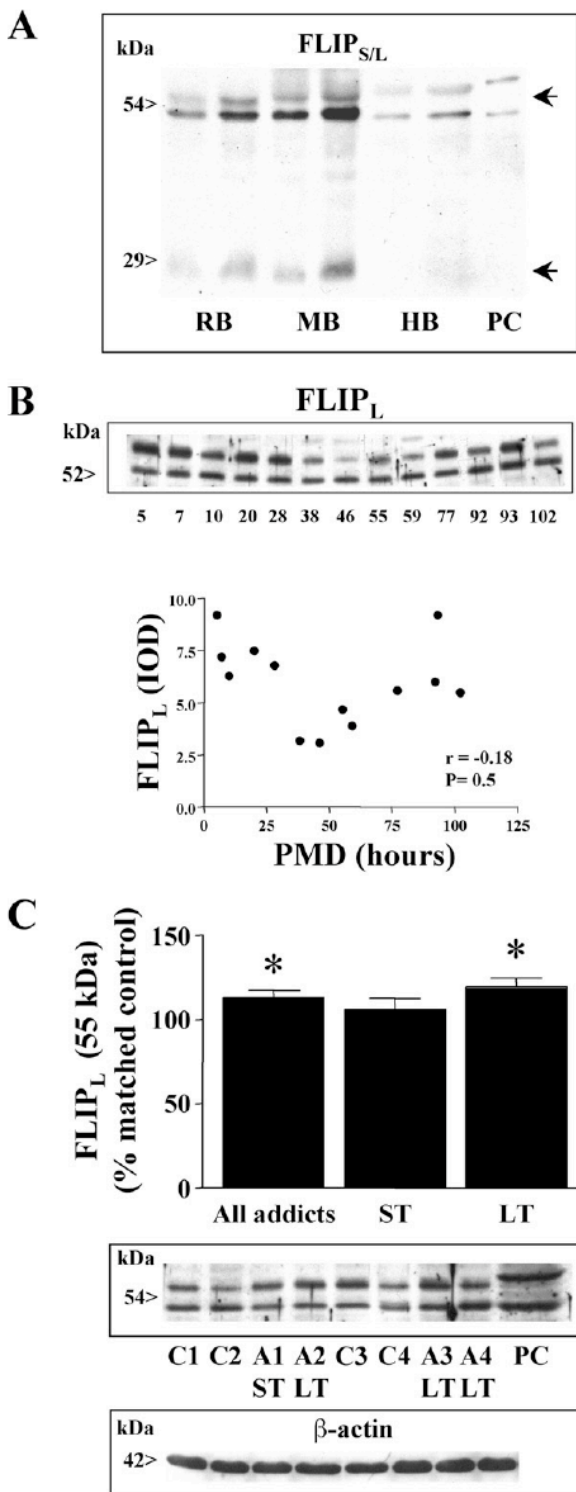


Fig. 4. (A) Immunodetection of FLIP_{S/L} in brain tissue (RB: rat cerebral cortex; MB: mouse cerebral cortex; HB: human prefrontal cortex; two samples of 30 and 45 μ g protein for each species. PC: positive control; Jurkat whole cell lysate (8 μ g protein). The arrows indicate the expression of FLIP_L (long form, \approx 55 kDa) and FLIP_S (short form, \approx 28 kDa) isoforms. (B) Representative immunoblot for the effect of PMD on the content of FLIP_L in brains of healthy subjects (see Fig. 1A for other details). (C) Immunodensity of FLIP_L in the prefrontal cortex of opiate abusers (all addicts, $n=35$; ST, $n=15$; LT, $n=20$) as mean \pm S.E.M.

A most important target of caspase-3 is the nuclear enzyme PARP-1. The proteolytic cleavage of PARP-1 is a process required for the normal progression of cell apoptosis. The pattern of PARP-1 cleavage in opiate abusers, including the subgroups of drug-free abusers, was very similar to that measured in control subjects (85 kDa PARP-1 fragment; controls: $40 \pm 2\%$, $n=27$; all addicts: $42 \pm 2\%$, $n=36$; ST: $38 \pm 3\%$, $n=15$; LT: $44 \pm 3\%$, $n=21$) (Fig. 9B). These negative results clearly indicated that executioner caspase-3 was not abnormally activated in the prefrontal cortex of ST and LT opiate abusers.

Influence of potential confounding variables

Variables such as heroin or methadone overdose, absence of opiate overdose (three subjects), plasma concentrations of opiates and the presence of ethanol or other drugs in blood and/or hair samples (cocaine, MDMA, THC; 11 polydrug abusers), as well as the possible influence of comorbidity (past diagnosis of major depressive disorder in three LT opiate abusers), did not significantly alter the reported results (data not shown). Moreover, the sex of opiate abusers did not modify the expression of pro- or anti-apoptotic proteins in the prefrontal cortex (see data for FADD and cytochrome c above; negative data for other proteins not shown).

In healthy subjects and opiate abusers, the brain content of β -actin (used as a loading control protein) was very similar (e.g. see Fig. 2), and the ratio of target protein to β -actin (e.g. normalization of FADD, FLIP_L, Bcl-2, and cytochrome c) did not significantly alter the reported results (data not shown; see comment in Experimental Procedures).

DISCUSSION

The results demonstrate that relevant pro-apoptotic proteins of the extrinsic (Fas receptor, FADD, initiator caspase-8) and intrinsic (Bax, cytochrome c, AIF) apoptotic pathways, which converge at the level of executioner caspases (e.g. caspase-3 as the main protease), are not upregulated in the prefrontal cortex of short- and long-term opiate abusers. In these chronic heroin or methadone abusers, on the contrary, the reduction of FADD (i.e. possible attenuation of Fas signals), the increases of FLIP_L and Bcl-2 (greater anti-apoptotic effects), the slightly increased Bcl-2/Bax ratio (positive balance for cell survival), the decrease of cytochrome c (lesser activation of other pro-apoptotic factors), the lack of abnormal caspase-3 activation, and the normal pattern of PARP-1 cleavage clearly indicated that these death pathways, after a possible short-lived up-regulation, have achieved a new steady-state (chronic adap-

(bars) percentages of the contents in matched controls. * $P < 0.01$ when compared with the corresponding matched controls (one-sample t -test). Bottom: representative immunoblots for FLIP_L and β -actin in ST and LT opiate abusers (A1–A4) and matched controls (C1–C4): paired subjects 13, 29, 35 and 36 in Table 1. PC: 62 μ g protein. The molecular masses of FLIP isoforms and β -actin were estimated from referenced standards.

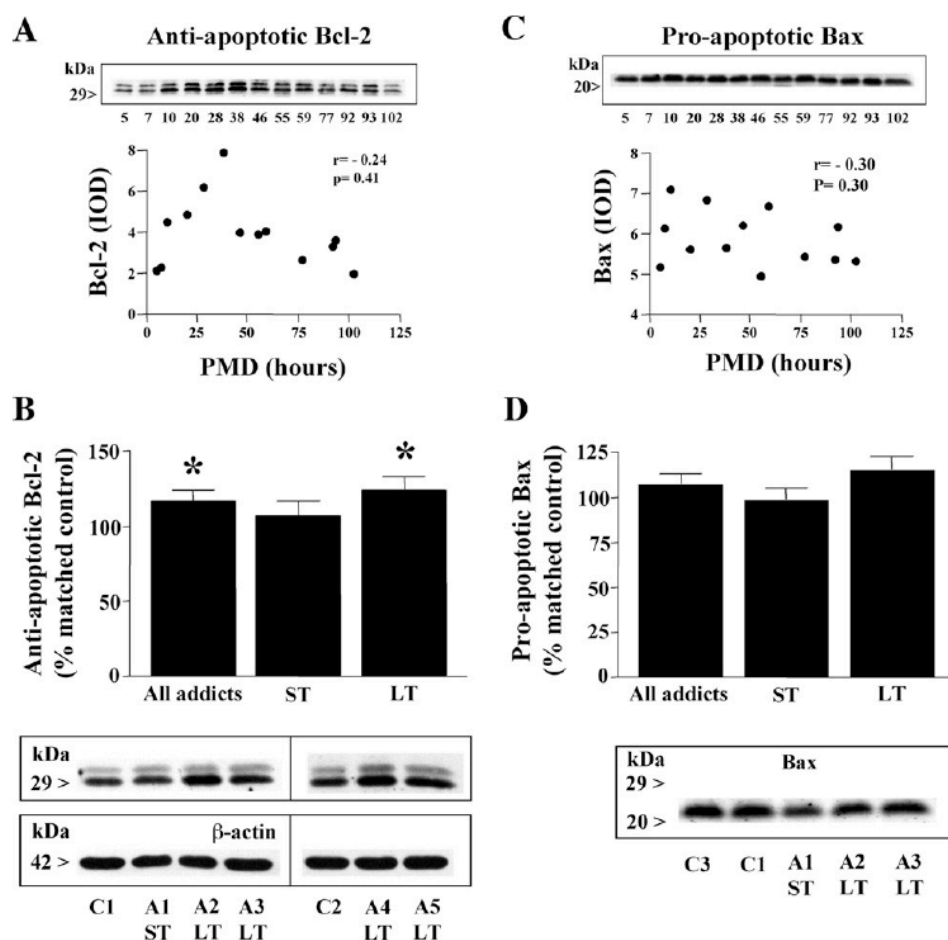


Fig. 5. (A, C) Representative immunoblots for the effect of PMD on the contents of Bcl-2 (≈ 29 kDa) and Bax (≈ 25 kDa) in brains of healthy subjects (see Fig. 1A for other details). (B, D) Immunodensities of Bcl-2 and Bax in the prefrontal cortex of opiate abusers (all addicts, $n=33-36$; ST, $n=14-15$; LT, $n=19-21$) as mean \pm S.E.M. (bars) percentages of the contents in matched controls. * $P < 0.02$ when compared with the corresponding matched controls (one-sample *t*-test). Bottom: representative immunoblots for Bcl-2, Bax, and β -actin in ST and LT opiate abusers (A1–A2, opiate abusers; A3–A5, opiate and cocaine abusers) and matched controls (C1–C3): paired subjects 15, 31, 32, 35 and 36 in Table 1. The molecular masses of Bcl-2, Bax, and β -actin were estimated from referenced standards.

tations) which could reflect the induction of anti-apoptotic or novel non-apoptotic actions. Therefore, it appears unlikely that the quantification of other pro-apoptotic signaling molecules (e.g. Fas ligand, FasL, and other effector caspases) in the prefrontal cortex of opiate abusers may result in abnormalities that could contradict the above conclusion. Thus, the contents of Fas receptor and Fas aggregates (important receptor forms for the extrinsic apoptotic signaling) were found unchanged in opiate abusers, indicating that any abnormal increase in the expression of FasL would be irrelevant taking into account the observed downregulation of FADD (anti-apoptotic effect), the indispensable adaptor molecule to convey Fas receptor signals. On the other hand, the apoptosome-bound caspase-9 (intrinsic pathway) cleaves and activates caspase-3 (reviewed in Kumar, 2007), but no activation of the principal executioner protease of both apoptotic pathways (caspase-3) was observed in the current study. Moreover, executioner caspase-7 is highly similar to caspase-3 and has similar substrate specificity, and caspase-6 does not seem to be essential for apoptosis in mammals (Kumar, 2007).

Fas receptor (including Fas aggregates) and associated proteins were shown to be upregulated by opiate drugs (acute, chronic, and/or withdrawal effects) in brain and spinal cord of laboratory animals (Boronat et al., 2001; Mao et al., 2002; García-Fuster et al., 2003, 2004; Pérez-San Emeterio et al., 2006; Tramullas et al., 2007). *In vitro* studies have also reported that street heroin (62% pure) can induce cell death by a mitochondrial-dependent pathway, which involved the release of cytochrome c and a marked activation of caspase-3 in rat cortical neurons (Cunha-Oliveira et al., 2007). This latter study also tested the effects of pure heroin, 6-MAM and morphine (100% pure compounds) on caspase-3 activity, but only heroin induced a slightly activation of this protease, which revealed that heroin adulterants were responsible for the induction of apoptosis in cortical neurons (Cunha-Oliveira et al., 2007). Therefore, the induction of neuronal death by heroin/morphine remains controversial (see Liao et al., 2005; Tramullas et al., 2008). Recently, treatments of rats with opiate drugs, and the induction of withdrawal after chronic opiate exposure, were associated with reductions

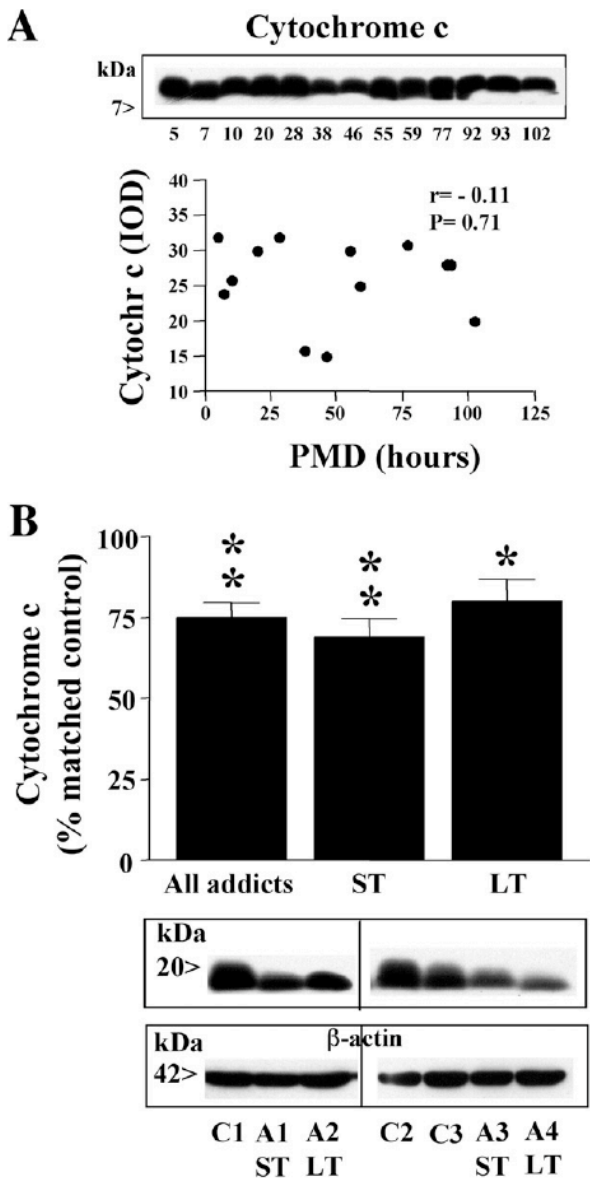


Fig. 6. (A) Representative immunoblot for the effect of PMD on the content of cytochrome c (≈ 15 kDa) in brains of healthy subjects (see Fig. 1A for other details). (B) Immunodensity of cytochrome c in the prefrontal cortex of opiate abusers (all addicts, $n=36$; ST, $n=15$; LT, $n=21$) as mean \pm S.E.M. (bars) percentages of the contents in matched controls. * $P < 0.01$; ** $P < 0.001$ when compared with the corresponding matched controls (one-sample t -test). Bottom: representative immunoblots for cytochrome c and β -actin in ST and LT opiate abusers (A1–A4) and matched controls (C1–C3); paired subjects 6, 20, 8 and 22 in Table 1 (subject 22 was an opiate and cocaine abuser). The molecular masses of cytochrome c and β -actin were estimated from referenced standards.

in the content of brain FADD through a mechanism involving the activation of anti-apoptotic extracellular signal-regulated kinase 1/2 signaling (García-Fuster et al., 2007). More recent studies have also reported a good correspondence between FADD mRNA and FADD protein in rat brain after focal cerebral ischemia (Bi et al., 2008) or exposure to a drug of abuse (García-Fuster et al., 2008a, in press). Thus, chronic cocaine and cocaine-withdrawal

were associated with concomitant decreases of FADD protein and FADD mRNA in the rat cerebral cortex (significant correlation), which indicated that the entire machinery controlling the synthesis of FADD, including both the transcriptional and post-transcriptional level, was downregulated in cocaine addiction (García-Fuster et al., 2008a, in press). In line with this finding, the marked reduction of

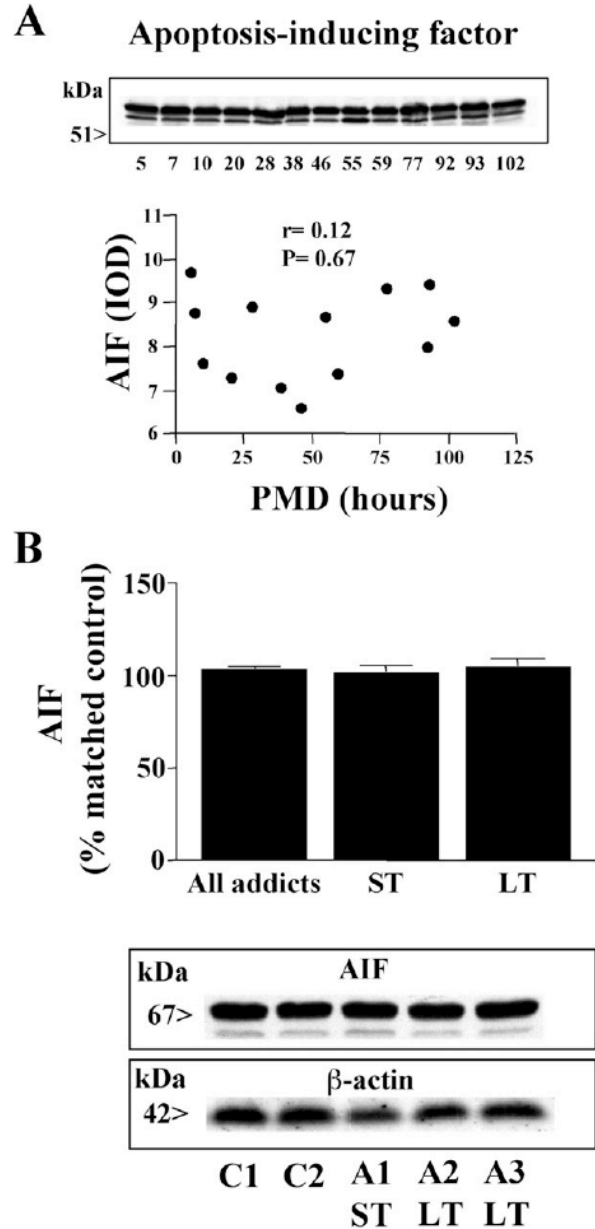


Fig. 7. (A) Representative immunoblot for the effect of PMD on the content of AIF (≈ 67 kDa) in brains of healthy subjects (see Fig. 1A for other details). (B) Immunodensity of AIF in the prefrontal cortex of opiate abusers (all addicts, $n=36$; ST, $n=15$; LT, $n=21$) as mean \pm S.E.M. (bars) percentages of the contents in matched controls. Bottom: representative immunoblots for AIF and β -actin in ST and LT opiate abusers (A1–A3) and matched controls (C1–C2); paired subjects 15, 31 and 32 in Table 1 (subject 32 was an opiate and cocaine abuser). The molecular masses of AIF and β -actin were estimated from referenced standards.

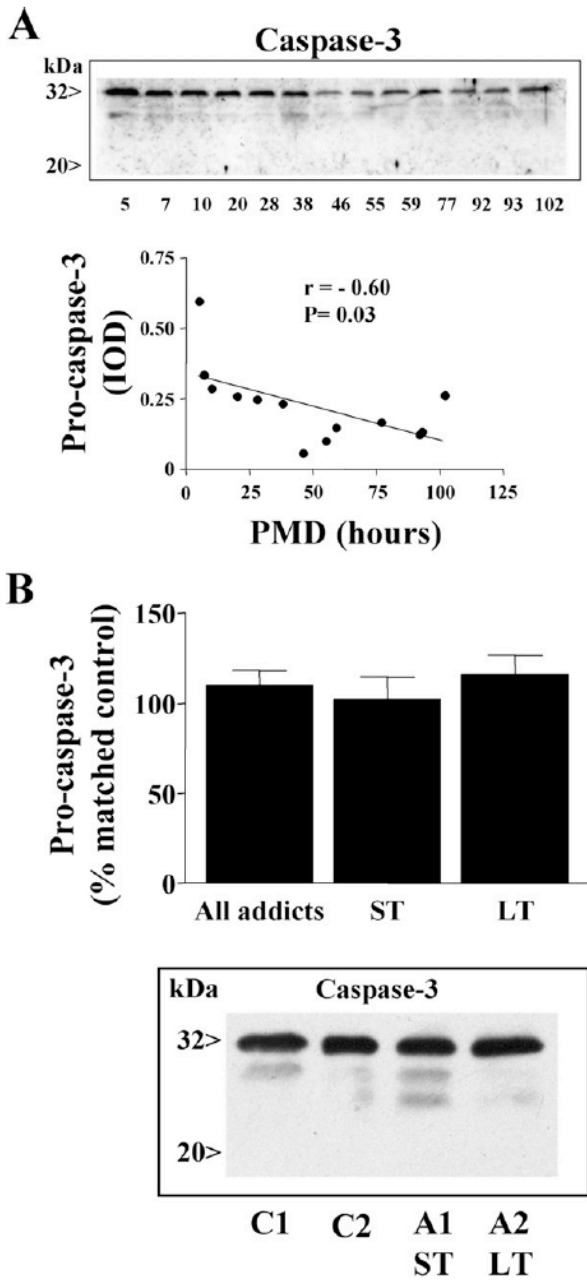


Fig. 8. (A) Representative immunoblot for the effect of PMD on the content of caspase-3 (≈ 32 kDa) in brains of healthy subjects (see Fig. 1A for other details). (B) Immunodensity of caspase-3 in the prefrontal cortex of opiate abusers (all addicts, $n=36$; ST, $n=15$; LT, $n=21$) as mean \pm S.E.M. (bars) percentages of the contents in matched controls. Bottom: representative immunoblot for caspase-3 in ST and LT opiate abusers (A1–A2) and matched controls (C1–C2): paired subjects 6 and 20 in Table 1. The molecular mass of caspase-3 was estimated from referenced standards.

FADD observed in the prefrontal cortex of heroin or methadone abusers (including those subjects also abusing of cocaine) could serve as an efficient contra-regulatory mechanism to minimize, or even counteract, possible apoptotic signals induced by Fas and other death receptors.

On the other hand, Fas activation does not always result in the induction of apoptosis because of its interplay

with powerful endogenous inhibitors of the extrinsic pathway, such as the protein FLIP (Tschopp et al., 1998; Peter and Kramer, 2003; Kataoka, 2005). FLIP is structurally related to caspase-8 but lacks its proteolytic activity, and, consequently, an increased expression of this factor can block the activity of the initiator caspase. FLIP is expressed as long (FLIP_L, most tissues including the brain) and short (FLIP_S, lymphatic tissue) isoforms (Kataoka, 2005). In the adult mouse brain FLIP_L is selectively expressed by neurons (Taoufik et al., 2007), and in the human brain only FLIP_L was readily detected in the prefrontal cortex (present

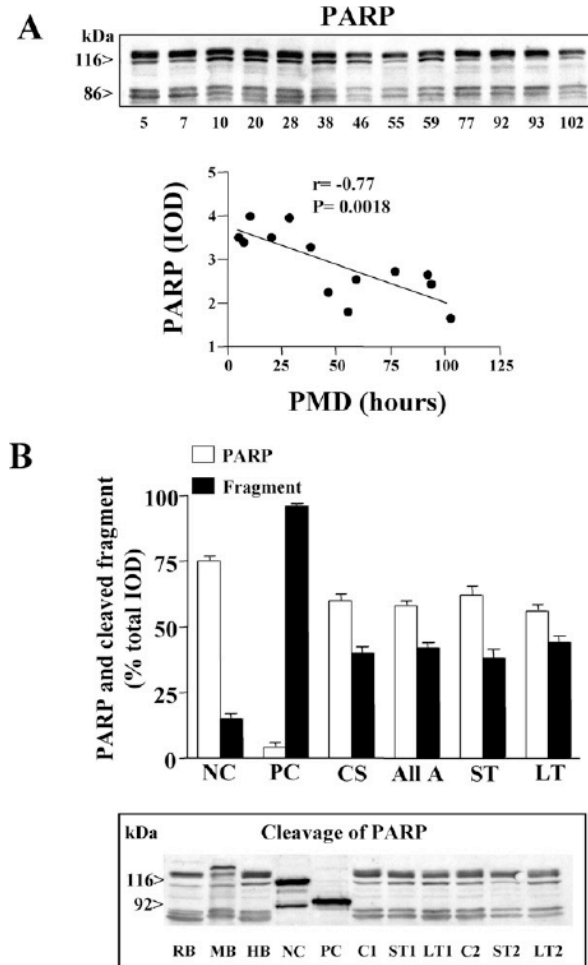


Fig. 9. (A) Representative immunoblot for the effect of PMD on the content of nuclear enzyme PARP-1 and cleaved fragment in brains of healthy subjects (see Fig. 1A for other details). (B) Immunodensities of PARP-1 (≈ 116 kDa) and its cleaved fragment (≈ 85 kDa) in the prefrontal cortex of control subjects (CS, $n=27$) and opiate abusers (all addicts, $n=36$; ST, $n=15$; LT, $n=21$) as mean \pm S.E.M. (bars) percentages of total immunodensity for each group (PARP-1 plus fragment), expressed as IOD units. Control samples included in the assay: NC (negative control, whole cell extract of human HL60 leukemia cells) and PC (positive control, etoposide-induced apoptosis in HL60 cells). Bottom: representative immunoblot for the pattern of PARP-1 cleavage in brain tissue (RB: rat cortex; MB: mouse cortex; HB: human cortex), cell samples (NC and PC), and the prefrontal cortex of ST and LT opiate abusers and matched controls (C1–C2): paired subjects 4 (ST1), 18 (LT1), 8 (ST2) and 22 (LT2) in Table 1 (subjects 18 and 22 were opiate and cocaine abusers). The molecular masses of PARP-1 and its fragment were estimated from referenced standards.

results). FLIP_L interacts with the death effector domain of FADD, thus inhibiting the recruitment and activation of caspase-8 in the DISC, and, consequently, this interaction interrupts death signals (Tschoop et al., 1998; Krueger et al., 2001). Notably, there was a subtle but significant increase in FLIP_L (with no change in caspase-8) in the prefrontal cortex of long-term opiate abusers, which might indicate the induction (together with the reduction of FADD) of additional anti-apoptotic actions. In fact, the neuron-specific overexpression of FLIP_L has been shown to reduce the size of lesion volume after ischemia in the cerebral cortex of transgenic mice (Taoufik et al., 2007), which demonstrates that this endogenous inhibitor of initiator caspase-8 can mediate neuroprotection in living animals.

In response to death signals many pro- and anti-apoptotic proteins of the intrinsic (mitochondrial) pathway are also activated (Burke, 2008). Relevant pro-apoptotic mechanisms in this pathway include the cytosolic release of cytochrome c, with the subsequent activation of effector caspases (see above, but caspase-3 as the main executioner protease in mammals; Kumar, 2007), and that of AIF, the main mitochondrial mediator of caspase-independent apoptosis (Reed, 1997; Walensky, 2006; Krantic et al., 2007; Burke, 2008). Briefly, caspase-3 is translocated to the nucleus where it cleaves the nuclear enzyme PARP-1, a hallmark of apoptosis (Putt et al., 2005; Garnett et al., 2006), and the nuclear activity of AIF also participates in DNA fragmentation (Krantic et al., 2007). Rat studies have shown upregulation in the content of some pro-apoptotic mitochondrial proteins (Bad, Bax) and caspase-3 in the CNS after prolonged opiate exposure (Mao et al., 2002; Tramullas et al., 2007, 2008). In other *in vivo* studies, however, acute and chronic morphine, as well as opiate withdrawal (spontaneous or precipitated with the antagonist naloxone), was not associated with alterations in the activation (i.e. proteolytic processing to active fragments) of initiator caspase-8 and executioner caspase-3 in the rat cerebral cortex (García-Fuster et al., 2007). Chronic morphine treatment, however, was also shown to induce a modest downregulation of anti-apoptotic Bcl-2 protein in rat cortex (Boronat et al., 2001) and spinal cord (Mao et al., 2002). In the present human post-mortem brain study, the contents of pro-apoptotic Bax and AIF were not upregulated in the prefrontal cortex of short-term or long-term opiate abusers. Notably, the content of cytochrome c was decreased and that of Bcl-2 increased in the same brain samples. Moreover, the ratio of Bcl-2 to Bax in the prefrontal cortex of chronic opiate abusers showed a clear tendency toward cell survival (Korsmeyer et al., 1993). In addition, opiate abusers did not show an increased cleavage of caspase-3 or PARP-1 (a nuclear enzyme involved in DNA repair, DNA stability, and transcriptional regulation) in the prefrontal cortex. Taken together, these data indicated that the mitochondrial apoptotic machinery and the final steps to execute apoptotic DNA damage are not abnormally activated in brain cortex of human opiate abusers, and that, on the contrary, the chronic adaptations of some components (Bcl-2, cytochrome c) rather suggest the engagement of a

molecular brake to counteract apoptotic actions in the intrinsic pathway.

The discrepancies between human and rat brain studies might be related to the great heterogeneity among human subjects, the time of opiate exposure, the marked degree of opiate tolerance in human addicts (with little reward of new opiate doses except relief of craving and withdrawal symptoms), and/or the way that opiates (heroin, methadone) are abused by humans (self-administration), which is clearly different to the low-dose regimen and spaced pattern of non-contingent opiate administration used in laboratory animals. Moreover, it is noteworthy that different pharmacokinetic–pharmacodynamic relationships for morphine have been reported in humans and rats, which may be due to species differences in opiate metabolism and/or brain penetration among other factors (Whiteside et al., 2008). In spite of these differences, it should be mentioned that the content of brain FADD, a most relevant protein of the extrinsic pathway, was found downregulated in short-term and long-term opiate abusers (current study) as well as in acute and chronic opiate-treated rats (García-Fuster et al., 2007). Therefore, the downregulation of FADD by opiate drugs is a relevant finding for the neurobiology of opiate addiction.

Finally, it is of interest to note that apoptotic proteins can also play important roles in mediating synaptic plasticity in the CNS (Gilman and Mattson, 2002; Mattson and Gleichmann, 2005; Jonas, 2006). Thus, Fas stimulation was shown to promote neurite outgrowth (Desbarats et al., 2003) and neuronal branching (Zuliani et al., 2006). Moreover, chronic morphine and methadone altered postsynaptic dendrite structure and spine density in rat cortical and hippocampal neurons (Liao et al., 2005, 2007; Ballesteros-Yáñez et al., 2007). Recently, morphine-induced locomotor sensitization (a model of synaptic plasticity) was associated with modulation of total and phosphorylated FADD in rat brain (Ramos-Miguel et al., 2007; García-Fuster et al., 2008b). Furthermore, rats selectively bred for a differential propensity to drug abuse (novelty, drug-seeking and cocaine sensitization) showed basal differences in the expression of FADD compared with control animals, and novelty-induced locomotion in high- and low-responder rats correlated with FADD content in the cerebral cortex (García-Fuster et al., 2008a, in press). This emerging evidence indicates that the so-called apoptotic proteins induce additional non-apoptotic (neuroplastic) actions in the CNS.

CONCLUSION

In conclusion, opiate addiction in humans, at least in the large series of addicts investigated in the present post-mortem brain study, is not associated with alterations of the extrinsic and intrinsic apoptotic pathways that could suggest higher rates of cell death in the prefrontal cortex, a brain region that mediates the rewarding (and possibly some plastic) effects of opiates and other drugs of abuse.

Acknowledgments—This study was supported by grant SAF2008-01311 (MICINN and FEDER, Madrid, Spain) and grant 2007I032 (Plan Nacional sobre Drogas, MSC, Madrid) to J.A.G.-S. The

research was also funded, in part, by Red Temática de Investigación Cooperativa en Salud (RETICS, Instituto de Salud Carlos III, MSC and FEDER, Madrid): Red de Trastornos Adictivos, Grupo RD06/001/003 (J.A.G.-S.), and Centro de Investigación Biomédica en Red sobre Salud Mental (CIBERSAM), Grupo CB07/09/0008 (J.J.M.). A.R.-M. was supported by a predoctoral fellowship from MEC (Madrid), and G.R. by a predoctoral fellowship from the Basque Government (Vitoria). We thank Dr. Ph. Huguélet (Department of Psychiatry, University of Geneva) for help with the medical diagnoses, and Mr. A. Davison and Ms. E. Marco for excellent technical assistance. J. A. García-Sevilla is a member of the Institut d'Estudis Catalans (Barcelona, Catalonia, Spain).

REFERENCES

- Ammon S, Mayer P, Riechert U, Tischmeyer H, Höllt V (2003) Microarray analysis of genes expressed in the frontal cortex of rats chronically treated with morphine and after naloxone precipitated withdrawal. *Mol Brain Res* 112:113–125.
- Ballesteros-Yáñez I, Ambrosio E, Benavides-Piccione R, Pérez J, Torres I, Miguéns M, García-Lecumberri C, De Felipe J (2007) The effects of morphine self-administration on cortical pyramidal cell structure in addiction-prone Lewis rats. *Cereb Cortex* 17:238–249.
- Bi FF, Xiao B, Hu YQ, Tian FF, Wu ZG, Ding L, Zhou XF (2008) Expression and localization of Fas-associated proteins following focal cerebral ischemia in rats. *Brain Res* 1191:30–38.
- Boronat MA, García-Fuster MJ, García-Sevilla JA (2001) Chronic morphine induces up-regulation of the pro-apoptotic Fas receptor and down-regulation of the anti-apoptotic Bcl-2 oncoprotein in rat brain. *Br J Pharmacol* 134:1263–1270.
- Boumba VA, Zivrou KS, Vougiouklakis T (2006) Hair as a biological indicator of drug use, drug abuse or chronic exposure to environmental toxicants. *Int J Toxicol* 25:143–163.
- Burke RE (2008) Programmed cell death and new discoveries in the genetics of parkinsonism. *J Neurochem* 104:875–890.
- Cunha-Oliveira T, Rego AC, Garrido J, Borges F, Macedo T, Oliveira CR (2007) Street heroin induces mitochondrial dysfunction and apoptosis in rat cortical neurons. *J Neurochem* 101:543–554.
- Dargusch R, Piasecki D, Tan S, Liu Y, Schubert D (2001) The role of Bax in glutamate-induced nerve cell death. *J Neurochem* 76:295–301.
- Desbarats J, Birge RB, Minouni-Rongy M, Weistein DE, Palerme JS, Newell MK (2003) Fas engagement induces neurite growth through ERK activation and p35 upregulation. *Nat Cell Biol* 5:118–125.
- Engidawork E, Gulesserian T, Yoo BC, Cairns N, Lubec G (2001) Alteration of caspases and apoptosis-related proteins in brains of patients with Alzheimer's disease. *Biochem Biophys Res Comm* 281:84–93.
- Everitt BJ, Hutcheson DM, Ersche KD, Pelloux Y, Dalley JW, Robbins TW (2007) The orbital prefrontal cortex and drug addiction in laboratory animals and humans. *Ann N Y Acad Sci* 1121:576–597.
- Ferrer-Alcón M, La Harpe R, Guimón J, García-Sevilla JA (2003) Downregulation of neuronal cdk5/p35 in opioid addicts and opiate-treated rats: Relation to neurofilament phosphorylation. *Neuropsychopharmacology* 28:947–955.
- Ferrer-Alcón M, García-Fuster MJ, La Harpe R, García-Sevilla JA (2004) Long-term regulation of signalling components of adenylyl cyclase and mitogen-activated protein kinase in the pre-frontal cortex of human opiate addicts. *J Neurochem* 90:220–230.
- Fugelstad A, Ahlner J, Brandt L, Ceder G, Eksborg S, Rajs J, Beck O (2003) Use of morphine and 6-monoacetylmorphine in blood for the evaluation of possible risk factors for sudden death in 192 heroin users. *Addiction* 98:463–470.
- Fuster JM (2001) The prefrontal cortex—An update: Time is of the essence. *Neuron* 30:319–333.
- García-Fuster MJ, Ferrer-Alcón M, Miralles A, García-Sevilla JA (2003) Modulation of Fas receptor proteins and dynamin during opiate addiction and induction of opiate withdrawal in rat brain. *Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol* 368:421–431.
- García-Fuster MJ, Ferrer-Alcón M, Miralles A, García-Sevilla JA (2004) Deglycosylation of Fas receptor and chronic morphine treatment up-regulate high molecular mass Fas aggregates in the rat brain. *Eur J Pharmacol* 496:63–69.
- García-Fuster MJ, Miralles A, García-Sevilla JA (2007) Effects of opiate drugs on Fas-associated protein with death domain (FADD) and effector caspases in the rat brain: Regulation by the ERK1/2 MAP kinase pathway. *Neuropsychopharmacology* 32:399–411.
- García-Fuster MJ, Clinton SM, Watson SJ, Akil H (2008a) Effect of cocaine on Fas-associated protein with death domain (FADD) in the rat brain: Individual differences in a model of differential vulnerability to drug abuse. *Neuropsychopharmacology*, in press. doi:10.1038/npp.2008.88.
- García-Fuster MJ, Ramos-Miguel A, Miralles A, García-Sevilla JA (2008b) Opioid receptor agonists enhance the phosphorylation state of Fas-associated death domain (FADD) protein in the rat brain: Functional interactions with casein kinase α , G α i proteins, and ERK1/2 signaling. *Neuropharmacology, Neuropharmacol* 55:886–899.
- García-Sevilla JA, García-Fuster MJ, Davidson A, Rivero G, La Harpe R, Meana JJ (2007) Regulation of the apoptotic machinery in the prefrontal cortex of human opioid abusers. *Eur Neuropsychopharmacol* 17 (Suppl 4):S553–S554.
- Garnett TO, Filippova M, Duerksen-Hughes PJ (2006) Accelerated degradation of FADD and procaspase 8 in cells expressing human papilloma virus 16 E6 impairs TRAIL-mediated apoptosis. *Cell Death Differ* 13:1915–1926.
- Gilman CP, Mattson MP (2002) Do apoptotic mechanisms regulate synaptic plasticity and growth-cone motility? *Neuromol Med* 2:197–213.
- Goldberger BA, Cone EJ, Grant T, Caplan YH, Levine BS, Smialek JE (1994) Disposition of heroin and its metabolites in heroin-related deaths. *J Anal Toxicol* 18:22–28.
- Grange-Midroit M, García-Sevilla JA, Ferrer-Alcón M, La Harpe R, Walzer C, Guimón J (2002) G protein-coupled receptor kinases, β -arrestin-2 and associated regulatory proteins in the human brain: postmortem changes, effect of age and subcellular distribution. *Mol Brain Res* 101:39–51.
- Gruber SA, Silveri MM, Yurgelun-Todd DA (2007) Neuropsychological consequences of opiate use. *Neuropsychol Rev* 17:299–315.
- Hardy JA, Wester P, Winblad B, Gezelius C, Bring G, Eriksson A (1985) The patients dying after long terminal phase have acidotic brains: Implications for biochemical measurements on autopsy tissue. *J Neural Transm* 61:253–264.
- Jonas E (2006) BCL-xl regulates synaptic plasticity. *Mol Interv* 6:208–222.
- Kalivas PW, O'Brien C (2008) Drug addiction as a pathology of staged neuroplasticity. *Neuropsychopharmacology* 33:166–180.
- Kataoka T (2005) The caspase-8 modulator c-FLIP. *Crit Rev Immunol* 25:31–58.
- Korsmeyer SJ, Shutter JR, Veis DJ, Merry DE, Oltvai ZN (1993) Bcl-2/Bax: a rheostat that regulates an anti-oxidant pathway and cell death. *Semin Cancer Biol* 4:327–332.
- Krantic S, Mechawar N, Reix S, Quirino R (2007) Apoptosis-inducing factor: A matter of neuron life and death. *Prog Neurobiol* 81:179–196.
- Krueger A, Schmitz I, Baumann S, Krammer PH, Kirchhoff S (2001) Cellular FLICE-inhibitory protein splice variants inhibit different steps of caspase-8 activation at the CD95 death-inducing signaling complex. *J Biol Chem* 276:20633–20640.
- Kumar S (2007) Caspase function in programmed cell death. *Cell Death Differ* 14:32–43.
- Li JZ, Wawter MP, Walsh DM, Tomita H, Evans SJ, Choudary PV, Lopez JF, Avelar A, Shokoohi V, Chung T, Mesarwi O, Jones EG,

- Watson SJ, Akil H, Bunney WE Jr, Myers RM (2004) Systematic changes in gene expression in postmortem human brains associated with tissue pH and terminal medical conditions. *Hum Mol Genet* 13:609–616.
- Liao D, Lin H, Law PY, Loh HH (2005) Mu-opioid receptors modulate the stability of dendritic spines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:1725–1730.
- Liao D, Grigoriants OO, Wang W, Wiens K, Loh HH, Law PY (2007) Distinct effects of individual opioids on the morphology of spines depend upon the internalization of mu opioid receptors. *Mol Cell Neurosci* 35:456–469.
- Lyoo IK, Pollack MH, Silveri MM, Ahn KH, Diaz CI, Hwang J, Kim SJ, Yurgelun-Todd DA, Kaufman MJ, Renshaw PF (2006) Prefrontal and temporal gray matter density decreases in opiate dependence. *Psychopharmacology* 184:139–144.
- Mao J, Sung B, Ji RR, Lim G (2002) Neuronal apoptosis associated with morphine tolerance: Evidence for an opioid-induced neurotoxic mechanism. *J Neurosci* 22:7650–7661.
- Marie-Claire C, Courtin C, Roques BP, Noble F (2004) Cytoskeletal genes regulation by chronic morphine treatment in rat striatum. *Neuropsychopharmacology* 29:2208–2215.
- Mattson MP, Gleichmann M (2005) The neuronal death protein Par-4 mediates dopaminergic synaptic plasticity. *Mol Interv* 5:278–281.
- Merrill J, Garvey T, Rosson C (1996) Methadone concentrations taken as indicating deaths due to overdose need to be reviewed. *BMJ* 313:1481.
- Miller EK, Cohen JD (2001) An integrative theory of prefrontal cortex function. *Annu Rev Neurosci* 24:167–202.
- Morón JA, Abul-Husn NS, Rozenfeld R, Dolios G, Wang R, Devi LA (2007) Morphine administration alters the profile of hippocampal postsynaptic density-associated proteins. *Mol Cell Proteom* 6:29–42.
- Motulsky H (1995) *Intuitive biostatistics*. New York: Oxford University Press.
- Nutt D, King LA, Saulsbury W, Blakemore C (2007) Development of a rational scale to assess the harm of drugs of potential misuse. *Lancet* 369:1047–1053.
- Oltvai ZN, Milliman CL, Korsmeyer SJ (1993) Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* 74:609–619.
- Pérez-San Emeterio E, Tramullas M, Hurlé MA (2006) Modulation of apoptosis in the mouse brain after morphine treatments and morphine withdrawal. *J Neurosci Res* 83:1352–1361.
- Perret G, Déglon JJ, Kreek MJ, Ho A, La Harpe R (2000) Lethal methadone intoxications in Geneva, Switzerland, from 1994 to 1998. *Addiction* 95:1647–1653.
- Peter ME, Krammer PH (2003) The CD95 (APO-1/Fas) DISC and beyond. *Cell Death Differ* 10:26–35.
- Pezawas LM, Fischer G, Diamant K, Schneider C, Schindler SD, Thurnher M, Ploechl W, Eder H, Kasper S (1998) Cerebral CT findings in male opioid-dependent patients: stereological, planimetric and linear measurements. *Psychiatry Res* 83:139–147.
- Preece P, Cairns NJ (2003) Quantifying mRNA in postmortem human brain: influence of gender, age at death, postmortem interval, brain pH, agonal state and inter-lobe mRNA variance. *Mol Brain Res* 118:60–71.
- Pujol ML, Cirimele V, Tritsch PJ, Villain M, Kintz P (2007) Evaluation of the IDS One-Step™ ELISA kits for the detection of illicit drugs in hair. *Forensic Sci Int* 170:189–192.
- Putt KS, Beilman GJ, Hergenrother PJ (2005) Direct quantitation of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) activity as a means to distinguish necrotic and apoptotic death in cell and tissues samples. *Chembiochem* 6:53–55.
- Ramos-Miguel A, Miralles A, García-Sevilla JA (2007) Morphine-induced locomotor sensitization increases FADD phosphorylation in rat brain. *Eur Neuropsychopharmacol* 17 (Suppl 4):S251–S252.
- Reed JC (1997) Cytochrome c: Can't live with it—Can't live without it. *Cell* 91:559–562.
- Repetto MR, Repetto M (1997) Habitual, toxic, and lethal concentrations of 103 drugs of abuse in humans. *Clin Toxicol* 35:1–9.
- Sastry PS, Rao KS (2000) Apoptosis and the nervous system. *J Neurochem* 74:1–20.
- Schoenbaum G, Shaham Y (2008) The role of orbitofrontal cortex in drug addiction: A review of preclinical studies. *Biol Psychiatry* 63:256–262.
- Stan AD, Ghose S, Gao XM, Roberts RC, Lewis-Amezcuea K, Hatanpaa KJ, Tamminga CA (2006) Human postmortem tissue: What quality markers matter? *Brain Res* 1123:1–11.
- Taoufik E, Valable S, Müller GJ, Roberts ML, Divoux D, Tinel A, Voulgari-Kokota A, Tseveleki V, Altruda F, Lassmann H, Petit E, Probert L (2007) FLIP_L protects neurons against in vivo ischemia and in vitro glucose deprivation-induced cell death. *J Neurosci* 27:6633–6646.
- Tegeer I, Geisslinger G (2004) Opioids as modulators of cell death and survival—unraveling mechanisms and revealing new indications. *Pharmacol Rev* 56:351–369.
- Tewari M, Quan LT, O'Rourke K, Desnoyers S, Zeng Z, Beidler DR, Poirier GG, Salvesen GS, Dixit VM (1995) Yama/CPP32 beta, a mammalian homolog of CED-3, is a CrmA-inhibitable protease that cleaves the death substrate poly(ADP-ribose) polymerase. *Cell* 81:801–809.
- Tramullas M, Martínez-Cué C, Hurlé MA (2007) Chronic methadone treatment and repeated withdrawal impair cognition and increase the expression of apoptosis-related proteins in mouse brain. *Psychopharmacology* 193:107–120.
- Tramullas M, Martínez-Cué C, Hurlé MA (2008) Chronic administration of heroin to mice produces up-regulation of brain apoptosis-related proteins and impairs spatial learning and memory. *Neuropharmacology* 54:640–652.
- Tschopp J, Irmiler M, Thome M (1998) Inhibition of Fas death signals by FLIPs. *Curr Opin Immunol* 10:552–558.
- Volkow ND, Fowler JS, Wang GJ (2003) The addicted human brain: insights from imaging studies. *J Clin Invest* 111:1444–1451.
- Walensky LD (2006) BCL-2 in the crosshairs: tipping the balance of life and death. *Cell Death Differ* 13:1339–1350.
- Walhovd KB, Moe V, Slinning K, Due-Tønnessen P, Bjørnerud A, Dale AM, van der Kouwe A, Quinn BT, Kosofsky B, Greve D, Fischl B (2007) Volumetric cerebral characteristics of children exposed to opiates and other substances in utero. *Neuroimage* 36:1331–1344.
- Whiteside GT, Adedoyin A, Leventhal L (2008) Predictive validity of animal pain models? A comparison of the pharmacokinetic-pharmacodynamic relationship for pain drugs in rats and humans. *Neuropharmacology* 54:767–775.
- Williams JT, Christie MJ, Manzoni O (2001) Cellular and synaptic adaptations mediating opioid dependence. *Physiol Rev* 81:299–343.
- Yücel M, Lubman DI, Harrison BJ, Fornito A, Allen NB, Wellard RM, Roffel K, Clarke K, Wood SJ, Forman SD, Pantelis C (2007) A combined spectroscopic and functional MRI investigation of the dorsal anterior cingulate region in opiate addiction. *Mol Psychiatry* 12:691–702.
- Zuliani C, Kleber S, Klussmann S, Wenger T, Kenzelmann M, Schrenglimm N, Martínez A, del Río JA, Soriano E, Vodrazka P, Kuner R, Groene HJ, Herr I, Krammer PH, Marín-Villalba A (2006) Control of neuronal branching by the death receptor CD95 (Fas/Apo-1). *Cell Death Differ* 13:31–40.

Material complementario (Artículo II)

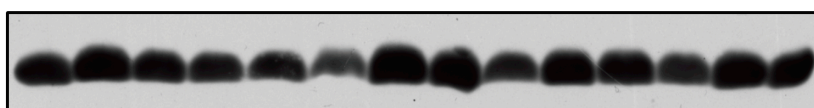
Variables potencialmente conflictivas en estudios post mórtem

A pesar de su gran valor, los estudios en tejido cerebral post mórtem presentan algunas variables poco o nada controlables que son despreciables o completamente evitables en estudios en los que se emplean animales de laboratorio. Como ya se ha demostrado, la influencia del retraso autopsico (PMD) sobre las proteínas cerebrales, y de manera especial sobre los grupos fosfato de las proteínas, es de gran magnitud. Esta variable que amenaza la fiabilidad de los resultados fue evitada, como se ha discutido anteriormente, emparejando a los adictos con sujetos control que presentaron un PMD muy similar y, en la segunda parte del estudio, excluyendo a todos los sujetos con un PMD superior a las 40 horas. Del mismo modo, adictos y controles fueron emparejados en función de su edad (véase en el apartado metodológico correspondiente), otra variable que podría influir sobre la expresión basal de las proteínas cerebrales (González-Maeso et al., 2002). Por tanto, no es esperable que ninguna de estas dos variables pudiera haber sesgado los resultados presentados en este estudio.

Variabilidad entre los controles

Algunas de las proteínas implicadas en los fenómenos apoptóticos evaluadas en este trabajo no mostraron sensibilidad a la degradación post mórtem. La comparación de los contenidos de estas proteínas en la corteza prefrontal demostró que la variabilidad no es muy elevada entre los sujetos control, una prueba más de la calidad de estas muestras cerebrales. Por ejemplo, la variabilidad del citocromo c entre los 27 individuos controles incluidos en el estudio fue de un 6%. En la figura S2-1 se muestra un ejemplo en el que se analizaron 14 de estos 27 sujetos.

Citocromo c en PFC/BA 9 de sujetos control (n=14)



Muestra	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11	C12	C13	C14	$X_c \pm SEM$
IOD	12,3	16,1	11,6	10,1	9,9	6,1	18,4	16,2	9,1	14,6	13,8	9,6	15,2	12,5	$12,5 \pm 0,9$
% X_c	99	128	93	80	79	49	147	129	72	117	110	76	121	99	100 ± 7

Figura S2-1. Autorradiograma representativo y cálculo de la variabilidad de los contenidos en la corteza prefrontal del citocromo c entre 14 de los 27 sujetos control incluidos en el estudio.

ARTÍCULO III

Título Phosphorylation of FADD (Fas-associated death domain protein) at serine 194 is increased in the prefrontal cortex of opiate abusers: relation to mitogen activated protein kinase, phosphoprotein enriched in astrocytes of 15 kDa, and Akt signaling pathways involved in neuroplasticity

Autores Ramos-Miguel A, García-Fuster MJ, Callado LF, La Harpe R, Meana JJ, García-Sevilla JA

Revista Neuroscience, 2009; 161: 23-38

Resumen

FADD es una proteína multifuncional capaz de actuar tanto en la señalización apoptótica como en procesos no-apoptóticos. Recientemente ha sido descrita una reducción de FADD en la corteza prefrontal de consumidores de opiáceos, sugiriendo una atenuación de la señalización apoptótica a través de los receptores de muerte. Se ha sugerido que la fosforilación de FADD en la serina 194 regula las actividades no apoptóticas de esta proteína, la cual podría participar en la inducción de neuroplasticidad en el contexto de la adicción a opiáceos. En este estudio en cerebro humano post mórtem se ha evaluado el estado de fosforilación de FADD en la serina 194 (p-FADD), así como otras vías clásicamente implicadas en la neuroplasticidad que podrían coordinar la señalización no-apoptótica de FADD, en la corteza prefrontal de una cohorte de consumidores de heroína o metadona de corto (ST) y largo (LT) plazo. En estos individuos, el contenido del monómero de p-FADD se halló marcadamente incrementado, en comparación con los sujetos sanos con quienes fueron emparejados en función del sexo, la edad y el PMD. A nivel subcelular, esta sobre-expresión se observó acentuada en la fracción nuclear, donde fue principalmente inmunodetectada. La forma oligomérica de p-FADD se encontró incrementada en el citosol y reducida en el núcleo, motivo por el cual no se hallaron alteraciones en homogenado total. En los adictos LT, se observó una reducción significativa (en homogenado total y en los compartimentos subcelulares) de ERK1/2, JNK1/2, Akt1 y PEA-15, pero no de p38. En conjunto, los resultados sugieren que la adicción a opiáceos está asociada a un desequilibrio en el balance homeostático entre FADD (reducido) y su forma fosforilada (incrementada) que puede promover cambios adaptivos en la corteza prefrontal de estos individuos. La interacción entre

p-FADD y las vías de las MAPKs, posiblemente a través de Akt1/PEA-15, podría jugar un papel relevante en la mediación de fenómenos de plasticidad estructural y conductual.

PHOSPHORYLATION OF FADD (Fas-ASSOCIATED DEATH DOMAIN PROTEIN) AT SERINE 194 IS INCREASED IN THE PREFRONTAL CORTEX OF OPIATE ABUSERS: RELATION TO MITOGEN ACTIVATED PROTEIN KINASE, PHOSPHOPROTEIN ENRICHED IN ASTROCYTES OF 15 kDa, AND Akt SIGNALING PATHWAYS INVOLVED IN NEUROPLASTICITY

A. RAMOS-MIGUEL,^a M. J. GARCÍA-FUSTER,^{a,1}
L. F. CALLADO,^b R. LA HARPE,^c J. J. MEANA^b
AND J. A. GARCÍA-SEVILLA^{a*}

^aLaboratorio de Neurofarmacología, IUNICS, Universitat de les Illes Balears, and Red Temática de Investigación Cooperativa en Salud (Trastornos Adictivos), Cra. Valldemossa km 7.5, E-07122 Palma de Mallorca, Spain

^bDepartamento de Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad del País Vasco, and Centro de Investigación Biomédica en Red sobre Salud Mental (CIBERSAM), E-48940 Leioa, Bizkaia, Spain

^cCentre Universitaire Romand de Médecine Légale—Site Genève, Faculté de Médecine, Université de Genève, Avenue de Champel 9, CH-1211 Genève 4, Switzerland

Abstract—Fas-associated protein with death domain (FADD) is a multifunctional protein that can induce both apoptotic and non-apoptotic actions. Recently, FADD was found downregulated in the prefrontal cortex of opiate abusers, which suggested an attenuation of Fas death signals in human addicts. Phosphorylation of FADD (Ser194) has been reported to regulate its non-apoptotic activity, which might include the induction of neuroplastic effects in the brain. This postmortem brain study examined the status of phosphorylated (p)-Ser194 FADD and signaling pathways involved in neuroplasticity in the prefrontal cortex (BA 9) of short-term (ST) and long-term (LT) heroin or methadone abusers. In these subjects, the content of monomeric p-FADD was significantly increased when compared with that in age-, gender-, and postmortem delay-matched controls (all addicts: 65%, $n=26$; ST abuse: 51%; $n=11$; LT abuse: 75%, $n=15$). Oligomeric p-FADD forms were modestly increased (11%–23%). At the subcellular level, opiate addiction upregulated the expression of monomeric p-FADD in the nucleus (110%)

¹ Present address: The Molecular and Behavioral Neuroscience Institute, University of Michigan, Ann Arbor, MI 48109-0720, USA.

*Corresponding author. Tel: +34-971-173148; fax: +34-971-173184. E-mail address: jesus.garcia-sevilla@uib.es (J. A. García-Sevilla).

Abbreviations: CK1 α , casein kinase 1 α ; CPP, conditioned place preference; DED, death effector domain; ERK, extracellular signal-regulated kinase; FADD, Fas-associated protein with death domain; Fas, apoptosis 1 protein; GFAP, glial fibrillary acidic protein; IOD, integrated optical density; JNK, c-Jun NH₂-terminal protein kinase or stress-activated protein kinase (SAPK); LT, long-term abuse; MAM, 6-monoacetylmorphine; MAPK, mitogen-activated protein kinase; NF-L, neurofilament-L; p, phosphorylated; PAR-4, nuclear protein prostate apoptosis response 4; PEA-15, phosphoprotein enriched in astrocytes of 15 kDa; PKC, protein kinase C; PMD, postmortem delay; p-NF-H, neurofilament of high molecular weight; p38 MAPK, p38 kinase of 38 kDa; SDS-PAGE, sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis; ST, short-term abuse; UIB, University of the Balearic Islands; VTA, ventral tegmental area.

0306-4522/09 \$ - see front matter © 2009 IBRO. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.
doi:10.1016/j.neuroscience.2009.03.028

and that of p-oligomers in the cytosol (66%). In LT opiate addicts (but not ST abusers), a pronounced downregulation of p-extracellular signal-regulated kinase (ERK)1/2 (52%) and p-c-Jun NH₂-terminal protein kinase (JNK)1/2 (51%), but not p-p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK), was quantified in the prefrontal cortex (total homogenate and subcellular compartments). Similarly, the signaling pathway mediated by p-phosphoprotein enriched in astrocytes of 15 kDa (PEA-15) protein and its phosphorylating kinase p-Akt1 was also downregulated in cortical homogenate (43% and 41%, respectively) and cytosolic preparations of chronic opiate addicts. The results indicate that opiate addiction in humans is associated with an altered balance between p-Ser194 FADD (increased) and total FADD (decreased) in brain, which may favor its neuroplastic actions. The interaction between p-FADD (upregulated) and neuronal pathways (downregulated) could play a relevant role in mediating specific forms of structural and behavioral neuroplasticity. © 2009 IBRO. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

Key words: opiate addiction, postmortem human brain, p-Ser194 FADD, MAP kinases, PEA-15, Akt kinase, neuroplasticity.

Over the last decade, the distinct processes of addiction to drugs of abuse are being investigated as specific forms of drug-induced neural plasticity, and much attention has been focused on the genetic, cellular, molecular and behavioral mechanisms underlying the induced changes in brain function (Kalivas and O'Brien, 2008; Thomas et al., 2008). Thus, opiate addiction in humans can be approached as a form of neuroplasticity, in which the lasting and aberrant adaptations in the brain would play major roles in the development of the principal features of this chronic medical disorder: opiate tolerance and dependence, behavioral sensitization, and compulsive drug use that underlines the long persistence of relapse risk in the addicted person (Hyman, 2005; Christie, 2008). In this context, chronic morphine exposure in rats resulted in structural changes of neurons compatible with the induction of synaptic plasticity (Sklair-Tavron et al., 1996; Robinson and Kolb, 1999; Spiga et al., 2003; Liao et al., 2005; Ballesteros-Yáñez et al., 2007). Although some signaling pathways have been associated with morphine-induced changes in neuronal size, synaptic connectivity and behavioral plasticity (e.g. Mazzucchelli et al., 2002; Girault et al., 2007; Russo et al., 2007), increasing evidences indicate that proteins of the apoptotic

pathways can also play relevant roles in promoting various forms of synaptic plasticity (Gilman and Mattson, 2002; Mattson and Gleichmann, 2005; Mattson, 2007).

Fas-associated protein with death domain (FADD) was first identified as an adaptor molecule that mediates the apoptotic signaling of apoptosis 1 protein (Fas) receptor (Chinnaiyan et al., 1995; Scott et al., 2009). Besides the regulation of apoptosis, the Fas/FADD complex was subsequently shown to have additional and important roles in promoting cell growth and differentiation (Park et al., 2005; Valmiki and Ramos, 2009), as well as in mediating non-apoptotic signals in the central nervous system (Reich et al., 2008). Notably, the canonical apoptotic pathways are not abnormally activated in the prefrontal cortex of long-term human opiate addicts (García-Fuster et al., 2008b). In contrast, the chronic adaptations of some pro- and antiapoptotic proteins (e.g. downregulation of FADD) suggested the induction of non-apoptotic (neuroplastic) actions in brains of opiate addicts (García-Fuster et al., 2008b). A relevant feature of human FADD is the presence, outside its death domain, of a serine residue (Ser194) whose phosphorylation, mediated by casein kinase 1 α (CK1 α ; Gross and Anderson, 1998), is crucial for its non-apoptotic action (Zhang et al., 2004; Alappat et al., 2005). Interestingly, opiate drugs were recently shown to stimulate FADD phosphorylation in the rat brain (García-Fuster et al., 2008a), which may favor the non-apoptotic (neuroplastic) effects of this multifunctional protein.

Several signaling pathways could link opioid receptors and phosphorylated (p)-FADD to induce changes in neural plasticity. Thus the best-known mitogen-activated protein kinases (MAPKs), including extracellular signal-regulated kinases (ERKs) (ERK1/2), c-Jun NH₂-terminal protein kinases (JNK1/2/3), and p38 kinase of 38 kDa (p38 MAPK), which can regulate cell growth and apoptotic death (Boutros et al., 2008). Although some actions of Fas/FADD were mediated through the activation of ERK (Desbarats et al., 2003; García-Fuster et al., 2007), the stimulation of brain p-FADD by a δ -opioid receptor agonist was not dependent on ERK activation (García-Fuster et al., 2008a). Other studies have implicated ERK1/2 and p38 MAPKs in the modulation of various forms of synaptic plasticity (Derkinderen et al., 1999; Thomas and Haganir, 2004), including the neuroplastic changes induced by drugs of abuse (Girault et al., 2007).

Besides, other signaling pathways could be involved in the modulation of p-FADD by opiate drugs (García-Fuster et al., 2008a). Like FADD, phosphoprotein enriched in astrocytes of 15 kDa (PEA-15; Araujo et al., 1993; reviewed in Ramos, 2008) is a cytosolic death effector domain (DED)-containing protein (without enzymatic activity) also expressed in mature neurons (Sharif et al., 2004). PEA-15 can block receptor-activated apoptosis by binding to other DED-molecules such as FADD and caspase-8 (Kitsberg et al., 1999), a process that requires its phosphorylation (Trencia et al., 2003). In turn, non-p PEA-15 can regulate the ERK pathway by sequestering the kinase in the cytosol and thus preventing its nuclear effects (Formstecher et al., 2001; Renganathan et al., 2005). The kinase Akt is a critical regulator of cell survival and proliferation (Song et al., 2005) and a new signaling system for some receptors (Beau-

lieu et al., 2007). Activation of Akt1 induces the phosphorylation of PEA-15 at Ser116 and thus promotes its antiapoptotic action (Trencia et al., 2003). Previous studies reported that the stimulation of μ -opioid receptors activates Akt1 (Ser473) *in vitro* (Polakiewicz et al., 1998), and that chronic morphine induces downregulation of p-Ser473 Akt1 in rat dopaminergic neurons (Muller and Unterwald, 2004; Russo et al., 2007). However, the role of PEA-15 in opiate addiction has not been investigated. This topic is important in the postulated involvement of ERK and Akt signaling pathways in mediating tolerance to morphine reward in mice and rats (Girault et al., 2007; Russo et al., 2007).

The prefrontal cortex (Fuster, 2001; Miller and Cohen, 2001) is a region of especial interest in opiate addiction because it plays an important role in cognitive control over drug intake (Moghaddam and Homayoun, 2008), and also because it is directly related with the meso-corticolimbic dopaminergic system that mediates the rewarding and addictive properties of opiates (Volkow et al., 2003; Everitt et al., 2007; Schoenbaum and Shaham, 2008). The right part of the prefrontal cortex (Brodmann's area 9, middle frontal gyrus) was selected for examination to keep in line with previous studies on the regulation of opioid receptors and associated molecular mechanisms of opiate addiction in humans (e.g. Escribá et al., 1994; Ozaita et al., 1998; Meana et al., 2000; Ferrer-Alcón et al., 2003, 2004; García-Fuster et al., 2008b). The functions specifically associated with the right or left prefrontal cortex are still a matter of debate (Fuster, 2001). In the context of opiate addiction, symmetric reductions in gray matter have been reported in the prefrontal cortex (Brodmann's areas 8–10) of opiate-dependent subjects (Lyo et al., 2006). It is worth noting, however, that dopamine release in the right medial prefrontal cortex, but not in the left part, was shown to correlate with morphine self-administration rates during the acquisition phase of dependence in rats (Glick et al., 1992).

Against this background, the aims of this study were (1) to quantify the content of p-Ser194 FADD (protein form associated with non-apoptotic actions) in the prefrontal cortex of short-term and long-term opiate abusers, (2) to assess the status of classic (MAPKs) and new (PEA-15 and Akt kinase) signaling pathways (mediators of neuroplasticity) in brains of opiate abusers, and (3) to investigate functional interactions between FADD and these neuronal pathways in human opiate addiction. A preliminary report of this study was given at the 21st European College of Neuropsychopharmacology (ECNP) Congress (Ramos-Miguel et al., 2008).

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Subject selection and specimens of postmortem prefrontal cortex

The demographic characteristics and relevant data on drug toxicology (blood and hair samples) of opiate abusers and matched controls included in this study are shown in Table 1. These subjects were selected from a larger cohort of opiate abusers/controls whose individual features, including detailed toxicology, have been reported in a previous study (García-Fuster et al., 2008b). The main criterion to select this group of paired subjects (Table 1) was the presence of a short postmortem delay (PMD, time period

Table 1. Demographic characteristics and toxicological data of opiate abusers and matched controls

Groups and subgroups	Sex	Age (years)	PMD (hours)	Total blood opiates ($\mu\text{g/ml}$)	Hair opiates (ng/mg)
Control subjects ($n=21$)	15 M/6 F	35 \pm 2.1	22 \pm 2.8	None	None
All opiate abusers ($n=26$)	16 M/10 F	35 \pm 1.6	23 \pm 2.8	Mor (0.58 \pm 0.11) Met (0.75 \pm 0.19)	
ST opiate abusers ($n=11$)	9 M/2 F	34 \pm 2.6	23 \pm 3.8	Mor (0.67 \pm 0.17) Met (0.75 \pm 0.48)	None
LT opiate abusers ($n=15$)	7 M/8 F	36 \pm 2.0	22 \pm 4.2	Mor (0.50 \pm 0.15) Met (0.75 \pm 0.19)	MAM (0.2–20) Mor (0.2–5) Met (0.4–135)

The cause of death of opiate abusers (except three subjects) was an accidental overdose of heroin [detection of MAM and free morphine (Mor) in blood] or methadone (Met, detection of Met and its metabolite 2-ethylidine-1,5-dimethyl-3,3-diphenylpyrrolidone in blood). Short-term (ST) opiate abusers were ex-opiate addicts or naive subjects who had no recent history of opiate abuse. Long-term (LT) opiate abusers had a history of chronic opiate addiction. Control subjects were healthy matched controls without a drug-taking history. Sex: M, male; F, female. See Experimental Procedures (Subject selection) for further toxicological details.

from death to the storage of the brain specimen; mean value: 23 h), which allowed the accurate quantification of very sensitive p forms of MAPKs in the human brain (see below). Brain specimens were collected in the "Centre Universitaire Romand de Médecine Légale–Site Genève" (1999–2004), following all the legal and ethical standard procedures (see García-Fuster et al., 2008b). The experiments were performed in the "Laboratorio de Neurofarmacología–IUNICS," University of the Balearic Islands (UIB), after formal approval of the study from the local Ethical Committee of Clinical Investigation (CEIC) and in accordance with the guidelines of the UIB.

Specimens of the right prefrontal cortex (BA 9) were collected from 26 well-characterized opiate abusers who had died of an accidental heroin or methadone overdose (Perret et al., 2000; Rehm et al., 2005), except three subjects (Table 1; see García-Fuster et al., 2008b for criteria of opiate abuse). Quantitative analysis of opiates, cocaine, and other drugs was mainly carried out on blood and hair samples at the Toxicology Unit (STS 390, Swiss Testing, University of Geneva, Geneva, Switzerland) by means of radioimmunoassay with subsequent gas chromatography/mass spectrometry confirmation (Table 1). In opiate abusers, blood toxicology showed the presence of fatal concentrations of opiate drugs (Perret et al., 2000). Hair toxicology (Ferrer-Alcón et al., 2004; Boumba et al., 2006) was performed to obtain an indication of opiate exposure over the last several months and up to 2 years (for further details see García-Fuster et al., 2008b). In 15 opiate abusers, detection of 6-monoacetylmorphine (MAM), morphine or methadone in hair samples indicated a long-term abuse (LT) of opiates (6–24 months before death; subgroup LT). In eight of these chronic opiate abusers, cocaine was also detected in hair (range: 0.9–40 ng/mg) but not in blood (except marginal residues in two subjects), which indicated a continued exposure to opiates with past psychostimulant abuse (polydrug abusers). In 11 opiate abusers, hair screening did not reveal the presence of opiates, cocaine or other drugs, indicating a short-term abuse (ST), if any, of opiates or cocaine in these subjects (<2 weeks or non-tolerant ex-addicts; subgroup ST) (Table 1).

Control brain samples were obtained from 21 healthy subjects dying in the same period of time and who met the following criteria for the inclusion in the study (Table 1): sudden and unexpected death; appropriate PMD, age and gender to match one or two subjects in the opiate abuser subgroups; absence of history of drug abuse, ethanol dependence or neuropsychiatric disorder; and negative toxicological screening. Other minor toxicological details (opiate abusers and matched controls), as well as various indicators of the good tissue quality of the postmortem human brain samples used in this study, have been previously reported (García-Fuster et al., 2008b).

For all subjects, the specimens of prefrontal cortex were carefully dissected to include only gray matter (less than 1-mm

white matter border was included). In preliminary experiments, white matter from the same brain region of two control subjects was also collected for qualitative comparison with the expression of some proteins in gray matter. Marked abnormalities of the cerebral white matter (i.e. axonal damage with concomitant microglial activation) have been reported in polydrug abusers, with opiate drugs as the most frequently abused substances (Büttner et al., 2006, and other references therein).

Standard preparation of brain samples

Human prefrontal cortex samples (total homogenate) were prepared for Western blot analysis of proteins as described previously (García-Fuster et al., 2008b). For routine experiments, the samples (175–300 mg of gray matter) were homogenized (1:15, wt/vol) in cold 50 mM Tris–HCl buffer, pH 6.8, containing 1 mM EDTA, 2% SDS, various protease inhibitors (1.3 mM pepabloc, 10 $\mu\text{g/ml}$ of each leupeptin, pepstatin A and antipain, and 5 $\mu\text{g/ml}$ E-64) and two phosphatase inhibitors (1 mM cantharidin and 1 mM sodium orthovanadate). Aliquots of this mixture were combined with solubilization loading buffer [50 mM Tris–HCl (pH 6.8), 1.5% SDS, 10% glycerol, 2.5% β -mercaptoethanol and 0.1% Bromophenol Blue] to reach a final protein concentration of 3 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Protein concentration was determined by the bicinchoninic acid method using a commercial assay kit from Pierce Chemical Company (Rockford, IL, USA), with bovine serum albumin as a standard. Then the mixtures were denatured (boiled for 5 min) and stored at -80°C until their use in assays involving sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS–PAGE) and protein immunodetection.

Subcellular fractionation experiments

The subcellular distribution of target proteins in the human prefrontal cortex was investigated as described previously in the rat brain (García-Fuster et al., 2007, 2008a). These experiments were performed using samples (about 100 mg) from two healthy subjects (female, 30 years old, PMD 15 h; male, 44 years old, PMD 16 h; comparison of gray and white matter), and five pairs of LT opiate abuser/matched control (opiate abusers: two females, 35/36 years old, PMD 12/8 h; three males, 34/42/50 years old, PMD 3/5/28 h; controls: female/male, 29–52 years old, PMD 8–28 h), who were selected as representative chronic opiate addicts once the assays in total homogenate were performed. Briefly, protein localization in the different compartments was monitored by use of the Subcellular Proteome Extraction Kit (ProteoExtract, Calbiochem, Darmstadt, Germany) and the non-Interfering Protein Assay Kit (Calbiochem), following the manufacturer instructions. Finally, the samples were prepared for SDS–PAGE and Western blot analysis (15 μg protein). This sequential extraction method is based on the different solubility of proteins in certain

Table 2. Antibodies used for the detection and quantification of target proteins in the human brain

Protein	Antigen	Host	Antibody	Batch	Company
p-FADD	Human p-FADD (peptide containing p-Ser194)	Rabbit	sc-12439-R	C072	Santa Cruz, USA
p-FADD	Human p-FADD (peptide containing p-Ser194)	Goat	sc-12439	I0304	Santa Cruz
FADD	Human FADD (28–208 residues)	Rabbit	sc-5559	J-2004	Santa Cruz
CK1 α	Human CK1 α (C-terminal residues)	Goat	sc-6477	K2305	Santa Cruz
p-ERK1/2	Human p44 MAPK (peptide containing p-Thr202/Tyr204)	Rabbit	9101	20	Cell Signaling, USA
ERK1/2	Human p42 MAPK (synthetic peptide)	Rabbit	442704	D33075	Calbiochem, FRG
p-JNK1/2	Human JNK (peptide containing p-Thr183/Tyr185)	Rabbit	9251	10	Cell Signaling
JNK1/2	Human JNK2 (GST fusion protein)	Rabbit	9252	6	Cell Signaling
p-p38 MAPK	Human p38 (peptide containing p-Thr180/Tyr182)	Rabbit	9211	16	Cell Signaling
p38 MAPK	Human p38 (synthetic peptide)	Rabbit	9212	9	Cell Signaling
p-PEA-15	Human PEA 15 (peptide containing p-Ser116)	Rabbit	44–836 G	0103	BioSource, Inc., USA
PEA-15	Human PEA 15 (peptide containing Leu60)	Rabbit	2780	1	Cell Signaling
p-Akt1	Mouse Akt1 (peptide containing p-Ser473)	Rabbit	9271	10	Cell Signaling
Akt1	Human Akt1, α -isoform (88–100 residues)	Rabbit	530311	D35774	Calbiochem
Stathmin	Human stathmin (peptide containing Ser38)	Rabbit	3352	1	Cell Signaling
Fas	Mouse Fas receptor (C-terminal residues)	Rabbit	sc-716	F1306	Santa Cruz
PAR-4	Rat nuclear protein PAR-4 (1–334 residues)	Mouse	sc-1666	J-305	Santa Cruz
NF-L	Porcine spinal cord	Mouse	5139 NR4	086K4823	Sigma Chemical, USA
p-NF-H	Human NF-H (C-terminal p epitopes)	Mouse	SMI-31R	14,815,001	Covance, USA
GFAP	Porcine spinal cord	Mouse	GFAP-GA5	C02601	Novocastra Laboratories, USA
β -actin	Human β -actin (2–16 residues)	Mouse	A1978 AC-15	016K4817	Sigma Chemical

subcellular compartments to yield four sub-proteomes enriched in cytosolic (F1, cytosolic fraction), membrane and membrane organelle-localized (F2, membrane fraction), soluble and DNA-associated nuclear (F3, nuclear fraction), and cytoskeletal (F4, cytoskeletal fraction) proteins. The efficiency and selectivity of this subcellular extraction procedure have been reported (García-Fuster et al., 2007, 2008a), and in the present study it was assessed by the immunodetection of stathmin in F1, Fas receptor in F2, nuclear protein prostate apoptosis response 4 (PAR-4) in F3, and neurofilament-L (NF-L) or neurofilament of high molecular weight (p-NF-H) (neuronal markers) in F4. Glial fibrillary acidic protein (GFAP) was used a specific marker of astrocytes.

Immunodetection of monomeric and oligomeric p-Ser194 FADD forms in human brain: FADD dephosphorylation and induction of FADD oligomers

The specificity of anti-p-Ser194 FADD antibodies (Table 2) was assessed essentially as described for the rat brain (García-Fuster et al., 2008a). Briefly, a sample of prefrontal cortex (175 mg) from a healthy subject (female, 30 years old, PMD 15 h) was homogenized as above but without EDTA that was replaced by 2 mM MgCl₂. Aliquots of total homogenate were incubated in the absence (control) or presence of calf intestinal mucosa alkaline phosphatase (95 U, Product 79390, Sigma-Aldrich, Heidelberg, Germany). Some samples containing the enzyme were also incubated with 100 mM sodium pyrophosphate (inhibited control). The enzymatic reaction was terminated by the addition of sodium pyrophosphate (100 mM) to control and alkaline phosphatase samples. In some experiments, the antigenic peptide (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA, sc-12439-P) was preincubated in excess with the antiserum to block the binding of the antibody. Finally, the samples were prepared for SDS-PAGE and Western blot analysis (40 μ g protein). In the human prefrontal cortex, as previously reported in the rat brain (García-Fuster et al., 2008a), oligomeric p-Ser194 FADD forms were resistant to SDS and β -mercaptoethanol denaturing conditions (see Salahpour et al., 2003).

In other experiments, copper-induced aggregation of monomeric p-Ser194 FADD to oligomeric p-forms in the human pre-

frontal cortex was assessed as described for other proteins (Bisani et al., 2008) with some modifications. Briefly, aliquots of total homogenate (without EDTA) were incubated (30 min at 30 °C) in the absence or presence of Cu²⁺ ion (100 μ M; copper sulfate Sigma-Aldrich) to aggregate FADD *in vitro* by chemical manipulation. This low concentration of copper does not cause the precipitation of proteins and it is likely to exist in normal tissues (Linder and Goode, 1991).

Effect of PMD on the stability of p proteins in the human brain

To assess the effect of PMD on the densities of p-Ser194 FADD, CK1 α , p-MAPKs (ERK1/2, JNK1/2 and p38 MAPK), p-PEA-15 and p-Akt1, including in all experiments the content of total enzymes or proteins, an independent series of samples (prefrontal cortex) from healthy subjects (six men, four women) with different PMDs (range 10–93 h) was used. These subjects were recruited as above (see healthy control subjects), including in all cases a negative screening for ethanol in blood samples.

SDS-PAGE and Western blot analysis

The content of target proteins was quantified by Western blot analysis as described previously (Ferrer-Alcón et al., 2004; García-Fuster et al., 2007, 2008a). Brain proteins (40 μ g of total homogenate; 15 μ g of each subcellular fraction) were resolved by electrophoresis (80–120 V for \approx 100 min) on 10% SDS-PAGE minigels (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Proteins were electrotransferred (110 A for 2.5 h at 4 °C) from the gels to nitrocellulose membranes using a Power Pac HC Device (Bio-Rad). The membranes were incubated in phosphate-buffered saline (PBS for total proteins) or in Tris-buffered saline (TBS for p proteins) containing 5% non-fat dry milk, 0.1%–0.2% Tween 20, and 0.5% bovine serum albumin to block nonspecific protein-binding sites (blocking solution) for at least 1 h. Then, the membranes were incubated overnight at 4 °C with each primary antibody of interest (1:1000–1:10,000 dilutions), and, after washing, the blots were developed with peroxidase-conjugated secondary antibodies (antirabbit, anti-goat or antimouse IgG; 1:5000–10,000 dilutions) for 1 h at 24 °C. After the final wash, blots were sub-

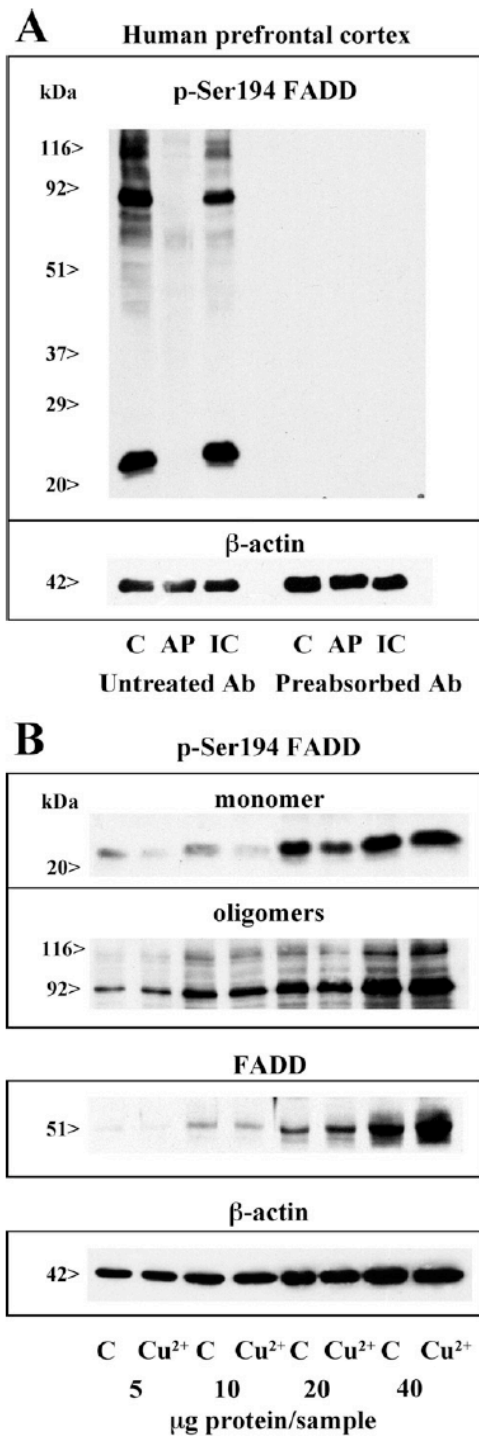


Fig. 1. (A) Representative autoradiograms of Western blots depicting labeling of monomeric (≈ 23 kDa) and oligomeric (≈ 116 and 92 kDa) p-Ser194 FADD species in the human prefrontal cortex (BA 9), and the effects of protein enzymatic dephosphorylation and antibody-peptide competition. C, control samples; AP, alkaline phosphatase; IC, inhibited control. The amount of protein loaded on the gel was $40 \mu\text{g}$ for all samples (see Experimental Procedures). (B) Effect of copper sulfate (Cu^{2+} , $100 \mu\text{M}$, 30 min) on the immunodensities of monomeric and oligomeric p-Ser194 FADD forms, dimeric FADD, and β -actin in the human prefrontal cortex. The amount of protein loaded on the gels was 5 – $40 \mu\text{g}$ for the different samples. The molecular masses of the various FADD species and β -actin were estimated from referenced standards.

jected to enhanced chemiluminescence (ECL detection system; Amersham, Buckinghamshire, UK) and the signal of bound antibody (specific immunoreactivity) was visualized by exposure to autoradiographic film (Amersham ECL Hyperfilm) for 1 – 60 min (autoradiograms).

The primary antibodies (immunoaffinity-purified epitope) are listed in Table 2. The characterization of these antibodies (p-Ser194 FADD, FADD, MAPKs) has been previously assessed in brain tissue (Ferrer-Alcón et al., 2004; García-Fuster et al., 2007, 2008a; and unpublished observations from this laboratory). To further assess the selectivity of some antibodies with specific proteins, the corresponding antigenic peptide was preincubated in excess with the antiserum to block the binding of the antibody (Fig. 1A for p-Ser194 FADD; experiments for other proteins not shown) or the target protein was identified with a positive control (Fig. 6C for p-Akt1). In the human prefrontal cortex, the anti-p-JNK and total JNK antibodies cross-reacted with two of the three JNK isoforms (i.e. JNK1 was identified as p46 JNK, and JNK2 as p54 JNK) (see Kuan et al., 1999, 2003, for the identification of JNK isoforms in the mouse brain). As a control for sample loading and protein transfer, the blots were stripped and reprobed with anti- β -actin monoclonal antibody (see comment below).

Quantification of target proteins

The autoradiograms were quantified by densitometric scanning (GS-800 Imaging Densitometer, Bio-Rad) of the immunoreactive bands [integrated optical density (IOD) units]. The relative content of p-Ser194 FADD, CK1 α , MAPKs (ERK1/2, JNK1/2, p38 kinase), PEA-15 and Akt1 in the human prefrontal cortex was quantified in pairs of opiate abusers and control subjects, who were matched as much as possible for PMD (± 12 h), age (± 10 years), and, whenever possible, gender (Table 1). In a given experiment, the amount of a target protein ($40 \mu\text{g}$ of total homogenate; $15 \mu\text{g}$ of subcellular fractions) of one (ST or LT) or two (ST and LT) opiate abusers was compared with that of one or two matched controls, which were run together on the same gel. This quantification procedure was repeated three to five times for each pair of subjects in different gels. Finally, percent changes in immunoreactivity with respect to control samples (100%) were calculated for each opiate abuser in each gel, and the mean value of the different gels was used as a final estimate.

Similar results were obtained when the relative intensity (IOD) of immunoreactive bands was normalized to that of β -actin. Although the content of β -actin was shown to remain unchanged in the rat frontal cortex after a chronic morphine treatment (Ammon et al., 2003), other studies have reported alterations of various cytoskeletal proteins after chronic morphine exposure (Ferrer-Alcón et al., 2003; Marie-Claire et al., 2004; Morón et al., 2007). Furthermore, several proteins routinely utilized as “housekeeping” controls in gene expression and Western blot assays (e.g. glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and β -actin) also showed marked changes in rat brain upon acute and chronic stress (Derks et al., 2008). Therefore, the original data of the current study are reported without any normalization, although the ratios of p-Ser194 FADD and p-PEA-15 to the corresponding β -actin content were also calculated (opiate addicts versus matched controls) to confirm the results.

Data and statistical analysis

All series of data were analyzed with the program GraphPad Prism, version 4.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA). Results are expressed as mean \pm SEM. The experimental design of this study incorporated the pairing of subjects (opiate abusers and healthy controls) matched for different variables (mainly for PMD and age), and consequently a statistical test that takes pairing into account was performed. A two-tailed one-sample *t*-test (with $N-1$ degrees of freedom), which compares the

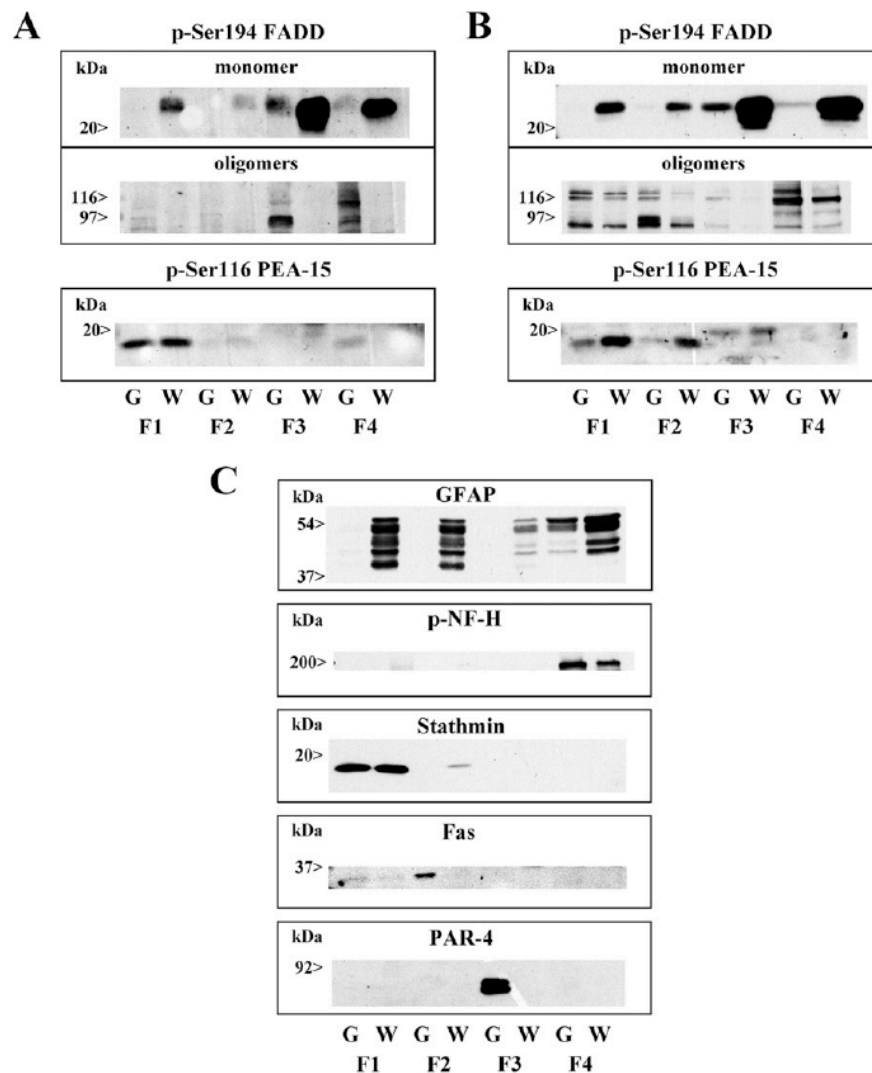


Fig. 2. (A, B) Representative immunoblots depicting the subcellular localization of monomeric and oligomeric p-Ser194 FADD and that of p-Ser116 PEA 15 in the gray (G) and white (W) matter of prefrontal cortex (BA 9) from two healthy subjects (A, female, 30 years old, PMD 15 h; B, male, 44 years old, PMD 16 h), and their relative content in the various compartments (F1: cytosolic fraction; F2: membrane/organelle fraction; F3: nuclear fraction; F4: cytoskeletal fraction). (C) Immunoblots of GFAP (W, astrocytes), and selective subcellular markers: stathmin (F1), Fas receptor (F2), PAR-4 (F3) and p-NF-H (F4), a neuronal marker.

experimental mean (percent of control) with a hypothetical value of 100 (Motulsky, 1995), was used for the statistical evaluations. The subgroups of ST and LT opiate abusers were similarly compared with the corresponding matched controls. Pearson's correlation coefficients were calculated to test for possible association between variables. The level of significance was chosen at $P=0.05$.

RESULTS

Immunodetection of p-Ser194 FADD in the human brain: relation between monomeric and oligomeric p-FADD forms

Western blot analysis of human prefrontal cortex (total homogenate) with anti-p-Ser194 FADD antibodies readily identified the monomeric form of p-FADD (about 23 kDa) as well as various oligomeric p-FADD forms (about 92 and 116 kDa)

(Fig. 1A). These p-Ser194 FADD forms were sensitive to enzymatic dephosphorylation with alkaline phosphatase (signals reduced by >95%) and to antibody competition with its antigenic peptide, which demonstrated the specificity of these p species of FADD in the human brain (Fig. 1A). A similar pattern of p-FADD forms was visualized in the human prefrontal cortex with an anti-p-Ser194 FADD polyclonal goat antibody (data not shown; Table 2).

Preincubation of cortical membranes with copper sulfate (100 μ M), a protein aggregating agent, reduced the immunodensity of monomeric p-Ser194 FADD (23 kDa species: 12%–64%) and increased that of high-molecular mass p-Ser194 FADD forms (116/92 kDa species: 3%–44%), as well as the content of dimeric FADD (51 kDa species: 18%–47%) (Fig. 1B). Low concentrations of copper are reported not to cause the precipitation of proteins

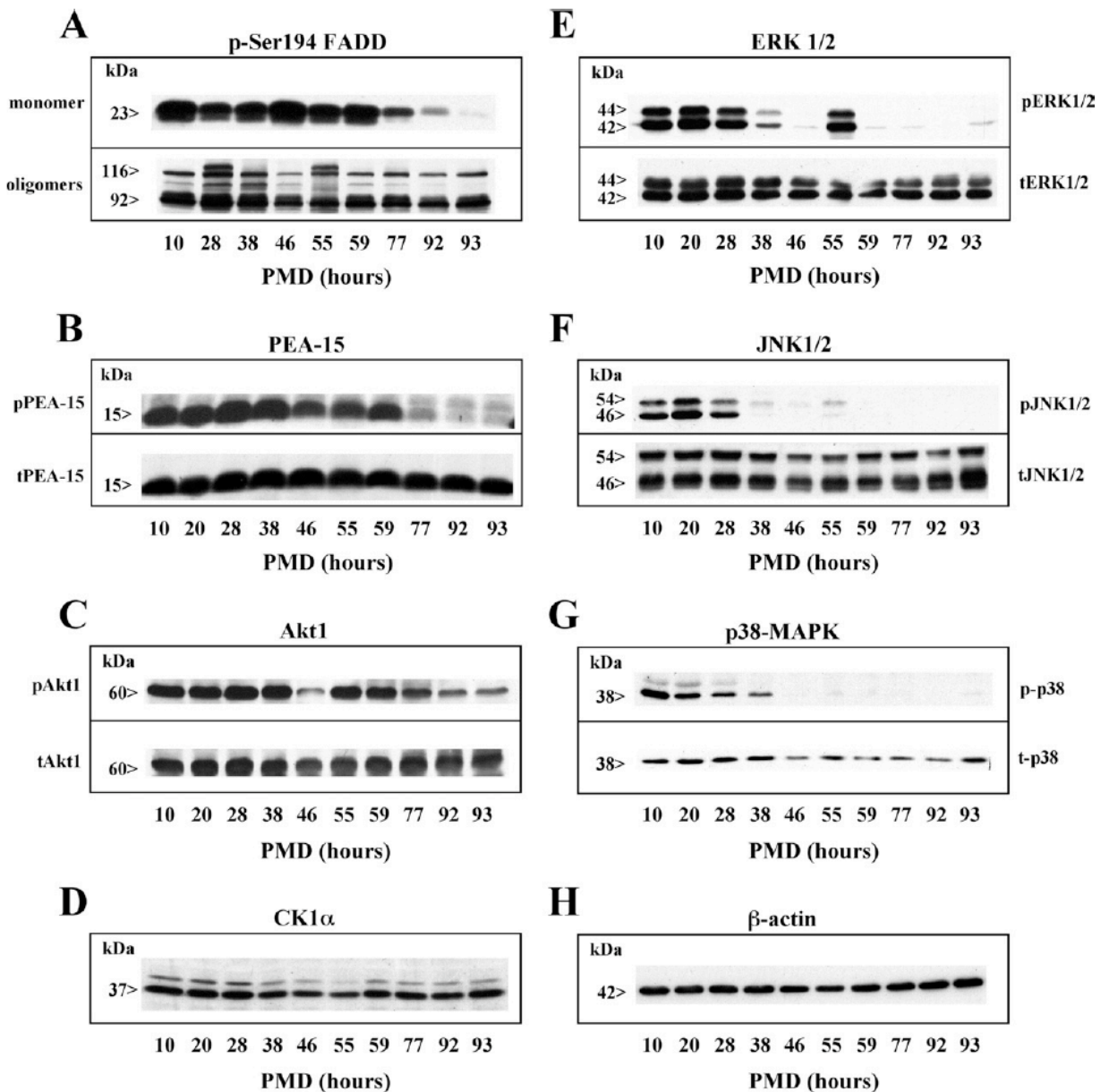


Fig. 3. Representative immunoblots for the effect of PMD (10–93 h) on the immunoccontent of (A) monomeric and oligomeric p-Ser194 FADD, (B) p-Ser116 PEA 15 and total protein, (C) p-Ser473 Akt1 and total kinase, (D) CK1 α , (E) p-ERK1/2 and total kinase, (F) p-JNK1/2 and total kinase, (G) p-p38 MAPK and total kinase, and (H) β -actin in brains of healthy subjects (prefrontal cortex, BA 9). The experiments were repeated with similar results. The molecular masses of the proteins are indicated in kDa.

(Linder and Goode, 1991; Biasini et al., 2008) and, in fact, preincubation with 100 μ M copper sulfate did no reduce the content of β -actin in the human prefrontal cortex (Fig. 1B). These results demonstrated the existence of a dynamic relationship between monomeric and oligomeric p-Ser194 FADD forms in the human brain.

Subcellular distribution of p-Ser194 FADD forms in the human brain: gray matter versus white matter

At the subcellular level (gray and white matter of the prefrontal cortex), the monomeric and oligomeric forms of p-Ser194

FADD were immunodetected in the nuclear fraction (F3), and to a lesser extent in the cytosolic (F1) and cytoskeletal (F4) compartments (Fig. 2A/B; see Fig. 2C for specific F1–F4 markers). As expected, PEA-15 (a relevant signaling protein enriched in astrocytes and neurons; see below) was mainly detected in the cytosolic (F1) fractions of white and gray matter (Fig. 2A/B), which further reinforced the efficiency and selectivity of the subcellular extraction procedure. Whereas the gray matter contained both forms of p-Ser194 FADD (see also Fig. 4B), the white matter preferentially expressed the monomeric species of p-FADD with a remarkably high abundance in F3 and F4 (Fig. 2A/B). The distribution of p-FADD

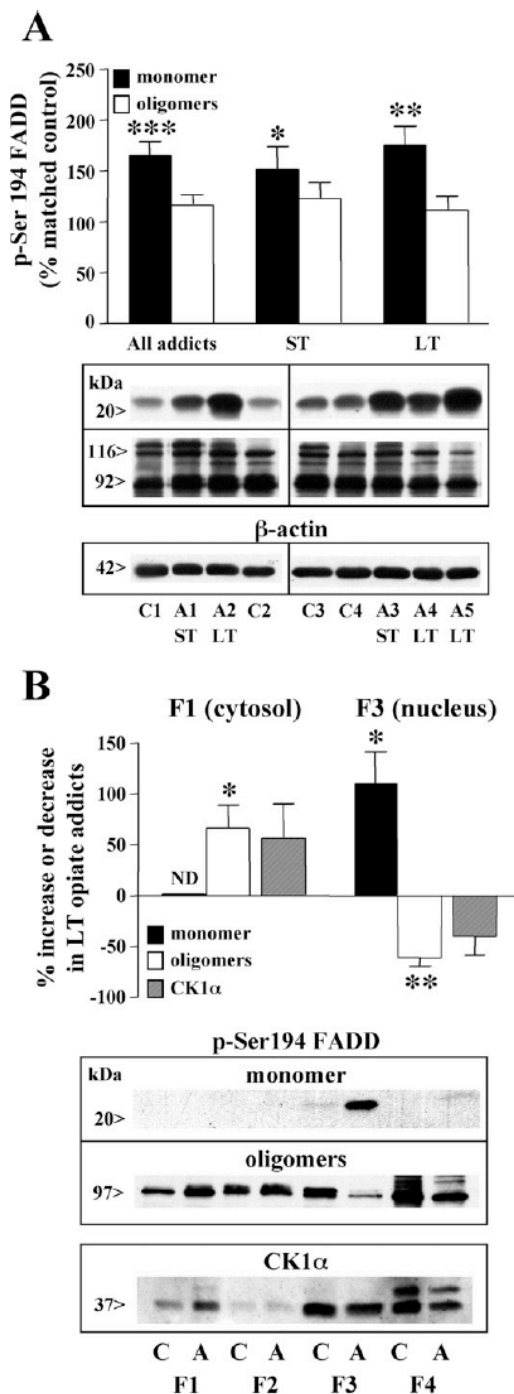


Fig. 4. (A) Immunodensities of monomeric and oligomeric p-Ser194 FADD in the prefrontal cortex (BA 9) of opiate abusers (all addicts, $n=26$; ST, $n=11$; LT, $n=15$) as mean \pm SEM (bars) percentages of the contents in matched controls. * $P=0.044$, ** $P=0.001$, *** $P=0.0001$ when compared with the corresponding matched controls (one-sample t -test). Bottom: representative immunoblots for monomeric and oligomeric p-FADD and β -actin in ST (A1, A3) and LT (A2, A4, A5) opiate abusers and matched controls (C1–C3). The molecular masses of p-FADD forms and β -actin were estimated from referenced standards. (B) Immunodensity changes of cytosolic (F1) and nuclear (F3) p-Ser194 FADD (monomeric and oligomeric forms) and CK1 α in the prefrontal cortex (BA 9) of selected LT opiate abusers ($n=5$) as

and PEA-15 in gray and white matter was not affected by gender (female in Fig. 2A; male in Fig. 2B).

Patterns of postmortem degradation of p-Ser194 FADD and signaling proteins in the human brain

In the prefrontal cortex of 10 healthy subjects, the immunodensities of monomeric and oligomeric p-Ser194 FADD forms declined as a function of PMD (range 10–93 h) (Fig. 3A), following linear decay models as observed for most brain proteins (e.g. see García-Fuster et al., 2008b). p-Ser194 FADD monomer was more susceptible to postmortem degradation ($r=-0.81$, $P=0.009$) than the oligomeric forms ($r=-0.61$, $P=0.09$) (Fig. 3A).

In the same subjects, the brain content of p-PEA-15 (p-Ser116), but not total PEA-15 protein, also declined as a function of PMD ($r=-0.79$, $P=0.004$) (Fig. 3B). Similarly, the density of p-Akt1 (p-Ser473), but not total Akt1 enzyme, showed a gradual loss with the extent of PMD ($r=-0.81$, $P=0.005$) (Fig. 3C). Remarkably, this range of PMD did not alter the contents of CK1 α and β -actin in the prefrontal cortex (Figs. 3D/H).

In contrast, the postmortem degradation of p-ERK1/2 (p-Thr202/Tyr204), p-JNK1/2 (p-Thr183/Tyr185) and p-p38 (p-Thr180/Tyr182) MAPKs occurred within a short time (Fig. 3E/F/G). The range of PMD (10–93 h), however, did not significantly alter the contents of total (inactive) MAPKs (Fig. 3E/F/G). A previous human brain study had already revealed the rapid postmortem loss of specific p-sites on ERK1/2 enzymes (Ferrer-Alcón et al., 2004).

Therefore, p-Ser194 FADD (monomeric and oligomeric forms), p-PEA-15 and p-Akt1 were more resistant to postmortem degradation (up to 77 h) than the p-forms of the various MAPKs (up to 28 h) (Fig. 3). To minimize the influence of this important confounding variable, the target proteins were quantified in opiate abusers and matched controls with short PMDs (opiate abusers, PMD: 23 ± 2.8 h; control subjects, PMD: 22 ± 2.8 h) (Table 1).

Short- and long-term regulation of p-Ser194 FADD in the prefrontal cortex of opiate abusers

The density of monomeric p-Ser194 FADD in the prefrontal cortex (total homogenate) of opiate abusers was markedly increased when compared with that quantified in age-, gender-, and PMD-matched controls (all addicts: $65\% \pm 14\%$, $P=0.0001$, $n=26$) (Fig. 4A). In opiate abusers, the gender of the subjects did not alter the expression of monomeric p-FADD, and similar and significant increases were quantified in men ($66\% \pm 21\%$, $P<0.01$, $n=16$) and women ($63\% \pm 13\%$, $P<0.001$, $n=10$). This upregulation of p-FADD was greater in long-term opiate addicts (LT:

percentages of the contents in matched controls. * $P<0.05$, ** $P<0.01$. ND: monomeric p-FADD not detected in the cytosolic fraction. Bottom: representative immunoblots depicting the subcellular localization of monomeric and oligomeric p-Ser194 FADD and CK1 α in the prefrontal cortex of a chronic opiate addict (A) and the matched control (C), as well as their contents in the various compartments (F1: cytosolic fraction; F2: membrane/organelle fraction; F3: nuclear fraction; F4: cytoskeletal fraction).

75%±19%, $P=0.001$, $n=15$) than in short-term opiate abusers (ST: 51%±22%, $P=0.044$, $n=11$), but the difference did not reach statistical significance (24% increase, $P>0.05$) (Fig. 4A). The content of oligomeric p-Ser194 FADD was slightly increased (all addicts: 16%±11%, $P>0.05$, $n=26$; ST: 23%±17%, $P>0.05$, $n=11$; LT: 11%±14%, $P>0.05$, $n=15$) (Fig. 4A). Similar results were obtained when the densities of p-Ser194 FADD forms were normalized to the expression of β -actin (ratio of p-FADD to β -actin; p-FADD monomer, all addicts: 1.62%±0.13%, $P<0.001$, $n=26$; ST: 1.49%±0.20%, $P<0.05$, $n=11$; LT: 1.71%±0.19%, $P<0.005$, $n=15$; p-FADD oligomers, all addicts: 1.19%±0.14%, $P>0.05$, $n=26$; ST: 1.30%±0.23%, $P>0.05$, $n=11$; LT: 1.11%±0.17%, $P>0.05$, $n=15$).

CK1 α has been reported to be the main enzyme that induces FADD phosphorylation (human, p-Ser194; mouse, p-Ser191) in various cells (Alappat et al., 2005). In the prefrontal cortex (total homogenate) of opiate abusers, however, the content of CK1 α was found unchanged compared with the value (100%) in matched controls (all addicts: 98%±5%, $P>0.05$, $n=26$; ST: 100%±8%, $P>0.05$, $n=11$; LT: 97%±5%, $P>0.05$, $n=15$).

At the subcellular level (prefrontal cortex), p-Ser194 FADD and CK1 α were co-localized in the cytosol (F1) and nucleus (F3), which could allow their interaction and the phosphorylation of FADD (Fig. 4B). In selected chronic opiate addicts, the content of oligomeric p-Ser194 FADD was increased in cytosol (F1: 66%±23%, $P<0.05$, $n=5$) and decreased in the nucleus (61%±9%, $P<0.01$, $n=5$) (Fig. 4B). Minor changes for p-Ser194 FADD were observed in the membrane (F2) and cytoskeletal (F4) compartments (Fig. 4B). These opposite subcellular changes could explain the lack of a significant upregulation of oligomeric p-Ser194 FADD in cortical homogenates of opiate abusers (see above). As expected (see Fig. 4A), chronic opiate addiction markedly increased the content of monomeric p-Ser194 FADD in the nucleus (110%±31%, $P<0.05$, $n=5$) (Fig. 4B). Similarly, opiate addiction was also associated with upregulation of CK1 α in the cytosol (F1: 57%±33%, $P=0.18$, $n=5$) and with enzyme reductions in the nucleus (F3: 40%±19%, $P=0.12$, $n=5$) (Fig. 4B, Fig. 6D for specific subcellular markers), although these changes did not reach statistical significance. These opposite changes would also explain the negative results for CK1 α in total homogenate preparations of opiate abusers (see above).

Short- and long-term regulation of p-ERK1/2, p-JNK1/2 and p-p38 MAP kinases in the prefrontal cortex of opiate abusers

In the prefrontal cortex of opiate abusers (total homogenate), the content of p-ERK1/2 was markedly decreased when compared with that quantified in age-, gender-, and PMD-matched controls (all addicts: 40%±11%, $P=0.0015$, $n=23$) (Fig. 5A). This downregulation of p-ERK1/2 was associated with LT (52%±7%, $P<0.0001$, $n=13$) but not ST (25%±24%, $P>0.05$, $n=10$) opiate abuse (Fig. 5A). In LT opiate addicts, both p-ERK1 and p-ERK2 were similarly reduced (data not shown; see Fig. 5A). Total ERK1/2 enzyme contents were not altered by

ST or LT opiate abuse (Fig. 5A). The ratio of p-ERK1/2 to total ERK1/2 also indicated that this MAPK was markedly downregulated in chronic opiate addicts (data not shown).

Similarly, the content of p-JNK1/2 was decreased in the same brain samples of opiate abusers (all addicts: 30%±11%, $P=0.011$, $n=24$). Again, the downregulation of p-JNK1/2 was clearly associated with LT (51%±9%, $P<0.0001$, $n=14$) but not ST (1%±20%, $P>0.05$, $n=10$) opiate abuse (Fig. 5C). In LT opiate addicts, similar reductions for p-JNK1 and p-JNK2 were quantified (data not shown; see Fig. 5C). The contents of total JNK1/2 enzymes were not modified by ST or LT opiate abuse (Fig. 5C). The ratio of p-JNK1/2 to total JNK1/2 also indicated that this MAPK was markedly downregulated in chronic opiate addicts (data not shown).

In contrast to p-ERK1/2 and p-JNK1/2, the density of p-p38 MAPK was found marginally altered in the same brain samples of ST or LT opiate abusers (all addicts: 11%±12% decrease, $P>0.05$, $n=24$; ST: 29%±18% decrease, $P>0.05$, $n=10$; LT: 3%±16% increase, $P>0.05$, $n=14$), as well as the content of total p38 MAPK (Fig. 5E).

At the subcellular level, the various MAPKs were variably immunodetected in all compartments (F1–F4) of the prefrontal cortex (Fig. 5B/D/F). In chronic opiate addicts, the content of p-ERK1/2 was decreased in the cytosol (F1: 49%–83%), membranes (F2: 70%–90%), and cytoskeleton (F4: 30%–90%), and more remarkably in the nucleus (F3: 42%–95%) (Fig. 5B). The strong decreases of p-ERK1/2 in F1–F4 clearly reflected the downregulation of the ERK signaling quantified in total cortical homogenates of LT opiate addicts (see above). In chronic opiate addicts, the modulations of p-JNK1/2 and p-p38 MAPKs at the subcellular level (F1–F4) also reflected those quantified in cortical homogenates (Fig. 5D/F), although in the case of JNK the antibody used worked poorly in the extracts probably due to the small amount (15 μ g) of protein.

Short- and long-term regulation of p-PEA-15 and p-Akt1 in the prefrontal cortex of opiate abusers

In the prefrontal cortex of opiate abusers (total homogenate), the content of p-Ser116 PEA-15 was decreased when compared with that quantified in age-, gender-, and PMD-matched controls (all addicts: 32%±8%, $P=0.0003$, $n=24$) (Fig. 6A). The downregulation of p-PEA-15 was associated with LT (43%±6%, $P<0.0001$, $n=14$) but not ST (18%±16%, $P>0.05$, $n=10$) opiate abuse (Fig. 6A). The content of total PEA-15 (non-p and p forms) was not significantly altered by ST or LT opiate abuse (Fig. 6A).

The content of p-Ser473 Akt1, the PEA-15 kinase, was also decreased in the same brain samples of opiate abusers (all addicts: 28%±9%, $P=0.003$, $n=24$). Similarly to p-PEA-15, the downregulation of p-Akt1 was associated with LT, but not ST opiate abuse (ST: 10%±15%, $P>0.05$, $n=10$; LT: 41%±9%, $P=0.0003$, $n=14$) (Fig. 6B). The content of total Akt1 enzyme was not significantly modified by ST or LT opiate abuse (Fig. 6B). The ratio of p-Akt1 to total Akt1 also indicated that the activated enzyme was downregulated in chronic opiate addicts (data not shown).

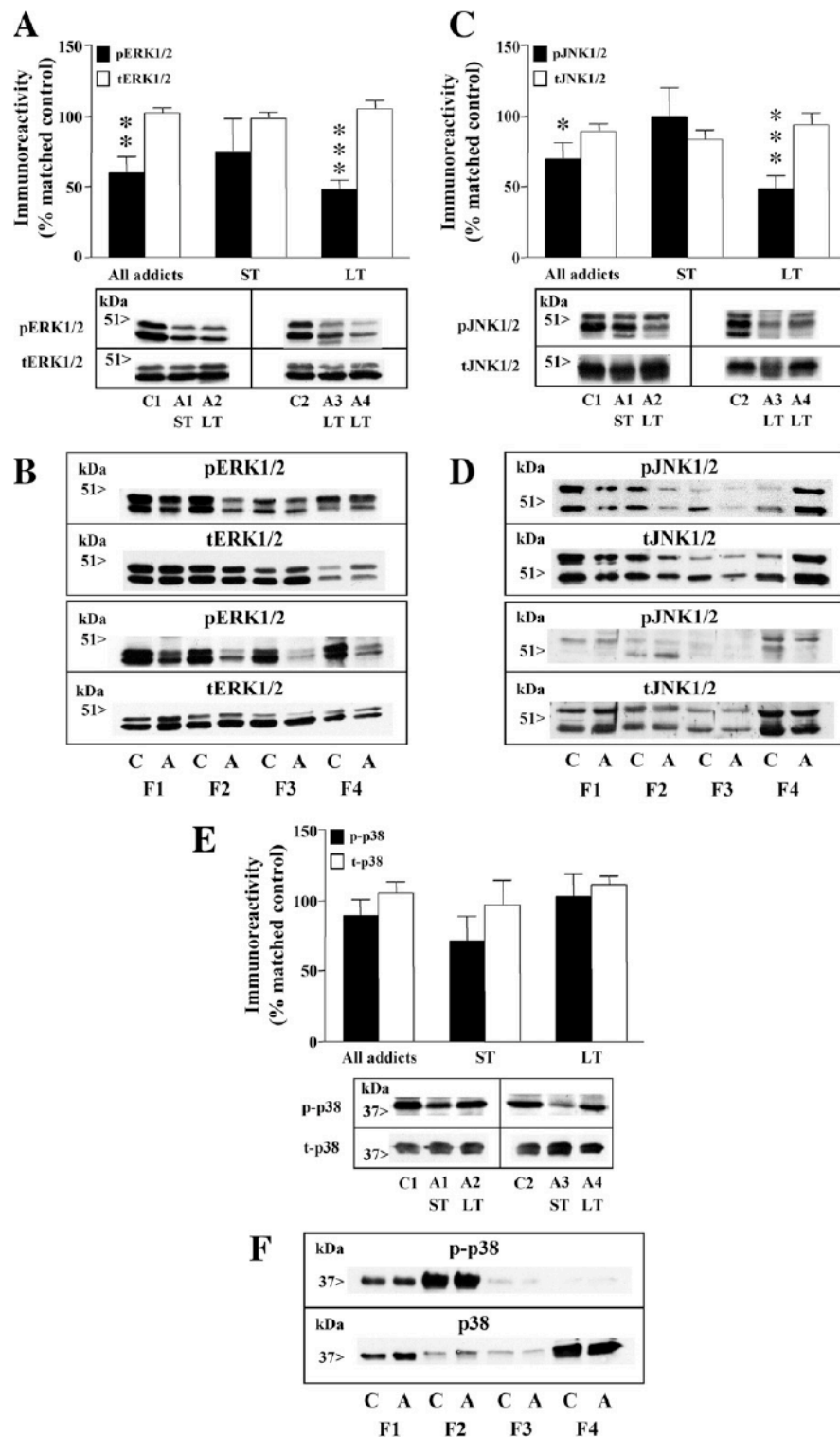


Fig. 5. (A) Immunodensities of p-Thr202/Tyr204 ERK1/2 and total kinase in the prefrontal cortex (BA 9) of opiate abusers (all addicts, $n=23$; ST, $n=10$; LT, $n=13$) as mean \pm SEM (bars) percentages of the contents in matched controls. ** $P=0.0015$, *** $P<0.0001$ when compared with the corresponding matched controls (one-sample t -test). Bottom: representative immunoblots for p-ERK1/2 and total kinase in ST (A1) and LT (A2–A4) opiate abusers and matched controls (C1–C2). (B) Representative immunoblots depicting the subcellular localization of p-ERK1/2 and total kinase in the prefrontal cortex of two LT opiate addicts (A, male and female) and matched controls (C, male and female), as well as their contents in the various compartments (F1–F4). (C) Immunodensities of p-Thr183/Tyr185 JNK1/2 and total kinase in the prefrontal cortex of opiate abusers (all addicts, $n=24$; ST, $n=10$; LT, $n=14$) as mean \pm SEM (bars) percentages of the contents in matched controls. * $P=0.011$, *** $P<0.0001$ when compared with the corresponding matched controls (one-sample t -test). Bottom: representative immunoblots for p-JNK1/2 and total kinase in ST (A1) and LT (A2–A4)

At the subcellular level, PEA-15 and Akt1 were mainly immunodetected in the cytosol (F1), and to a much lesser extent in membrane (F2) and nuclear (F3) fractions of the prefrontal cortex (Fig. 6C). In selected chronic opiate addicts, the contents of p-PEA-15 (but not total PEA-15) and p-Akt1 were decreased in the cytosol (p-PEA-15: $60\% \pm 4\%$, $P < 0.001$, $n = 5$; p-Akt1: $64\% \pm 9\%$, $P < 0.001$, $n = 5$) (Fig. 6C, Fig. 6D for specific subcellular markers). The reductions of p-PEA-15 and p-Akt1 in the cytosol (main cellular localization for their interaction) reflected the downregulation of these signaling proteins quantified in cortical homogenates of chronic opiate addicts.

Influence of potential confounding variables

In the prefrontal cortex of chronic (LT) opiate addicts, the reported upregulation of p-Ser194 FADD and the downregulation of p-MAPKs, p-PEA-15 and p-Akt1 were not related to variables such as the age or gender of subjects, heroin or methadone deadly overdose, or to the plasma concentrations of opiates or other drugs in blood and/or hair samples (cocaine; 3,4-methylenedioxy-methamphetamine; $\Delta 9$ -tetrahydrocannabinol; nine polydrug abusers), among other potential confounding variables (data not shown). Therefore, the reported data appear to be specific neurochemical effects induced in the human brain by the chronic abuse of heroin/morphine and/or methadone.

DISCUSSION

Immunodetection of p-Ser194 FADD in the human brain: relevance of the nuclear localization

In the human prefrontal cortex, both monomeric (about 23 kDa) and oligomeric (92/116 kDa) p-Ser194 FADD forms were readily immunodetected with specific anti-human antibodies. In the rat and mouse brains (cerebral cortex and corpus striatum), FADD and p-FADD were also recognized as monomers (weak expression) and self-associated forms including dimers/trimers (51/75 kDa) and oligomeric (92/116 kDa) species (García-Fuster et al., 2007, 2008a). The process of FADD self-association is functionally relevant in Fas apoptotic signaling (Sandu et al., 2006; Scott et al., 2009), and this oligomerization might be also important for p-FADD in mediating non-apoptotic actions. Interestingly, the presence of 92/116 kDa species of p-FADD in the human brain agrees well with the proposed tetrameric arrangement of FADD in the signaling platform called death-inducing signaling complex (DISC) (Scott et al., 2009). In the present study, copper-induced aggregation of

p-Ser194 FADD augmented the expression of the oligomers and reduced that of the monomer. Conversely, dissociation of p-FADD oligomers (sulfhydryl reagents) reduced the density of oligomeric forms and increased that of the monomeric species (García-Fuster et al., 2008a). Together, these data indicated that there is a relationship between the molecular forms of p-Ser194 FADD (monomer and oligomers) in the human and rat brains (Fig. 7).

At the subcellular level, the monomeric and oligomeric forms of p-Ser194 FADD were mainly localized in the cytosol and nucleus, as reported in the rat cerebral cortex (García-Fuster et al., 2008a). Interestingly, the gray matter expressed the monomeric and oligomeric forms of p-Ser194 FADD, whereas the white matter mainly expressed the monomeric species with a high abundance in the nucleus. These findings suggested that the process of FADD oligomerization (self-associated monomers) is preferentially induced in neuronal types of the gray matter. These results (gray versus white matter) were also in line with the observed inverse relationship between the relative abundance of monomeric and oligomeric p-Ser194 FADD in the human prefrontal cortex (see above).

Various studies have demonstrated that phosphorylation of FADD is essential for its accumulation in the nucleus and export to the cytoplasm, as well as in mediating the non-apoptotic actions of this multifunctional protein (Screaton et al., 2003; Alappat et al., 2005). Therefore, the nuclear localization of p-Ser194 FADD in brain tissue appeared to be of special relevance in human opiate addiction (Fig. 7).

Opiate addiction is associated with upregulation of p-Ser194 FADD in the human brain: role in structural plasticity

The content of p-Ser194 FADD (mainly the monomeric species) was increased in the prefrontal cortex (total homogenate) of short- and long-term opiate abusers. Furthermore, chronic opiate addiction was associated with increased monomeric and decreased oligomeric p-Ser194 FADD forms in the nuclear compartment. In turn the content of CK1 α , the enzyme that mediates p-Ser194 FADD (Alappat et al., 2005), was found upregulated in the cytosol and downregulated in the nucleus (regulated balance). Together, these data suggested that opiate addiction induces the translocation of oligomeric p-Ser194 FADD from the cytosol (content increased) to the nucleus, where it would be dissociated to the monomeric form (content markedly increased) (see Fig. 4B). Since the total content of FADD is reduced by opiate drugs (García-Fuster et al.,

opiate abusers and matched controls (C1, C2). (D) Representative immunoblots depicting the subcellular localization of p-JNK1/2 and total kinase in the prefrontal cortex of two LT opiate addicts (A, male and female) and matched controls (C, male and female), as well as their contents in the various compartments (F1–F4). (E) Immunodensities of p-Thr180/Tyr182 p38 MAPK and total kinase in the prefrontal cortex of opiate abusers (all addicts, $n = 24$; ST, $n = 10$; LT, $n = 14$) as mean \pm SEM (bars) percentages of the contents in matched controls. Bottom: representative immunoblots for p-p38 MAPK and total kinase in ST (A1, A3) and LT (A2, A4) opiate abusers and matched controls (C1, C2). (F) Representative immunoblots depicting the subcellular localization of p-p38 MAPK and total kinase in the prefrontal cortex of a LT opiate addict (A) and the matched control (C), as well as their contents in the various compartments (F1–F4). The molecular masses of MAPKs were estimated from referenced standards.

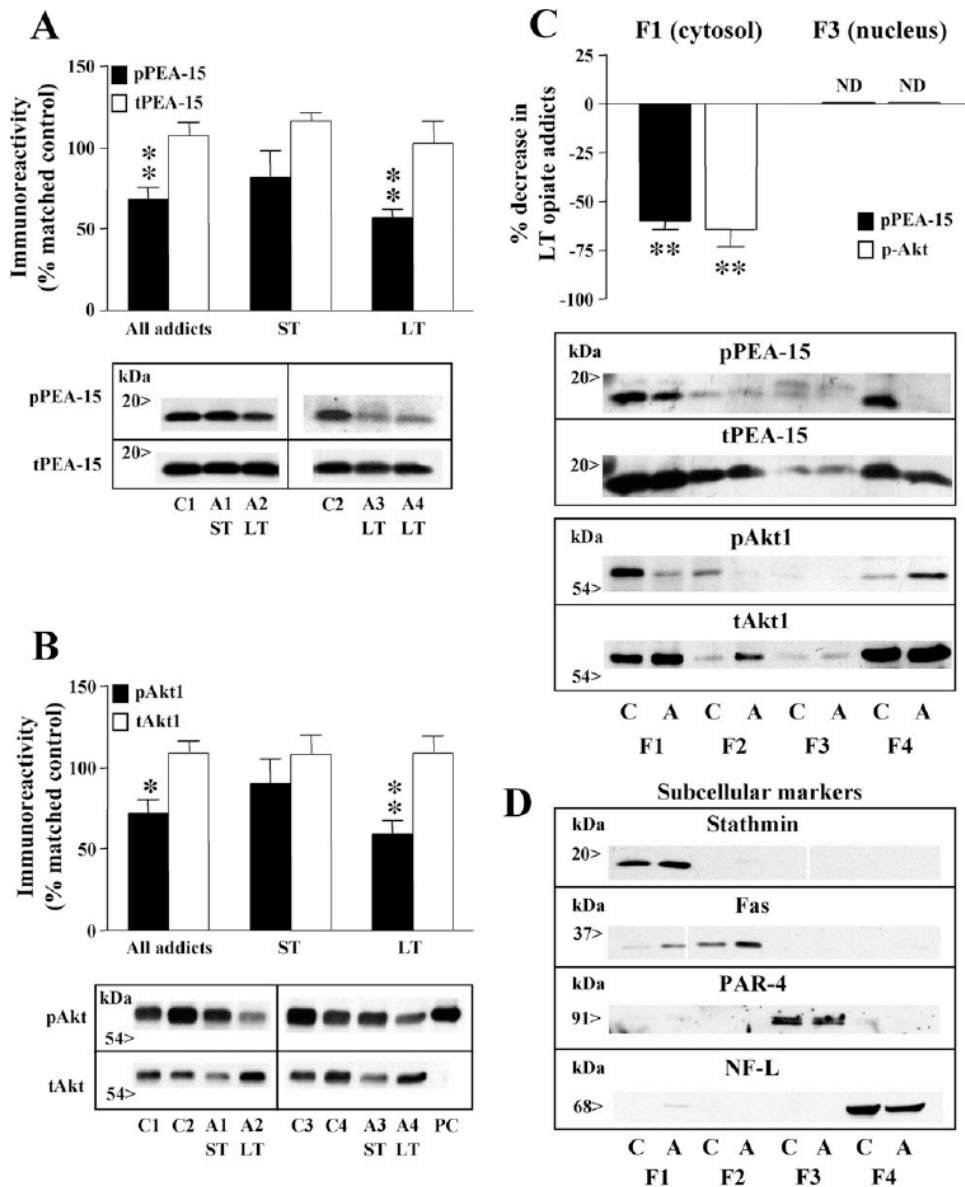


Fig. 6. (A) Immunodensities of p-Ser116 PEA 15 and total protein in the prefrontal cortex (BA 9) of opiate abusers (all addicts, $n=24$; ST, $n=10$; LT, $n=14$) as mean \pm SEM (bars) percentages of the contents in matched controls. ** $P < 0.0005$ when compared with the corresponding matched controls (one-sample t -test). Bottom: representative immunoblots for p-PEA-15 and total protein in ST (A1) and LT (A2–A4) opiate abusers and matched controls (C1, C2). (B) Immunodensities of p-Ser473 Akt1 and total kinase in the prefrontal cortex of opiate abusers (all addicts, $n=24$; ST, $n=10$; LT, $n=14$) as mean \pm SEM (bars) percentages of the contents in matched controls. * $P=0.003$, ** $P=0.0003$ when compared with the corresponding matched controls (one-sample t -test). Bottom: representative immunoblots for p-Akt1 and total kinase in ST (A1, A3) and LT (A2, A4) opiate abusers and matched controls (C1–C4). (C) Immunodensity changes of cytosolic (F1) p-Ser116 PEA-15 and p-Ser473 Akt1 in the prefrontal cortex (BA 9) of selected LT opiate abusers ($n=5$) as percentages of the contents in matched controls. ** $P < 0.001$. ND: p-PEA-15 and p-Akt1 not detected in the nuclear fraction (F3). Bottom: representative immunoblots depicting the subcellular localization of p-PEA-15 and total protein, p-Akt1 and total kinase in the prefrontal cortex of a LT opiate addict (A) and the matched control (C), as well as their contents in the various compartments (F1–F4). The molecular masses of PEA 15 and Akt1 were estimated from referenced standards. (D) Immunoblots of selective subcellular markers: stathmin (F1), Fas receptor (F2), PAR-4 (F3) and NF-L (F4).

2007, 2008b), opiate addiction appears to alter the balance between FADD and p-Ser194 FADD in the human brain, which would attenuate the induction of apoptotic effects (García-Fuster et al., 2008b) favoring the neuroplastic actions of this multifunctional protein (Fig. 7).

Chronic exposure to morphine in rats, or opiate withdrawal in dependent animals, was shown to result in struc-

tural changes of dopaminergic neurons (Sklair-Tavron et al., 1996; Spiga et al., 2003) as well as in alterations of neuronal branching and/or the density of dendritic spines in brain regions important in reward and motivation, including the orbitofrontal cortex (Robinson and Kolb, 1999; Robinson et al., 2002; Liao et al., 2005; Ballesteros-Yáñez et al., 2007). Since dendritic spines are major determinants

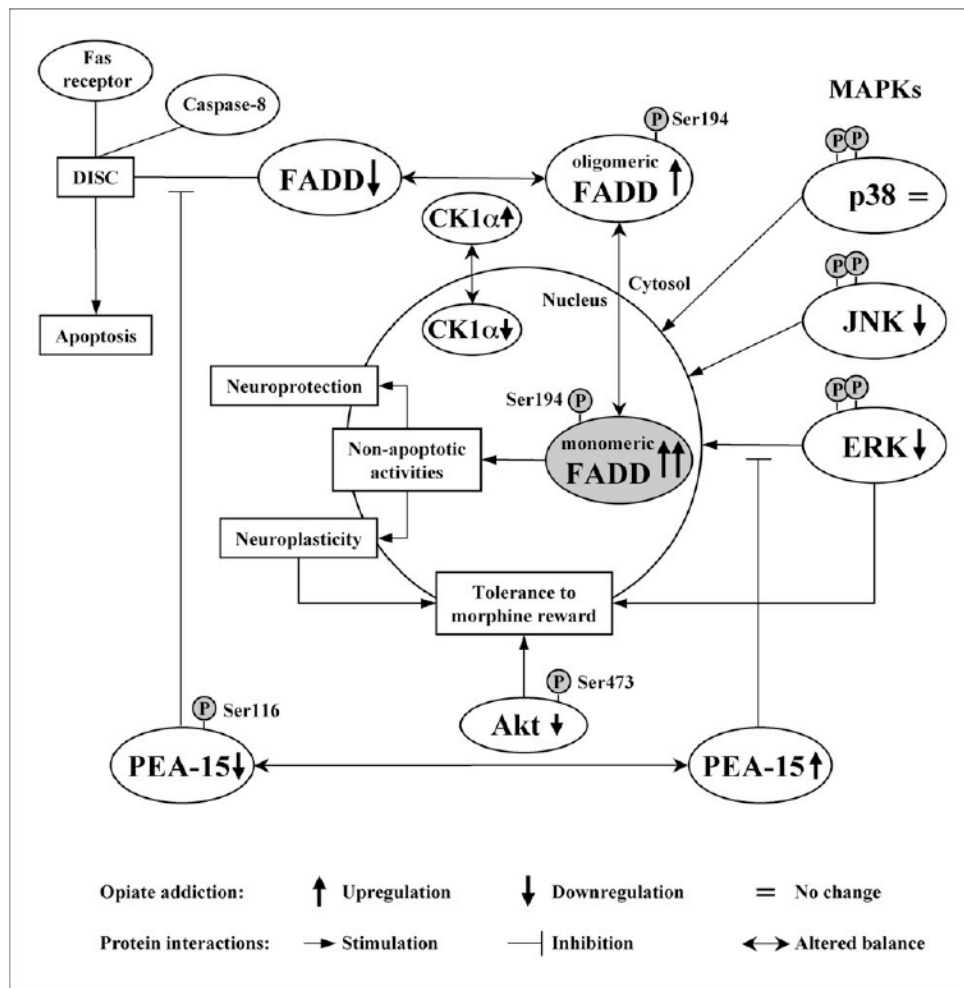


Fig. 7. Schematic diagram illustrating the interactions between FADD, MAP kinases, PEA 15 and Akt1 signaling pathways in the prefrontal cortex (BA 9; cytosol and nucleus) of chronic opiate addicts, which could induce changes in structural and behavioral neuroplasticity. See Results and Discussion for specific details and comments.

of synaptic plasticity (Hering and Sheng, 2001), key advances in the regulation by opiate drugs of these anatomical structures (Liao et al., 2007) may be essential for a better understanding of opiate-induced neuroplasticity. Thus, Fas stimulation induced neurite outgrowth in cultured dorsal root ganglion neurons (Desbarats et al., 2003) and stimulated dendritic branching in the developing brain (Zuliani et al., 2006), among other neuroplastic effects (Reich et al., 2008). These findings, together with the upregulation of p-Ser194 FADD in the prefrontal cortex of chronic opiate addicts, suggest the involvement of Fas/FADD signaling in mediating, at least in part, the aforementioned alterations in dendritic spines induced by chronic morphine. The increased nuclear localization of monomeric p-Ser194 FADD in neurons (Fig. 7) could contribute to the modulation of gene expression and/or protein translation associated with changes in neural plasticity. In this context, grey and/or white matter astrocytes, which contain p-Ser194 FADD (see above), could also participate in the induction of homeostatic plasticity (Fellin, 2009).

Opiate addiction is associated with downregulation of classic and new signaling pathways in the human brain: role in behavioral plasticity

Contrary to the upregulation of p-Ser194 FADD, the current results also demonstrate that chronic opiate addiction (but not short-term opiate abuse) is associated with a pronounced downregulation of ERK1/2, JNK1/2, PEA-15 and Akt1 signaling in the prefrontal cortex. In contrast, the activation of p38 MAPK (pro-apoptotic kinase; Xia et al., 1995) was not altered in the same subjects. In a previous study, Raf/p-mitogen-activated protein kinase kinase (MEK)/p-ERK1/2 content was also markedly decreased in the prefrontal cortex of another cohort of chronic opiate addicts (Ferrer-Alcón et al., 2004). Although ERK and Akt1 cascades have been shown to play relevant roles in long-lasting forms of synaptic plasticity induced by opiates (Girault et al., 2007; Russo et al., 2007), little is known on the roles of JNK (pro-apoptotic kinase; Kuan et al., 1999; Weng et al., 2007) and PEA-15 (antiapoptotic factor; Kitsberg et al., 1999; Ramos, 2008) in opiate addiction. PEA-

15, a phosphoprotein enriched in astrocytes, could also have a role in some forms of behavioral plasticity. Thus, astrocytes have been reported to modulate the rewarding effects induced by morphine in mice (Narita et al., 2006).

The content p-Ser116 PEA-15 was decreased and that of total PEA-15 remained unchanged in the prefrontal cortex of chronic opiate addicts. Because non-p PEA-15 also plays a functional role by itself (e.g. ERK sequestration in the cytosol; Formstecher et al., 2001), this finding suggested that the balance between PEA-15 species might be shifted (Renganathan et al., 2005) towards the non-p form, which could compromise the antiapoptotic action of the p protein in opiate addicts (Fig. 7). Thus, the activation of Akt1, which induces p-Ser116 PEA-15, was also decreased in brains of chronic opiate addicts. In addition, protein kinase C (PKC) promotes p-Ser104 PEA-15 (cell survival; Araujo et al., 1993), and early studies reported downregulation of PKC (various isoforms) in brains of chronic opiate addicts (Busquets et al., 1995; García-Sevilla et al., 1997) and of heroin-, morphine-, and methadone-dependent rats (Ventayol et al., 1997). Complex cross-talks (Fig. 7) between FADD/p-FADD and PEA-15 (present results; García-Fuster et al., 2008b), FADD and ERK (García-Fuster et al., 2007, 2008a), and pro-survival (ERK, Xia et al., 1995) and pro-apoptotic (JNK, Kuan et al., 1999; p38 MAPK, Xia et al., 1995) pathways would take place in the brain to finally result in the observed lack of an increased cell death in the prefrontal cortex of chronic opiate addicts (García-Fuster et al., 2008b).

On the other hand, the downregulation of ERK1/2 and Akt1 in the prefrontal cortex of chronic opiate addicts could also play a major role in the induction of tolerance to opiate reward (Fig. 7). It is known that tolerance develops early to the euphoria-producing effects of opiates in human addicts (Jaffe, 1990). This process of behavioral tolerance, which underlines the compulsive opiate abuse, probably involves complex neuroadaptations in cortical and subcortical areas (Christie, 2008). Notably, both ERK1/2 and Akt1 were shown to mediate morphine reward in laboratory animals. Thus, ERK1 knockout mice showed a greater response to the reinforcing effects of morphine in the conditioned place preference (CPP) procedure, a response associated with increased ERK2 activity (Mazzucchelli et al., 2002). Furthermore, blockade of ERK1/2 activation prevented (during 2 weeks) morphine reward in the CPP paradigm (Valjent et al., 2006), indicating that ERK signaling is required for the establishment of this behavioral response to morphine (Girault et al., 2007). In line with these findings, the marked downregulation p-ERK1/2 in the prefrontal cortex of chronic opiate addicts (present results; Ferrer-Alcón et al., 2004) suggests the participation of this MAPK in the induction of tolerance to opiate reward (Fig. 7). Recently, the induction of p-Ser473 Akt1 downregulation by chronic morphine in the ventral tegmental area (VTA) was associated with a diminished response to the rewarding effects of morphine (CPP paradigm) in opiate-dependent rats (Russo et al., 2007), indicating that Akt1 is also important in mediating this type of behavioral tolerance. In the current study, the content p-Ser473 Akt1 was decreased in

the prefrontal cortex of chronic opiate addicts, which agrees with the reduction of activated Akt1 induced by chronic morphine in the rat nucleus accumbens (Muller and Unterwald, 2004) and VTA (Russo et al., 2007). Therefore, since the progression of opiate addiction in humans (compulsive auto-administration of high doses of opiates) is accompanied by tolerance to the rewarding effects of the abused opiate, it is tempting to conclude that the observed downregulation of ERK1/2 and Akt1 in the prefrontal cortex of chronic opiate addicts is related to the induction of tolerance to opiate reward (Fig. 7).

CONCLUSION

In conclusion, opiate addiction in humans is associated with an altered balance between p-Ser194 FADD (increased) and total FADD (decreased) in brain, which may favor the neuroplastic actions of this multifunctional protein. The interaction between p-FADD (upregulated) and classic and new neuronal signaling pathways (downregulated) could play a relevant role in some structural and behavioral forms of neuroplasticity induced by opiate drugs.

Acknowledgments—This study was supported by grant SAF2008-01311 (MICINN and FEDER, Madrid, Spain) and grant 20071032 (Plan Nacional sobre Drogas, MSC, Madrid) to J.A.G.-S. The research was also funded by Red Temática de Investigación Cooperativa en Salud (RETICS, Instituto de Salud Carlos III, MICINN and FEDER, Madrid): Red de Trastornos Adictivos, Grupo RD06/001/003 (J.A.G.-S.), and by Gobierno Vasco (IT-199-07) and Centro de Investigación Biomédica en Red sobre Salud Mental (CIBERSAM), Grupo CB07/09/0008 (J.J.M.). A.R.-M. was supported by a predoctoral fellowship from MEC (Madrid). We thank Mr. A. J. Crespo for skillful technical assistance. J. A. García-Sevilla is a member of the Institut d'Estudis Catalans (Barcelona, Catalonia, Spain).

REFERENCES

- Alappat E, Feig C, Boyerinas B, Volkland J, Samuels M, Murmann AE, Thorburn A, Kidd VJ, Slaughter CA, Osborn SL, Winoto A, Tang WJ, Peter ME (2005) Phosphorylation of FADD at serine 194 by CK1 α regulates its nonapoptotic activities. *Mol Cell* 19:321–332.
- Ammon S, Mayer P, Riechert U, Tischmeyer H, Höllt V (2003) Microarray analysis of genes expressed in the frontal cortex of rats chronically treated with morphine and after naloxone precipitated withdrawal. *Mol Brain Res* 112:113–125.
- Araujo H, Danziger N, Cordier J, Glowinski J, Chneiweiss H (1993) Characterization of PEA-15, a major substrate for protein kinase C in astrocytes. *J Biol Chem* 268:5911–5920.
- Ballesteros-Yañez I, Ambrosio E, Benavides-Piccione R, Pérez J, Torres I, Miguéns M, García-Lecumberri C, De Felipe J (2007) The effects of morphine self-administration on cortical pyramidal cell structure in addiction-prone Lewis rats. *Cereb Cortex* 17:238–249.
- Beaulieu J-M, Gainetdinov RR, Caron MG (2007) The Akt-GSK-3 signaling cascade in the actions of dopamine. *Trends Pharmacol Sci* 28:166–172.
- Biasini E, Seegulam ME, Patti BN, Solfrosi L, Medrano AZ, Christensen HM, Senatore A, Chiesa R, Williamson RA, Harris DA (2008) Non-infectious aggregates of the prion protein react with several PrP^{Sc}-directed antibodies. *J Neurochem* 105:2190–2204.
- Boumba VA, Ziavrou KS, Vougiouklakis T (2006) Hair as a biological indicator of drug use, drug abuse or chronic exposure to environmental toxicants. *Int J Toxicol* 25:143–163.

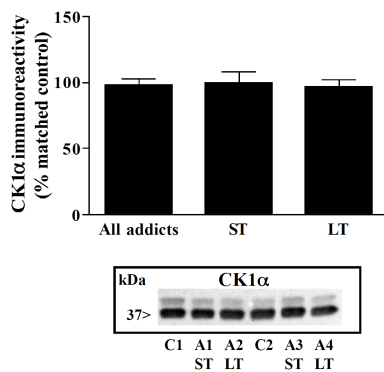
- Boutros T, Chevet E, Metrakos P (2008) Mitogen-activated protein (MAP) kinase/MAP kinase phosphatase regulation: roles in cell growth, death, and cancer. *Pharmacol Rev* 60:261–310.
- Busquets X, Escribá PV, Sastre M, García-Sevilla JA (1995) Loss of protein kinase C- $\alpha\beta$ in brain of heroin addicts and morphine-dependent rats. *J Neurochem* 64:247–252.
- Büttner A, Rohrmoser K, Mall G, Penning R, Weis S (2006) Widespread axonal damage in the brain of drug abusers as evidenced by accumulation of β -amyloid precursor protein (β -APP): an immunohistochemical investigation. *Addiction* 101:1339–1346.
- Chinnaiyan AM, O'Rourke K, Tewari M, Dixit VM (1995) FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. *Cell* 81:505–512.
- Christie MJ (2008) Cellular neuroadaptations to chronic opioids: tolerance, withdrawal and addiction. *Br J Pharmacol* 154:384–396.
- Derkinderen P, Enslin H, Girault J-A (1999) The ERK/MAP-kinases cascade in the nervous system. *Neuroreport* 10:R24–R34.
- Derks NM, Müller M, Gaszner B, Tilburg-Ouwenes DTWM, Roubor EW, Kozicz LT (2008) Housekeeping genes revisited: different expressions depending on gender, brain area and stressor. *Neuroscience* 156:305–309.
- Desbarats J, Birge RB, Minouni-Rongy M, Weistein DE, Palerme JS, Newell MK (2003) Fas engagement induces neurite growth through ERK activation and p35 upregulation. *Nat Cell Biol* 5:118–125.
- Escribá PV, Sastre M, García-Sevilla JA (1994) Increased density of guanine nucleotide-binding proteins in the postmortem brains of heroin addicts. *Arch Gen Psychiatry* 51:494–501.
- Everitt BJ, Hutcheson DM, Ersche KD, Pelloux Y, Dalley JW, Robbins TW (2007) The orbital prefrontal cortex and drug addiction in laboratory animals and humans. *Ann N Y Acad Sci* 1121:576–597.
- Fellin T (2009) Communication between neurons and astrocytes: relevance to the modulation of synaptic and network activity. *J Neurochem* 108:533–544.
- Ferrer-Alcón M, La Harpe R, Guimón J, García-Sevilla JA (2003) Downregulation of neuronal cdk5/p35 in opioid addicts and opiate-treated rats: relation to neurofilament phosphorylation. *Neuropsychopharmacology* 28:947–955.
- Ferrer-Alcón M, García-Fuster MJ, La Harpe R, García-Sevilla JA (2004) Long-term regulation of signalling components of adenyl cyclase and mitogen-activated protein kinase in the pre-frontal cortex of human opiate addicts. *J Neurochem* 90:220–230.
- Formstecher E, Ramos JW, Fauquet M, Calderwood DA, Hsieh J-C, Canton B, Nguyen X-T, Barnier J-V, Camonis J, Ginsberg MH, Chneiweiss H (2001) PEA-15 mediates cytoplasmic sequestration of ERK MAP kinase. *Dev Cell* 1:239–250.
- Fuster JM (2001) The prefrontal cortex: an update: time is of the essence. *Neuron* 30:319–333.
- García-Fuster MJ, Miralles A, García-Sevilla JA (2007) Effects of opiate drugs on Fas-associated protein with death domain (FADD) and effector caspases in the rat brain: regulation by the ERK1/2 MAP kinase pathway. *Neuropsychopharmacology* 32:399–411.
- García-Fuster MJ, Ramos-Miguel A, Miralles A, García-Sevilla JA (2008a) Opioid receptor agonists enhance the phosphorylation state of Fas-associated death domain (FADD) protein in the rat brain: functional interactions with casein kinase I α , G α_i proteins, and ERK1/2 signaling. *Neuropharmacology* 55:886–899.
- García-Fuster MJ, Ramos-Miguel A, Rivero G, La Harpe R, Meana JJ, García-Sevilla JA (2008b) Regulation of the extrinsic and intrinsic apoptotic pathways in the prefrontal cortex of short- and long-term human opiate abusers. *Neuroscience* 157:105–119.
- García-Sevilla JA, Ventayol P, Busquets X, La Harpe R, Walzer C, Guimón J (1997) Regulation of immunolabelled μ -opioid receptors and protein kinase C- α and ζ isoforms in the frontal cortex of human opiate addicts. *Neurosci Lett* 226:29–32.
- Gilman CP, Mattson MP (2002) Do apoptotic mechanisms regulate synaptic plasticity and growth-cone motility? *Neuromol Med* 2:197–213.
- Girault J-A, Valjent E, Caboche J, Hervé D (2007) ERK2: a logical AND gate critical for drug-induced plasticity? *Curr Opin Pharmacol* 7:77–85.
- Glick SD, Merski C, Steindorf S, Wang S, Keller RW, Carlson JN (1992) Neurochemical predisposition to self-administer morphine in rats. *Brain Res* 578:215–220.
- Gross SD, Anderson RA (1998) Casein kinase I: spatial organization and positioning of a multifunctional protein kinase family. *Cell Signal* 10:699–711.
- Hering H, Sheng M (2001) Dendritic spines: structure, dynamics and regulation. *Nat Rev Neurosci* 2:880–888.
- Hyman SE (2005) Addiction: A disease of learning and memory. *Am J Psychiatry* 162:1414–1422.
- Jaffe JH (1990) Drug addiction and drug abuse. In: Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics, 8th ed (Gilman AG, Rall TW, Nies AS, Taylor P, eds), pp 522–573. New York: Pergamon Press.
- Kalivas PW, O'Brien C (2008) Drug addiction as a pathology of staged neuroplasticity. *Neuropsychopharmacol Rev* 33:166–180.
- Kitsberg D, Formstecher E, Fauquet M, Kubes M, Cordier J, Canton B, Pan G-H, Rolli M, Glowinski J, Chneiweiss H (1999) Knock-out of the neural death effector domain protein PEA-15 demonstrates that its expression protects astrocytes from TNF- α -induced apoptosis. *J Neurosci* 19:8244–8251.
- Kuan C-Y, Yang DD, Samanta Roy DR, Davis RJ, Rakic P, Flavell RA (1999) The Jnk1 and Jnk2 protein kinases are required for regional specific apoptosis during early brain development. *Neuron* 22:667–676.
- Kuan C-Y, Whitmarsh AJ, Yang DD, Liao G, Schloemer AJ, Dong C, Bao J, Banasiak KJ, Haddad GG, Flavell RA, Davis RJ, Rakic P (2003) A critical role of neural-specific JNK3 for ischemic apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:15184–15189.
- Liao D, Lin H, Law PY, Loh HH (2005) Mu-opioid receptors modulate the stability of dendritic spines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:1725–1730.
- Liao D, Grigoriants OO, Wang W, Wiens K, Loh HH, Law PY (2007) Distinct effects of individual opioids on the morphology of spines depend upon the internalization of mu opioid receptors. *Mol Cell Neurosci* 35:456–469.
- Linder MC, Goode CA (1991) Biochemistry of copper. New York: Plenum Press.
- Lyoo IK, Pollack MH, Silveri MM, Ahn KH, Diaz CI, Hwang J, Kim SJ, Yurgelun-Todd DA, Kaufman MJ, Renshaw PF (2006) Prefrontal and temporal gray matter density decreases in opiate dependence. *Psychopharmacology* 184:139–144.
- Marie-Claire C, Courtin C, Roques BP, Noble F (2004) Cytoskeletal genes regulation by chronic morphine treatment in rat striatum. *Neuropsychopharmacology* 29:2208–2215.
- Mattson MP (2007) Mitochondrial regulation of neuronal plasticity. *Neurochem Res* 32:707–715.
- Mattson MP, Gleichmann M (2005) The neuronal death protein Par 4 mediates dopaminergic synaptic plasticity. *Mol Interv* 5:278–281.
- Mazzucchelli C, Vantaggiato C, Ciamei A, Fasano S, Pakhotin P, Krezel W, Welzl H, et al. (2002) Knockout of ERK1 MAP kinase enhances synaptic plasticity in the striatum and facilitates striatal-mediated learning and memory. *Neuron* 34:807–820.
- Meana JJ, González-Maeso J, García-Sevilla JA, Guimón J (2000) μ -Opioid receptor and α_2 -adrenoceptor agonist stimulation of [35 S]GTP γ S binding to G proteins in postmortem brains of opioid addicts. *Mol Psychiatry* 5:308–315.
- Miller EK, Cohen JD (2001) An integrative theory of prefrontal cortex function. *Annu Rev Neurosci* 24:167–202.
- Moghaddam B, Homayoun H (2008) Divergent plasticity of prefrontal cortex networks. *Neuropsychopharmacol Rev* 33:42–55.
- Morón JA, Abul-Husn NS, Rozenfeld R, Dolios G, Wang R, Devi LA (2007) Morphine administration alters the profile of hippocampal postsynaptic density-associated proteins. *Mol Cell Proteom* 6:29–42.

- Motulsky H (1995) *Intuitive biostatistics*. New York: Oxford University Press.
- Muller DL, Unterwald EM (2004) In vivo regulation of extracellular signal-regulated protein kinase (ERK) and protein kinase B (Akt) phosphorylation by acute and chronic morphine. *J Pharmacol Exp Ther* 310:774–782.
- Narita M, Miyatake M, Narita M, Shibasaki M, Shindo K, Nakamura A, Kuzumaki N, Nagumo Y, Suzuki T (2006) Direct evidence of astrocytic modulation in the development of rewarding effects induced by drugs of abuse. *Neuropsychopharmacology* 31:2476–2488.
- Ozaita A, Escribá PV, Ventayol P, Murga C, Mayor F Jr, García-Sevilla JA (1998) Regulation of G protein-coupled receptor kinase 2 in brains of opiate-treated rats and human opiate addicts. *J Neurochem* 70:1249–1257.
- Park S-M, Schickel R, Peter ME (2005) Nonapoptotic functions of FADD-binding death receptors and their signaling molecules. *Curr Opin Cell Biol* 17:610–616.
- Perret G, Déglon JJ, Kreek MJ, Ho A, La Harpe R (2000) Lethal methadone intoxications in Geneva, Switzerland, from 1994 to 1998. *Addiction* 95:1647–1653.
- Polakiewicz RD, Schiefler SM, Gingras A-C, Sonenberg N, Comb MJ (1998) μ -Opioid receptor activates signaling pathways implicated in cell survival and translational control. *J Biol Chem* 273:23534–23541.
- Ramos JW (2008) Pea15. *UCSD Nat Mol Pages*, doi:10.1038/mp.a002536.01.
- Ramos-Miguel A, García-Fuster MJ, Callado LF, La Harpe R, Meana JJ, García-Sevilla JA (2008) Regulation of phosphorylated forms of the proteins FADD, MAPKs, and PEA-15 in the prefrontal cortex of human opioid abusers. *Eur Neuropsychopharmacol* 18 (Suppl 4):S543.
- Rehm J, Frick U, Hartwig C, Gutzwiller F, Gschwend P, Uchtenhagen A (2005) Mortality in heroin-assisted treatment in Switzerland 1994–2000. *Drug Alcohol Depend* 79:137–143.
- Reich A, Spering C, Schulz JB (2008) Death receptor Fas (CD95) signaling in the central nervous system: tuning neuroplasticity? *Trends Neurosci* 31:478–486.
- Renganathan H, Vaidyanathan H, Knapinska A, Ramos JW (2005) Phosphorylation of PEA-15 switches its binding specificity from ERK/MAPK to FADD. *Biochem J* 390:729–735.
- Robinson TE, Kolb B (1999) Morphine alters the structure of neurons in the nucleus accumbens and neocortex of rats. *Synapse* 33:160–162.
- Robinson TE, Gorny G, Savage VR, Kolb B (2002) Widespread but regionally specific effects of experimenter- versus self-administered morphine on dendritic spines in the nucleus accumbens, hippocampus, and neocortex of adult rats. *Synapse* 46:271–279.
- Russo SJ, Bolanos CA, Theobald DE, DeCarolis NA, Renthal W, Kumar A, Winstanley CA, Renthal NE, Wiley MD, Self DW, Russell DS, Neve RL, Eisch AJ, Nestler EJ (2007) IRS2-Akt pathway in midbrain dopamine neurons regulates behavioral and cellular responses to opiates. *Nat Neurosci* 10:93–99.
- Salahpour A, Bonin H, Bhalla S, Petäjä-Repo U, Bouvier M (2003) Biochemical characterization of β_2 -adrenergic receptor dimers and oligomers. *Biol Chem* 384:117–123.
- Sandu C, Morisawa G, Wegorzewska I, Huang T, Arechiga AF, Hill JM, Kim T, Walsh CM, Werner MH (2006) FADD self-association is required for stable interaction with an activated death receptor. *Cell Death Differ* 13:2052–2061.
- Schoenbaum G, Shaham Y (2008) The role of orbitofrontal cortex in drug addiction: a review of preclinical studies. *Biol Psychiatry* 63:256–262.
- Scott FL, Stec B, Pop C, Dobaczewska MK, Lee JJ, Monosov E, Robinson H, Salvesen GS, Schwarzenbacher R, Riedl SJ (2009) The Fas-FADD death domain complex structure unravels signaling by receptor clustering. *Nature* 457:1019–1022.
- Screaton RA, Kiessling S, Sanson OJ, Millar CB, Maddison K, Bird A, Clarke AR, Frisch SM (2003) Fas-associated death domain protein interacts with methyl-CpG binding domain protein 4: A potential link between genome surveillance and apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:5211–5216.
- Sharif A, Renault F, Beuvon F, Castellanos R, Canton B, Barbeito L, Junier MP, Chneiweiss H (2004) The expression of PEA-15 (phosphoprotein enriched in astrocytes of 15 kDa) defines subpopulations of astrocytes and neurons throughout the adult mouse brain. *Neuroscience* 126:263–275.
- Sklair-Tavron L, Shi W-X, Lane SB, Harris HW, Bunney BS, Nestler EJ (1996) Chronic morphine induces visible changes in the morphology of mesolimbic dopamine neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:11202–11207.
- Song G, Ouyang G, Bao S (2005) The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival. *J Cell Mol Med* 9:59–71.
- Spiga S, Serra GP, Puddu MC, Foddai M, Diana M (2003) Morphine withdrawal-induced abnormalities in the VTA: confocal laser scanning microscopy. *Eur J Neurosci* 17:605–612.
- Thomas GM, Huganir RL (2004) MAPK cascade signalling and synaptic plasticity. *Nat Rev Neurosci* 5:173–183.
- Thomas MJ, Kalivas PW, Shaham Y (2008) Neuroplasticity in the mesolimbic dopamine system and cocaine addiction. *Br J Pharmacol* 154:327–342.
- Trenca A, Perfetti A, Cassese A, Vigliotta G, Miele C, Oriente F, Santopietro S, Giacco F, Condorelli G, Formisano P, Beguinot F (2003) Protein kinase B/Akt binds and phosphorylates PED/PEA-15, stabilizing its antiapoptotic action. *Mol Cell Biol* 23:4511–4521.
- Valjent E, Corbillé A-G, Bertran-Gonzalez J, Hervé D, Girault J-A (2006) Inhibition of ERK pathway or protein synthesis during reexposure to drugs of abuse erases previously learned place preference. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:2932–2937.
- Valmiki MG, Ramos JW (2009) Death effector domain-containing proteins. *Cell Mol Life Sci* 66:814–830.
- Ventayol P, Busquets X, García-Sevilla JA (1997) Modulation of immunoreactive protein kinase C- α and β isoforms and G proteins by acute and chronic treatments with morphine and other opiate drugs in rat brain. *Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol* 355:491–500.
- Volkow ND, Fowler JS, Wang GJ (2003) The addicted human brain: insights from imaging studies. *J Clin Invest* 111:1444–1451.
- Weng Z, Signore AP, Gao Y, Wang S, Zhang F, Hastings T, Yin X-M, Chen J (2007) Leptin protects against 6-hydroxydopamine-induced dopaminergic cell death via mitogen-activated protein kinase signaling. *J Biol Chem* 282:34479–34491.
- Xia Z, Dickens M, Raingeaud J, Davis RJ, Greenberg ME (1995) Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science* 270:1326–1331.
- Zhang J, Zhang D, Hua Z (2004) FADD and its phosphorylation. *IUBMB Life* 56:395–401.
- Zuliani C, Kleber S, Klusmann S, Wenger T, Kenzelmann M, Schreglmann N, Martínez A, del Río JA, Soriano E, Vodrazka P, Kuner R, Groene HJ, Herr I, Krammer PH, Marín-Villalba A (2006) Control of neuronal branching by the death receptor CD95 (Fas/Apo-1). *Cell Death Differ* 13:31–40.

Material complementario (Artículo III)

Regulación de CK1 α en la corteza prefrontal de consumidores de opiáceos de corto (ST) y largo (LT) plazo

En la corteza prefrontal (homogenado total) de los consumidores de opiáceos, la densidad de CK1 α , el principal enzima que fosforila a FADD en la Ser194, no se encontró alterada en comparación con aquella valorada (100%) en los sujetos control con quienes fueron emparejados (todos los adictos: 98 \pm 5%; ST: 100 \pm 8%; LT, 97 \pm 5%) (figura S3-1).



◀ **Figura S3-1.** Inmunodensidad de CK1 α en la corteza prefrontal (BA 9) de consumidores de opiáceos (all addicts; n = 28), y en los subgrupos ST (n = 12) y LT (n = 16), en porcentaje respecto a los controles con quienes fueron emparejados. En el panel inferior se muestra un autorradiograma representativo de cada uno de los grupos estudiados, incluyendo dos controles (C1 y C2), y dos adictos (A1-4) ST y LT.

Análisis de variables potencialmente conflictivas en estudios post mórtem

Los datos obtenidos en la evaluación de las proteínas asociadas a neuroplasticidad, excluyendo o aislando algunas de las variables potencialmente conflictivas, se encuentran resumidos en la tabla S3-1. Por ejemplo, al evaluar los contenidos de las diferentes proteínas como el cociente entre la forma fosforilada y, en el caso de las kinasas, la forma total del enzima (cociente empleado como marcador de la actividad enzimática) o, en el caso de p-FADD y p-PEA-15, la β -actina, el resultado no fue diferente del obtenido evaluando únicamente la forma fosforilada (tabla S3-1, “cociente fosfo/total”). En este estudio los resultados de las proteínas fosforiladas se presentan sin corrección por algún control de carga puesto que no se halla en la literatura científica anterior a esta publicación una referencia explícita sobre si la adicción a opiáceos modula la expresión de estas proteínas (habitualmente empleadas como controles negativos) en la corteza prefrontal humana. El efecto agudo de una inyección letal de heroína o metadona podría también enmascarar el efecto de la administración crónica de estos opiáceos. Para descartar que las alteraciones neuroquímicas observadas pudieran ser debidas o modificadas por el efecto agudo de estas sustancias, se aislaron los resultados obtenidos en aquellos sujetos con las concentraciones plasmáticas de opiáceos más elevadas (tabla S3-1, “nivel alto de opiáceos”). En estos subgrupos de adictos,

ninguna de las proteínas estudiadas estuvo alterada significativamente con respecto a las poblaciones originales de adictos ST y LT, con la excepción de p-ERK1/2 en los consumidores ST. Congruentemente, en este sentido, está bien documentado que, de forma aguda, los fármacos opioides incrementan la activación de esta quinasa en numerosas regiones cerebrales, incluyendo la corteza prefrontal, en animales de experimentación (revisado en Zhai et al., 2008). Así pues, los efectos sobre las proteínas estudiadas observados en la corteza prefrontal de adictos a opiáceos son principalmente debidos al consumo repetido y no al efecto agudo de la administración letal de estas sustancias de abuso.

Tabla S3-1. Análisis de los resultados aislando o excluyendo variables potencialmente conflictivas.

Grupos y subgrupos	Inmunodensidad en porcentaje respecto a sus controles (promedio±SEM)						
	Monómero p-FADD	Oligómero p-FADD	p-ERK	p-JNK	p-p38 MAPK	p-Ser116 PEA-15	p-Akt
CONSUMIDORES ST							
Todos los sujetos ST (n=11)	151±22	123±16	75±24	100±20	71±18	82±16	90±15
Cociente fosfo/total (n=11)	149±20*	130±23*	71±19	125±25	68±26	84±18*	95±18
Nivel alto de opiáceos (n=4)	124±25	130±20	150±47	127±28	90±47	92±25	89±22
Sólo opiáceos (n=7)	142±26	124±20	79±34	83±23	79±24	73±18	85±20
Hombres (n=10)	152±25	128±17	74±26	90±20	75±19	86±17	91±17
Mujeres (n=1)	148	73	77	186	31	46	83
Emparejados por sexo (n=11)	151±22	123±16	75±24	100±20	71±18	82±16	90±15
ADICTOS LT							
Todos los sujetos LT (n=16)	175±19	111±14	48±7	49±9	103±16	57±6	59±9
Cociente fosfo/total (n=16)	179±19*	111±17*	50±9	61±12	85±14	56±6*	57±10
Nivel alto de opiáceos (n=7)	193±32	85±14	33±5	39±11	95±16	48±8	50±9
Sólo opiáceos (n=3)	202±18	74±15	48±15	76±30	52±8	73±4	39±18
Hombres (n=7)	190±36	118±23	61±11	65±16	85±18	70±6	61±14
Mujeres (n=9)	162±16	105±20	40±9	36±8	115±23	50±7	58±11
Emparejados por sexo (n=10)	154±16	94±16	49±9	56±11	103±21	60±7	47±7
TODOS LOS ADICTOS							
Todos los sujetos (n=27)	165±14	116±11	60±11	70±11	89±12	68±8	72±8
Cociente fosfo/total (n=27)	162±13*	119±14*	59±10	88±14	83±13	68±8*	73±10
Nivel alto de opiáceos (n=11)	168±24	102±13	76±28	68±19	93±20	66±13	63±63
Sólo opiáceos (n=10)	158±21	111±16	69±24	81±18	71±17	73±12	71±16
Hombres (n=17)	168±21	124±13	69±17	80±13	79±13	80±11	80±12
Mujeres (n=10)	160±14	102±18	44±9	53±18	105±22	50±6	60±11
Emparejados por sexo (n=21)	153±14	110±12	63±13	79±13	86±14	72±9	69±10

* Cociente entre fosfo-proteína y β -actina.

Otro factor a tener en cuenta es el policonsumo de sustancias de abuso y la comorbidad que de forma habitual presentan los adictos a opiáceos. Por ejemplo, la cocaína, así como otros psicoestimulantes, podrían inducir apoptosis en neuronas corticales (revisado en Cunha-Oliveira et al., 2008), y actúa sobre los mismos mecanismos moleculares efectores de

neuroplasticidad que los opioides (revisado en Lu et al., 2006; Girault et al., 2007). Además, las kinasas estudiadas en este trabajo, así como algunos mecanismos apoptóticos, parecen jugar un papel importante en trastornos como la depresión mayor o la esquizofrenia (Kyosseva, 2004; Mathew et al., 2008; Drzyzga et al., 2009). Es preciso destacar que entre la población de adictos estudiados se halló la presencia plasmática de antidepresivos (n=9) o antipsicóticos (n=4), pero en ningún caso de cocaína o psicoestimulante alguno, así como la inclusión de tres adictos diagnosticados con depresión mayor (tabla 1). Además, se hallaron rastros de psicoestimulantes en las muestras capilares de 12 adictos LT, indicando un pasado de policonsumo pero con preferencia por los opiáceos (tabla 1). Para analizar el posible sesgo por la presencia de las distintas sustancias psicoactivas, se aisló un subgrupo de adictos ST y LT que presentaban toxicología negativa (con la excepción de opioides) en pelo y sangre (tabla S3-1, “sólo opiáceos”). Los datos obtenidos en estos subgrupos no difieren de los observados en las poblaciones totales de adictos, confirmando que las alteraciones observadas en la corteza prefrontal de estos adictos se deben principalmente al consumo de opiáceos.

También se estudiaron por separado los resultados obtenidos en hombres y mujeres. Los resultados muestran que el consumo de opioides tiene el mismo efecto sobre las proteínas de la corteza prefrontal analizadas en ambos sexos (tabla S3-1). De forma similar al PMD y la edad, los adictos fueron emparejados en su mayoría con controles del mismo sexo. No obstante, esto no fue siempre posible (6 de los 27 adictos incluidos en el estudio de las proteínas relacionadas con la neuroplasticidad fueron emparejados con controles de distinto sexo), y por tanto se analizaron los resultados excluyendo a estas parejas de controles y adictos (todos ellos pertenecientes al grupo LT). Como se muestra en la tabla S3-1, el emparejamiento por sexo no influyó sobre los resultados obtenidos en este estudio.

En resumen, puede concluirse que ninguna de las variables analizadas ha podido sesgar de forma significativa los resultados presentados en este trabajo.

ARTÍCULO IV

Título The time course of unconditioned morphine-induced psychomotor sensitization mirrors the phosphorylation of FADD and MEK/ERK in rat striatum: role of PEA-15 as a FADD-ERK binding partner in striatal plasticity

Autores Ramos-Miguel A, Esteban S, García-Sevilla JA

Revista European Neuropsychopharmacology, 2010; 20: 49-64

Resumen

Las drogas de abuso inducen complejas neuroadaptaciones que conducen a alteraciones conductuales, y cuyas bases moleculares son clave para comprender los mecanismos de acción de estas sustancias. Recientemente se ha sugerido que FADD, el adaptador de la señalización de los receptores de muerte, podría participar en la mediación de la neuroplasticidad inducida por opiáceos. En este estudio se ha investigado la regulación de FADD y las vías de las MAPKs, así como sus interacciones con PEA-15 y Akt1, durante la expresión de la sensibilización locomotora (no condicionada) inducida por morfina. En este modelo, ratas previamente expuestas a la morfina (10 mg/kg/día, durante 5 días), respondieron con un incremento aberrante de la locomoción (expresión de la sensibilización) a una nueva dosis de morfina, en comparación con las ratas que habían sido pre-tratadas con salino, tras 3 días (SW 3) en ausencia del opiáceo, pero no cuando habían transcurrido 14 días (SW 14) después de la última dosis. Congruentemente, el recambio de dopamina se observó acelerado en SW 3, pero no en SW 14, tras las mismas dosis finales de morfina y en comparación con las ratas control. De forma paralela, los contenidos de p-FADD, así como los de las formas activas de MEK/ERK, y Akt1/PEA-15 se hallaron sobre-expresados en el estriado y la corteza cerebral de ratas en SW 3. Todas estas alteraciones remitieron en SW 14. Interesantemente, el bloqueo parcial de la vía de las MAPKs, mediante la administración de SL 327 (inhibidor de MEK/ERK), atenuó la expresión de la sensibilización locomotora tras la administración de la dosis final de morfina en SW 3. Esta inhibición previno completamente la sobre-expresión de p-FADD y la activación de Akt1/PEA-15. Estos resultados indican que la activación de ERK durante la abstinencia al opiáceo es necesaria para la expresión de la sensibilización psicomotriz a la morfina. Además, la interacción de ERK con FADD y PEA-15 podría ser relevante en la inducción de las adaptaciones córtico-estriatales que subyacen en este modelo de plasticidad conductual.



ELSEVIER

www.elsevier.com/locate/euroneuro



The time course of unconditioned morphine-induced psychomotor sensitization mirrors the phosphorylation of FADD and MEK/ERK in rat striatum: Role of PEA-15 as a FADD-ERK binding partner in striatal plasticity

Alfredo Ramos-Miguel, Susana Esteban, Jesús A. García-Sevilla *

Laboratorio de Neurofarmacología, IUNICS, Universitat de les Illes Balears, and Red Temática de Investigación Cooperativa en Salud (Trastornos Adictivos), Palma de Mallorca, Balears, Spain

Received 26 May 2009; received in revised form 21 July 2009; accepted 18 August 2009

KEYWORDS

Morphine;
Psychomotor sensitization;
FADD;
ERK;
PEA-15;
Akt1;
Rat brain

Abstract

Drugs of abuse induce behavioral neuroadaptations whose molecular mechanisms, partly known, are crucial to understand drug addictions. The multifunctional adaptor Fas-associated protein with death domain (FADD) was recently associated with the induction of neuroplasticity. This study investigated the modulation of FADD and MAP kinase signaling, as well as their interactions with PEA-15 (phosphoprotein enriched in astrocytes–15 kDa) and Akt1 pathways, during the expression of unconditioned morphine-induced psychomotor sensitization. In morphine-pretreated rats (10 mg/kg during 5 days), a challenge dose of the opiate induced a robust psychomotor sensitization at early withdrawal (3 days, SW 3), but not after a prolonged abstinence period (14 days), which was coincident with an accelerated dopamine turnover in the striatum. Marked concomitant increases in the content of p-FADD (48%) and the activation of MEK-ERK (46–79%) were quantified during the short-term expression of morphine sensitization (SW 3, in the absence of morphine challenge). At SW 3, p-PEA-15, a FADD-ERK binding partner, was also upregulated (51%) as well as the activation of its phosphorylating Akt1 kinase (49%). Notably, the MEK inhibitor SL 327 attenuated (58%) the expression of morphine-induced psychomotor sensitization (SW 3) and fully prevented the upregulation of p-FADD, p-PEA-15 and p-Akt1 at SW 3. The results indicate that the activation of MEK/ERK, the upregulation of p-FADD and that of the linking partners PEA-15/Akt1 have a major role in mediating the short-lasting expression of unconditioned psychomotor sensitization induced by morphine in rats.

© 2009 Elsevier B.V. ECNP. All rights reserved.

* Corresponding author. Laboratory of Neuropharmacology, IUNICS, University of the Balearic Islands, Cra. Valldemossa km 7.5, Palma de Mallorca (Balears), E-07122 Spain. Tel.: +34 971 173 148; fax: +34 971 173 184.

E-mail address: jesus.garcia-sevilla@uib.es (J.A. García-Sevilla).

1. Introduction

Repeated exposure to drugs of abuse leads to complex genetic, molecular and cellular interactions in the brain, which underlie the aberrant and long-lasting behaviors associated with drug addiction (Kalivas and O'Brien, 2008; McClung and Nestler, 2008; Thomas et al., 2008; Russo et al., 2009). Although much work has been done to unravel the brain adaptive processes by which opiate addiction is achieved (e.g. tolerance, sensitization, craving and relapse), further studies are still needed to link specific neural substrates with the induction of neuroadaptations. In this context, different morphine treatments in rats have been associated with structural changes of neurons in cortical and subcortical areas (Robinson and Kolb, 1999, 2004; Ballesteros-Yáñez et al., 2007) and with alterations of several signaling pathways (Christie, 2008; Befort et al., 2008; Romanova et al., 2009), which together could explain, in part, the induction of various forms of behavioral plasticity. In particular, the anti-apoptotic pathways mediated by the extracellular signal-regulated kinases (ERK1/2) and the kinase Akt or protein kinase B have been shown to play crucial roles in mediating morphine reward in rodents (Mazzucchelli et al., 2002; Valjent et al., 2006a; Russo et al., 2007).

The intracellular adaptor Fas-associated protein with death domain (FADD; Chinnaiyan et al., 1995; Valmiki and Ramos, 2009) is a key molecule transmitting the signal of death receptors after a process of self-association into oligomeric forms (Algeciras-Schimnich et al., 2002; Scott et al., 2009). Besides the pro-apoptotic function, Fas and FADD have additional roles in cell growth and differentiation (Park et al., 2005; Valmiki and Ramos, 2009), including the induction of neurite outgrowth in cultured dorsal root ganglion neurons through the activation of ERK (Desbarats et al., 2003). The Fas/FADD complex also appears to mediate non-apoptotic signals in the central nervous system, which can result in various forms of synaptic plasticity (Reich et al., 2008; García-Fuster et al., 2009). Most of the non-apoptotic activities of FADD are regulated by phosphorylation of a single serine site (mouse: Ser191; human: Ser194) mediated by casein kinase 1 α (Alappat et al., 2005), although other kinases could participate as well (Rochat-Steiner et al., 2000; Zhang et al., 2004). Interestingly, opiate drugs have been shown to induce downregulation of FADD and upregulation of p-Ser191/194 FADD in rat and human brains, which may favor the non-apoptotic (neuroplastic) actions of this multifunctional protein (García-Fuster et al., 2007, 2008a,b; Ramos-Miguel et al., 2009). In particular, FADD and p-Ser194 FADD, through interactions with ERK and Akt1 mediated by PEA-15 (phosphoprotein enriched in astrocytes of 15 kDa; Araujo et al., 1993; Ramos, *in press*), could participate in the development of structural and behavioral plasticity such as the induction of tolerance to opiate reward in chronic human addicts (Ramos-Miguel et al., 2009).

Morphine-induced locomotor sensitization is a well-established model to investigate molecular mechanisms associated with behavioral plasticity. Thus, rats repeatedly exposed to morphine display (through a naltrexone-sensitive mechanism) progressively increase in motor activity (Babbini and Davis, 1972; Smith et al., 2009) and exhibit an enhanced locomotion when subsequently challenged with the opiate agonist after cessation of treatment (Babbini et al., 1975). This behavioral sensitization to morphine increases with time and is long-lasting

(Babbini et al., 1975) and, notably, its expression is facilitated by conditioned environmental cues (i.e., context-dependent sensitization; Vezina and Stewart, 1984; Badiani et al., 2000; Badiani and Robinson, 2004). This context-dependent sensitization has been shown to be of great relevance in the long-term process of drug abuse and may influence vulnerability in human addicts (O'Brien, 2006). In the present study, however, a context-independent paradigm was used in order to unravel new neuroadaptations induced by morphine in the rat brain without the influence of conditioned cues on behavior which could mask the primary effects of the opiate agonist.

Against this background, the present study investigated in the rat corpus striatum and cerebral cortex the modulation of FADD content, the signaling mediated by canonical mitogen-activated protein (MAP) kinases [MEK/ERK, c-Jun NH₂-terminal kinase (JNK) and p38 kinase] as well as their interactions with PEA-15 and Akt1 pathways during the expression of unconditioned morphine-induced psychomotor sensitization in order to evaluate specific opiate effects. A preliminary account of this work was given at the 20th Congress of the European College of Neuropsychopharmacology (Ramos-Miguel et al., 2007).

2. Experimental procedures

2.1. Animals

Male Sprague–Dawley rats (180–220 g) were used (Charles River, Barcelona, Spain). The rats were initially housed in the animal facilities for 1 week in methacrylate cages (Panlab s.l., Barcelona) with wood shavings for nesting material (Ultrasorb, Panlab) under controlled environmental conditions of temperature (20 \pm 2 °C), humidity (70%) and light/dark cycle (light period: 8:00 to 20:00), and they had free access to a standard diet (Panlab A04) and tap water. The animals were handled daily for several days before the behavioral and neurochemical experiments (see below) to reduce stress during testing. The studies were performed in accordance with the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes (Directive 86/609/EEC) and in agreement with the Bioethical Committee of the University of the Balearic Islands (UIB).

2.2. Drugs

Morphine hydrochloride was obtained from Unión Químico-Farmacéutica (Madrid, Spain) and dissolved in 0.9% saline. The MEK1/2 inhibitor SL 327, [α -amino-(4-aminophenylthio)-methylene-2-(trifluoromethyl)-benzeneacetonitrile], was purchased from Tocris Cookson Ltd. (Avonmouth, UK) and dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO).

2.3. Measurement of locomotion in rats: 24-hour recording with circadian rhythmicity

Spontaneous motor activity and morphine-induced psychomotor sensitization were monitored in individual rats during 2–3 weeks without interruption in order to obtain time series in each animal, which were subsequently analyzed to quantitate changes in locomotion along the circadian rhythm by use of a specific software package (see below). Rat treatments with saline, morphine and SL 327 were performed in the same recording cages (home cage conditions), and consequently the component of psychomotor sensitization to morphine facilitated by any environmental novelty during drug administration and testing (Badiani and Robinson, 2004; Borgkvist et al., 2008) was not present in the current experimental setting. Therefore, only the

component of psychomotor sensitization induced by morphine treatment was evaluated.

The rats were individually housed in transparent cages (22 cm × 22 cm × 15 cm, Panlab), which were placed in a sound-attenuated chamber under controlled environmental conditions (12/12 h photoperiod with fluorescent tubes producing ≈300 lx of reflected cool white light during the light phase) and with free access to food and water. The motor activity of each rat was monitored by a system of two crossed perpendicular infrared beams placed 7 cm above the cage floor. Motor activity accounts (number of beam interruptions) were accumulated at consecutive intervals of 15 min and automatically stored in a computer for further analysis. The rats were housed in the recording cages 7 days before the onset of saline or morphine treatment, and at the end of this period of acclimatization (days 5 and 7) they received (9:00 a.m.) intraperitoneal (i.p.) injections of saline (0.9% NaCl, 1 ml/kg) to assess the basal value of motor activity (BL1 and BL2). As expected, pronounced increases in locomotion were registered during the first 15–30 min as a consequence of rat manipulation and i.p. injection (Fig. 1a), and, therefore, these beam-cuts were excluded from the analyses. In all the experiments, the quantification of psychomotor activity was limited to the number of beam-cuts accumulated during the following 90 min (i.e., beam-cuts registered from 9:30 to 11:00 a.m.). The recording of motor activity (basal, morphine treatments, and expression and modulation of morphine-induced psychomotor sensitization) was assessed up to 22 days without interruptions. Time series analyses of motor activity (i.e., histograms of data summed into 15-minute bins) were conducted by means of an integrated package for time series analysis in chronobiology ("El Temps©", A. Díez-Noguera, Grup de Cronobiologia, Universitat de Barcelona, 1999, Spain; available at <http://www.el-temps.com>) (e.g. see Campuzano et al., 1998; Anglès-Pujolràs et al., 2009) and statistical analyses done as described below.

2.4. Behavioral and neurochemical experiments

Groups of randomly allocated rats were initially treated with one daily i.p. injection of saline (1 ml/kg) or morphine (10 mg/kg) for 5 days. To assess the expression of psychomotor sensitization, the rats were subjected to saline or opiate abstinence and received a morphine challenge (10 mg/kg, i.p.) following 3 or 14 days of withdrawal (SW 3 or SW 14), evaluating motor activity 30 min after the acute opiate challenge. Similar intermittent morphine treatments in rodents were shown to promote the expression of psychomotor sensitization without the induction of somatic signs of morphine withdrawal during the abstinence period (e.g. see Bartoletti et al., 1983; Vanderschuren et al., 1997; McDaid et al., 2006; Cordonnier et al., 2007). Because only a limited number of rats can be processed simultaneously, two independent but identical behavioral trials were performed, and the magnitude of the unconditioned expression of morphine sensitization was similar in both experiments (see SW 3 in Figs. 1a/b and 7a/b).

To complement the first behavioral experiment (Fig. 1), the modulation of dopamine and its major metabolites (3,4-dihydroxyphenylacetic acid, DOPAC; homovanillic acid, HVA) in the corpus striatum of similarly treated rats was evaluated by HPLC-ED as described (Moranta et al., 2009). The concentrations of dopamine, DOPAC and HVA were quantified 2 h, 3 days (SW 3) or 14 days (SW 14) after the repeated treatment with saline or morphine (basal levels). The content of dopamine, DOPAC and HVA was also assessed 2 h after a challenge injection of morphine (10 mg/kg, i.p.) in saline and morphine-pretreated rats at SW 3 and SW 14. Dopamine turnover was estimated as the ratio of both metabolites (DOPAC+HVA) to dopamine. Metabolic changes were also assessed as the DOPAC/dopamine and HVA/dopamine ratios, which reflect respectively the intra- and extra-neuronal metabolism of dopamine (Elsworth and Roth, 1997).

To investigate the modulation of FADD, MEK 1/2, ERK1/2, JNK1/2, p38 MAPK, PEA-15 and Akt1 signaling during morphine-induced psychomotor sensitization, other groups of rats were similarly treated

with saline or morphine and killed 2 h after the repeated treatments and 3 and 14 days after withdrawal (SW 3 and SW 14). In these experiments, the morphine challenge in rats subjected to saline or opiate withdrawal (SW) was avoided to allow for any inherent expression of target protein content at SW 3 and SW 14. Moreover, to assess the involvement of MEK/ERK signaling in the regulation of the basal content of FADD, PEA-15 and Akt1 in the brain, groups of rats were treated with SL 327 (10, 20, and 30 mg/kg, i.p., for 90 min), a brain-penetrating and selective inhibitor of MEK1/2 (IC₅₀: 0.18–0.22 μM; Scherle et al., 2000). The doses of SL 327 were chosen from previous studies that demonstrated effective *in vivo* MEK inhibition and/or blockade of drug effects in the brain (Ferguson and Robinson, 2004; Valjent et al., 2006a; García-Fuster et al., 2007). After these treatments, the content of target proteins (phosphorylated and total protein forms) was quantified in selected brain regions as described below.

The second behavioral experiment (Fig. 7) was designed to assess the implication of FADD, PEA-15 and Akt1 signaling, through the involvement of ERK1/2, in the expression of psychomotor sensitization to morphine. Two groups of rats received morphine as above (phase of development), which was followed by the treatment of one group with three doses of SL 327 (20 mg/kg, i.p.) at 24 h (day 6), 48 h (day 7) and 72 h (day 8 or SW 3) of opiate withdrawal. After the last dose of SL 327 (30 min later), the rats received a morphine challenge (10 mg/kg, i.p.) to assess the expression of psychomotor sensitization as above. Control rats (the other group pretreated with morphine) received DMSO (1 ml/kg, i.p.), instead of SL 327, and the challenge of morphine at SW 3. For further comparison, a group of saline-pretreated rats, which also received a morphine challenge at SW 3, was included. DMSO did not alter the motor activity (Einat et al., 2003; present study) or other behavioral tests in rats (Stemmelin et al., 2005). After the behavioral experiment, these rats and other similarly treated were killed and the content of FADD, PEA-15 and Akt1 was quantified in selected brain regions as described below.

2.5. Assays for apoptotic cell death

The potential of repeated morphine treatment (10 mg/kg for 5 days) and spontaneous opiate withdrawal (SW 3 and SW 14) to induce abnormal cell death in the rat corpus striatum was monitored by measuring the cleavage of initiator caspase-8 (55 kDa pro-caspase-8 to 20 kDa active form) and nuclear enzyme poly(ADP-ribose)-polymerase (PARP-1) mediated by executioner caspase-3 (116 kDa PARP-1 to 85 kDa fragment). (García-Fuster et al., 2007, 2008a). These experiments were assessed by Western blot analysis as described below.

2.6. Brain sample preparations, immunoblot assays, and quantitation of target proteins

The rats were killed without anesthesia by decapitation. The whole corpus striatum (caudate/putamen and the nucleus accumbens) and the parieto-occipital cortex were chosen for examination because the striatum and adjacent dopaminergic structures are involved in morphine-induced psychomotor activity (Vanderschuren and Kalivas, 2000), and the cerebral cortex is also sensitive to novelty-induced locomotion in rats (García-Fuster et al., 2009). These brain regions were dissected on ice, frozen in liquid nitrogen, and stored at –80 °C. Brain samples (total homogenate) were prepared as described (García-Fuster et al., 2007). Protein concentration was determined with the BCA Assay (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA). Brain proteins (40 μg) were resolved by electrophoresis on 10% SDS-PAGE minigels (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA), which was followed by immunoblotting standard procedures (García-Fuster et al., 2007, 2008a). The primary affinity-purified antibodies (overnight incubation at 4 °C) are listed in Table 1, and were used at the appropriate dilutions (1:500–1:10,000). The blots were developed with peroxidase-conjugated secondary antibodies (1:5000 dilution; Sigma Chemical and Cell Signalling, USA), subjected to ECL detection system

(Amersham, Buckinghamshire, UK) and the signal of bound antibody visualized by exposure to autoradiographic film (Amersham ECL Hyperfilm) for 1–60 min. The autoradiograms were quantified by densitometric scanning (GS-800 Imaging Calibrated Densitometer, Bio-Rad) of the immunoreactive bands. The amount of target proteins in brain samples of rats treated with morphine or SL 327 was compared in the same gel with that of control rats (saline or DMSO). The quantification procedure was assessed 3–6 times in different gels (each gel with different brain samples from control and drug-treated rats). Percent changes in immunoreactivity with respect to control samples (100%) were calculated for each treated rat in the various gels and the mean value used as a final estimate.

The characterization and validation of antibodies (Table 1) have been reported (Kuan et al., 1999, 2003; García-Fuster et al., 2007, 2008a; Ramos-Miguel et al., 2009). Oligomeric p-FADD (~116 kDa) was immunodetected with p-Ser191 FADD antibody, and monomeric p-FADD (~20–23 kDa) with p-Ser194 FADD antibody (see García-Fuster et al., 2008a).

2.7. Data analysis and statistics

Results are expressed as mean values ± standard error of the mean (SEM). Statistical analyses were performed with the program GraphPad Prism, version 4.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA). Behavioral data were analyzed using single or repeated measures one-way analysis of variance (ANOVA) or two-way ANOVA, when appropriate, followed by *post hoc* Bonferroni's multiple comparison tests. Neurochemical data were analyzed using one-way ANOVA followed by the Bonferroni's test. The level of significance was set at $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Morphine-induced psychomotor sensitization in rats: short-lasting expression in the absence of environmental novelty

The spontaneous locomotion of saline- and morphine-treated rats displayed a clear rhythm of activity–rest that was well synchronized with the light–dark cycle and in agreement with the nocturnal behavior of this species (Fig. 1a). Compared with saline-treated rats, repeated exposure to morphine (10 mg/kg during 5 days) induced progressive increases (9- to 25-fold) in locomotor activity, which was significantly higher on days 4 and 5 (42–49%, $p < 0.05$) compared with day 1 of treatment (Figs. 1a/b and 7a/b). This phase of motor development induced by the opiate finally resulted in the expression of psychomotor sensitization to a challenge dose of morphine (10 mg/kg) at early (3 days, SW 3) but not later (14 days, SW 14) stages of opiate abstinence (Fig. 1a/b). Thus in saline-pretreated rats, the morphine challenge at SW 3 or SW 14 resulted in a similar activation of locomotion (10-fold vs BL2, Fig. 1b), which was not different from that induced by the same dose of the opiate in drug-naïve rats (Fig. 1b, day 1 of morphine treatment). In morphine-pretreated rats, the same morphine challenge at SW 3, but not at SW 14, revealed the expression of a robust psychomotor sensitization when the effect of the opiate was compared with that in control rats (increase in locomotion, SW 3: 86%, $p < 0.001$; SW 14: 12%, $p > 0.05$) (Fig. 1a/b).

In parallel experiments, and in line with the process of psychomotor sensitization to morphine (phases of development and expression), the turnover of dopamine in the corpus striatum was accelerated (Fig. 1c). In saline-pretreated rats, acute morphine (10 mg/kg) significantly increased the striatal concentrations of dopamine (77%), DOPAC (62%) and HVA (72%) (Fig. 1c; Control), and

these effects vanished with the repeated 5 days morphine treatment (data not shown). In morphine-pretreated rats, the challenge dose of morphine (10 mg/kg) further increased DOPAC and HVA, but not dopamine, at SW 3 (+131% and +116%, respectively, $p < 0.01$) but not at SW 14 (+31% and +28%, respectively, $p > 0.05$) (Fig. 1c). Consequently, increased ratios of DOPAC+HVA/dopamine (44%, $p < 0.05$), DOPAC/dopamine (46%, $p < 0.05$) and HVA/dopamine (41%, $p < 0.01$) were also quantified at SW 3 but not SW 14.

3.2. Regulation of FADD and MAP kinase signaling during the development and expression of morphine-induced psychomotor sensitization

In a parallel series of experiments, the daily treatment with morphine (10 mg/kg) for 5 days, compared with saline-treated rats, did not significantly alter the content of p-Ser191/194 FADD (oligomeric and monomeric p-forms) or that of FADD (dimeric form) in the rat corpus striatum and cerebral cortex (Fig. 2). However, in morphine-pretreated rats and 3 days after opiate withdrawal (SW 3, in the absence of morphine challenge) the content of oligomeric p-FADD was increased (25–48%, $p < 0.01$) and that of dimeric FADD decreased (20–35%, $p < 0.05$) in both brain regions, although a stronger effect was quantified in the striatum (Fig. 2). The upregulation of p-FADD and downregulation of FADD were no longer observed 14 days (SW 14) after opiate withdrawal (Fig. 2). Similar results were obtained when the contents of p-FADD and FADD (SW 3 and SW 14) were normalized to the content of β -actin (data not shown).

The repeated morphine treatment (10 mg/kg for 5 days) did not significantly alter the rate of phosphorylation (activation) of MEK1/2, ERK1 and ERK2 (ratio of p-MEK1/2, p-ERK1 or p-ERK2 to corresponding total enzyme) in the rat corpus striatum and cerebral cortex (Fig. 3). In morphine-pretreated rats, however, a concomitant and significant activation of MEK/ERK was quantified 3 days (SW 3: 46–79%, $p < 0.01$) but not 14 days (SW 14) after opiate withdrawal in the striatum (Fig. 3a/b). Similar results, although slightly weaker, were obtained for the activation of MEK and ERK in the cortex (SW 3: 25–46%, $p < 0.01$) (Fig. 3c/d).

The morphine treatment (10 mg/kg for 5 days) and the periods of opiate abstinence (SW 3 and SW 14) did not significantly alter the basal phosphorylation of pro-apoptotic JNK1/2 and p38 MAP kinases (ratio of p-enzyme to corresponding total enzyme) in the corpus striatum or cerebral cortex (Fig. 4). Moreover, morphine treatment and opiate withdrawal did not alter the pattern of cleavage of pro-caspase-8 or nuclear enzyme PARP-1 in the striatum, which indicated that initiator caspase-8 and executioner caspase-3 were not activated (data not shown).

3.3. Regulation of PEA-15 and Akt1 signaling during the development and expression of morphine-induced psychomotor sensitization

PEA-15 is a known FADD-ERK binding partner, which can also target ERK to substrates involved in neuroplasticity. Therefore, the modulation of PEA-15 and Akt1 (the kinase inducing p-Ser116 PEA-15) was investigated during the time course of morphine-induced psychomotor sensitization. The repeated morphine treatment (10 mg/kg for 5 days) did not significantly alter the content of p-Ser116 PEA-15 in the rat corpus striatum or cerebral cortex (Fig. 5a/c). However, p-PEA-15 content was upregulated

Table 1 Antibodies used for the detection and quantification of target proteins in rat brain.

Protein	Antigen	Host	Catalog	Batch	Company
p-FADD	Mouse p-FADD (peptide containing p-Ser191)	Rabbit	2785	1	Cell Signaling, USA
p-FADD	Human p-FADD (peptide containing p-Ser194)	Rabbit	sc-12439	C072	Santa Cruz, USA
FADD	Human FADD (28–208 residues)	Rabbit	sc-5559	J-2004	Santa Cruz
p-MEK1/2	Human MEK1 (short peptide containing p-Ser217/221)	Rabbit	9121	18	Cell Signaling
MEK1/2	Human MEK1/2 (synthetic peptide)	Rabbit	9122	6	Cell Signaling
p-ERK1/2	Human p44 MAPK (peptide containing p-Thr202/Tyr204)	Rabbit	9101	20	Cell Signaling
ERK1/2	Rat and human p42 MAPK (synthetic peptide)	Rabbit	442704	D33075	Calbiochem, FRG
p-JNK	Human JNK (peptide containing p-Thr183/Tyr185)	Rabbit	9251	10	Cell Signaling
JNK	Human JNK2 (GST fusion protein)	Rabbit	9252	6	Cell Signaling
p-p38 MAPK	Human p38 (peptide containing p-Thr180/Tyr182)	Rabbit	9211	16	Cell Signaling
p38 MAPK	Human p38 (synthetic peptide)	Rabbit	9212	9	Cell Signaling
p-PEA-15	Human PEA-15 (peptide containing p-Ser116)	Rabbit	44–836G	0103	BioSource Inc., USA
PEA-15	Human PEA-15 (peptide containing Leu60)	Rabbit	2780	1	Cell Signaling
p-Akt1	Mouse Akt1 (peptide containing p-Ser473)	Rabbit	9721	10	Cell Signaling
Akt1	Human Akt1, α -isoform (88–100 residues)	Rabbit	530311	D35774	Calbiochem
Caspase-8	Human caspase-8 (217–350 residues)	Rabbit	sc-7890	F-1604	Santa Cruz
PARP	Human PARP (215–228 residues)	Rabbit	512729	D33259	Calbiochem
β -actin	Human β -actin (2–16 residues)	Mouse	A1978 AC-15	016K4817	Sigma Chemical, USA

in the striatum (51%, $p < 0.05$) and cortex (35%, $p < 0.01$) following 3 days, but not 14 days, of opiate withdrawal (Fig. 5a/c; SW 3 and SW 14, in the absence of morphine challenge). In contrast, the content of total PEA-15 was not modulated by morphine treatment and opiate withdrawal (Fig. 5a/c).

In line with the observed modulation of p-PEA-15, the activation of Akt1 (phosphorylated at Ser473) showed a very similar time course in the brain (Fig. 5b/d; ratio of p-Akt1 to total enzyme). Thus, morphine treatment (10 mg/kg for 5 days) did not alter the basal activity of Akt1 in the corpus striatum or cerebral cortex, and during opiate withdrawal the content of p-Ser473 Akt1 was upregulated at SW 3, but not SW 14, in the striatum (49%, $p < 0.001$) and cortex (41%, $p < 0.001$) (Fig. 5b/d).

In these experiments (repeated morphine treatment and opiate withdrawal at SW 3 and SW 14), positive and significant correlations were quantified between the striatal contents of oligomeric p-FADD and p-ERK1/2 ($r = 0.79$; $p < 0.0001$) as well as between p-Ser116 PEA-15 and p-FADD ($r = 0.75$; $p = 0.0004$) and p-Ser116 PEA-15 and p-ERK1/2 ($r = 0.81$; $p < 0.0001$).

3.4. Sustained inhibition of ERK activation attenuated the expression of morphine-induced psychomotor sensitization and the upregulation of striatal p-FADD, p-PEA-15 and p-Akt1

The compound SL 327, a selective MEK1/2 inhibitor, was used as a tool to investigate the involvement of ERK1/2 and other signaling molecules in morphine-induced psychomotor sensitization. Preliminary experiments were performed to assess the optimal dose of SL 327 that would substantially block ERK1/2 phosphorylation without altering the content and/or activation of other target proteins in the rat corpus striatum. SL 327 (10, 20 and 30 mg/kg, i.p., 90 min) dose-dependently decreased the content of p-ERK1/2 (10–60%) and increased that of p-MEK1/2 (50–100%) (Fig. 6a). SL 327 (10 and 20 mg/kg) did not significantly alter the content of FADD, PEA-15 and Akt1, but at the highest dose (30 mg/kg) the

expression of oligomeric p-FADD was increased (33%, $p < 0.05$) (Fig. 6b/c). Similar results were obtained in the cerebral cortex (data not shown). Therefore, SL 327 at 20 mg/kg, a dose that in addition did not alter motor activity, was used for the behavioral experiments.

Treatment of two groups of rats with morphine (10 mg/kg for 5 days) resulted in progressive increases in locomotor activity during days 1–5 of treatment (Fig. 7a/b), which was very similar to the behavioral pattern observed previously (see Fig. 1a/b). In morphine-pretreated rats (control group receiving three injections of DMSO during early opiate withdrawal), the challenge dose of morphine (10 mg/kg) at SW 3 induced, as expected, the expression of a robust psychomotor sensitization when the effect of the opiate was compared with that in saline-pretreated rats (increase in locomotion: 86%, $p < 0.001$) (Fig. 7a/b). However, in the group of morphine-pretreated rats that received three doses of SL 327 (20 mg/kg), instead of DMSO, the expression of psychomotor sensitization induced by morphine (10 mg/kg) at SW 3 was markedly blunted (increase in locomotion: 30%, $p > 0.05$), indicating a significant attenuation of the behavioral response (58%, $p < 0.05$) (Fig. 7a/b).

After the behavioral experiment, these rats and others similarly treated were killed to assess the content of target proteins in the corpus striatum at early opiate withdrawal (SW 3). The challenge dose of morphine (10 mg/kg) did not significantly alter the previously observed inherent upregulation (SW 3) of oligomeric p-FADD (59%, $p < 0.001$) and p-Ser116 PEA-15 (29%, $p < 0.05$) as well as the activation of Akt1 (42%, $p < 0.01$) in the striatal complex (Fig. 7c) (for comparison see Figs. 2a, and 5a/b in the absence of morphine challenge). However, pretreatment with SL 327 (3 \times 20 mg/kg) prevented the upregulation of p-FADD, p-PEA-15 and p-Akt1/Akt1 induced by early (SW 3) opiate withdrawal (Fig. 7c).

4. Discussion

This study investigated the induction of neuroadaptations mediated by FADD, MAP kinases (MEK/ERK, JNK and p38

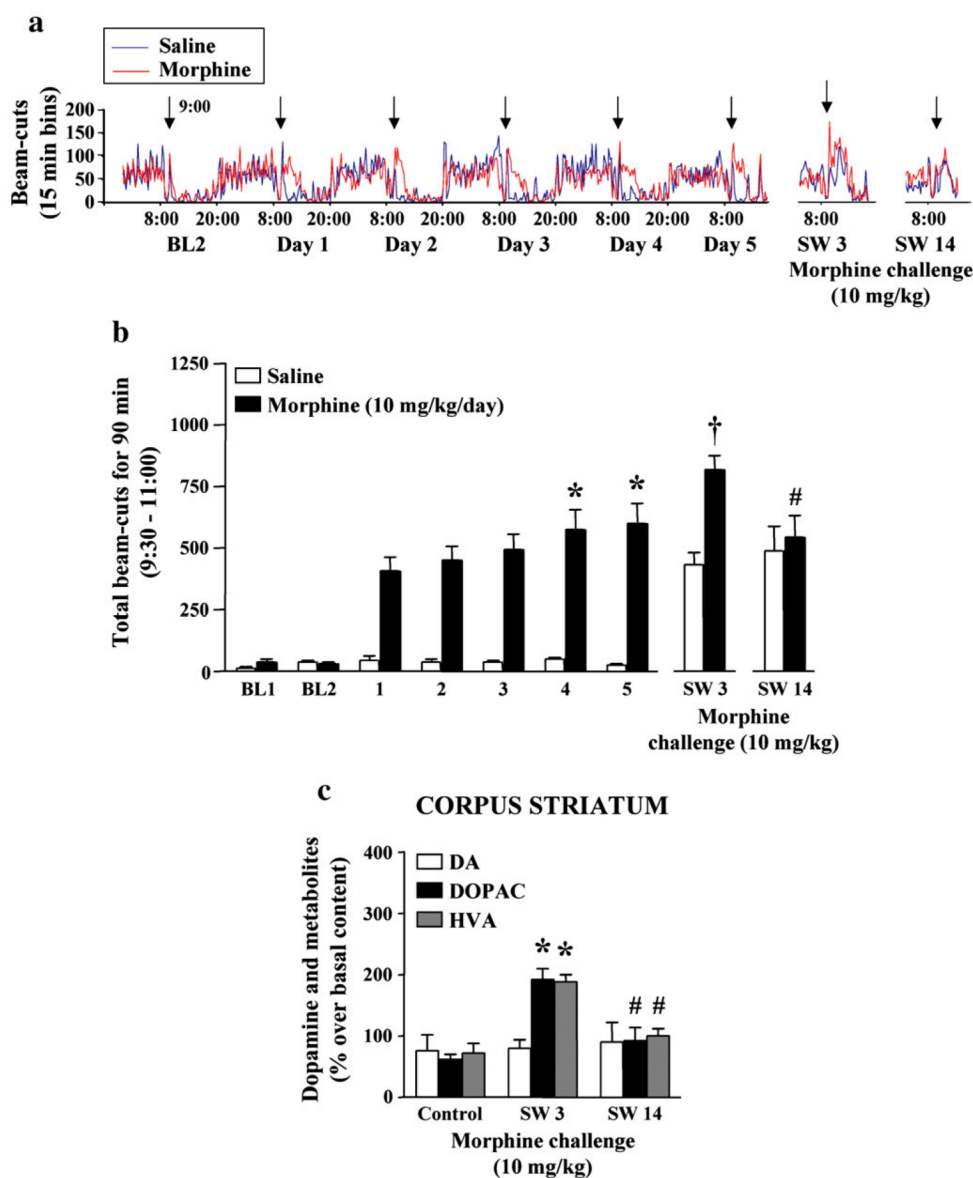


Figure 1 (a) Long-term (20 days) recording histograms of locomotor activity (rhythm of activity–rest; light-on at 8:00, light-off at 20:00) in saline ($n=5$; blue line)- and morphine ($n=5$; red line)-treated rats (1 ml/kg saline or 10 mg/kg morphine, i.p., during 5 days). BL2: Second saline baseline. After the repeated treatments, all rats were challenged with morphine (10 mg/kg, i.p.) at 3 (SW 3) or 14 (SW 14) days of saline or morphine withdrawal to assess the induction of psychomotor sensitization. All injections were given at 9:00 am (arrows). Histograms of motor activity were produced using an integrated package for time series analysis in chronobiology (see Experimental procedures). (b) Quantification of motor activity (number of beam interruptions for 90 min) in saline- and morphine-treated rats. BL1 and BL2: First and second saline baselines. Columns are means \pm SEM values (saline, $n=5$; morphine, $n=10$). Repeated measures one-way ANOVA detected a significant difference in the locomotor response to morphine along the treatment (days 1–5) [$F(4,36)=3.30$, $p=0.021$]. At least $*p<0.05$ when compared with day 1 (Bonferroni's test). A two-way ANOVA (withdrawal state) detected significant differences among the different groups: saline vs morphine pretreatment [$F(1,21)=20.1$, $p=0.0002$], SW 3 vs SW 14 [$F(1,21)=6.67$, $p=0.017$], and the interaction between both variables [$F(1,21)=12.4$, $p=0.0020$]. $\dagger p<0.001$ vs saline pretreated, $\#p<0.001$ vs SW 3 (Bonferroni's test). (c) Effect of a challenge dose of morphine (10 mg/kg, i.p.) on the content of dopamine (DA) and its major metabolites 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC) and homovanillic acid (HVA) in the corpus striatum of saline- (Control) and morphine (10 mg/kg for 5 days)-pretreated rats subjected to 3 (SW 3) or 14 (SW 14) days of opiate withdrawal. Mean \pm SEM (ng/g) basal values were: DA (Control: 2587 ± 124 ; SW 3: 2414 ± 261 ; SW 14: 2545 ± 191), DOPAC (Control: 536 ± 32 ; SW 3: 455 ± 27 ; SW 14: 695 ± 87) and HVA (Control: 370 ± 15 ; SW 3: 303 ± 10 ; SW 14: 441 ± 45). Columns are means \pm SEM of 3–5 experiments per group with an animal per experiment, and expressed as percentage over the corresponding basal content (i.e. no morphine challenge). One-way ANOVA detected significant differences between the groups of treatments for DOPAC [$F(2,8)=23.0$, $p=0.0005$] and HVA [$F(2,8)=14.0$, $p=0.0025$], but not for DA. At least $*p<0.05$ vs control; $\#p<0.05$ vs SW 3 (ANOVA followed by Bonferroni's test).

kinase) and associated PEA-15 and Akt1 kinase signaling molecules in the rat corpus striatum and cerebral cortex during the development and expression of unconditioned psychomotor sensitization to morphine. Although environmental cues are important factors in the process of drug abuse and may influence vulnerability in human addicts (O'Brien, 2006), this study sought to unravel new neuroadaptations in the absence of conditioned cues that can mask drug effects

(Badiani and Robinson, 2004). The repeated morphine regimen (10 mg/kg) used for the behavioral testings (development and expression of opiate sensitization) did not alter the normal rhythm of activity–rest in rats, indicating no disruption of circadian motor activity (see Martin et al., 2007; Falcón and McClung, 2009). During the phase of motor development to morphine (5 days), the rats exhibited daily increases in locomotor activity as observed in most rodent studies (Babbini

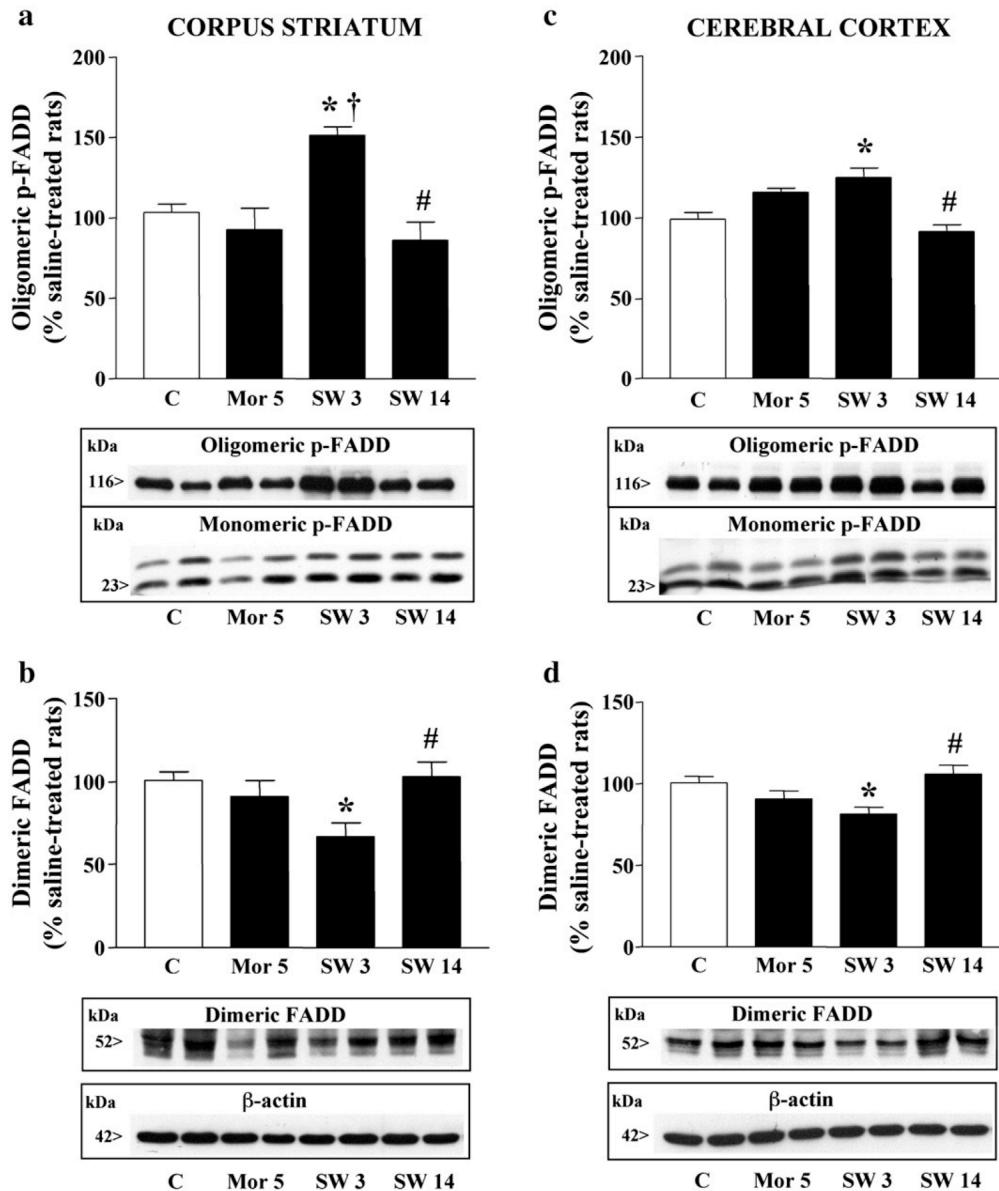


Figure 2 Effects of repeated morphine treatment (10 mg/kg, i.p., 5 days; Mor 5, $n=6-7$) and spontaneous opiate withdrawal during 3 (SW 3, $n=7-9$) or 14 (SW 14, $n=7-9$) days on the immunodensities of oligomeric 116 kDa p-FADD and dimeric 51 kDa FADD in the rat corpus striatum (a,b) and cerebral cortex (c,d). In these experiments the animals did not receive the morphine challenge at SW 3 and SW 14. Columns are means \pm SEM of n experiments per group with an animal per experiment, and expressed as percentage of saline-treated rats (C, $n=12-15$). In both brain regions, one-way ANOVA detected significant differences between the groups of treatments for p-FADD [striatum, $F(3,35)=12.0$, $p<0.0001$; cortex, $F(3,36)=9.30$, $p=0.0001$] and FADD [striatum, $F(3,30)=4.9$, $p=0.0070$; cortex, $F(3,36)=5.1$, $p=0.005$]. At least $*p<0.05$ vs C, $\dagger p<0.05$ vs Mor 5, and $\#p<0.05$ vs SW 3 (ANOVA followed by Bonferroni's test). Bottom (a-d): Representative immunoblots of oligomeric and monomeric p-FADD (116 and 23 kDa forms), dimeric FADD and β -actin with two different samples for each set of experiments.

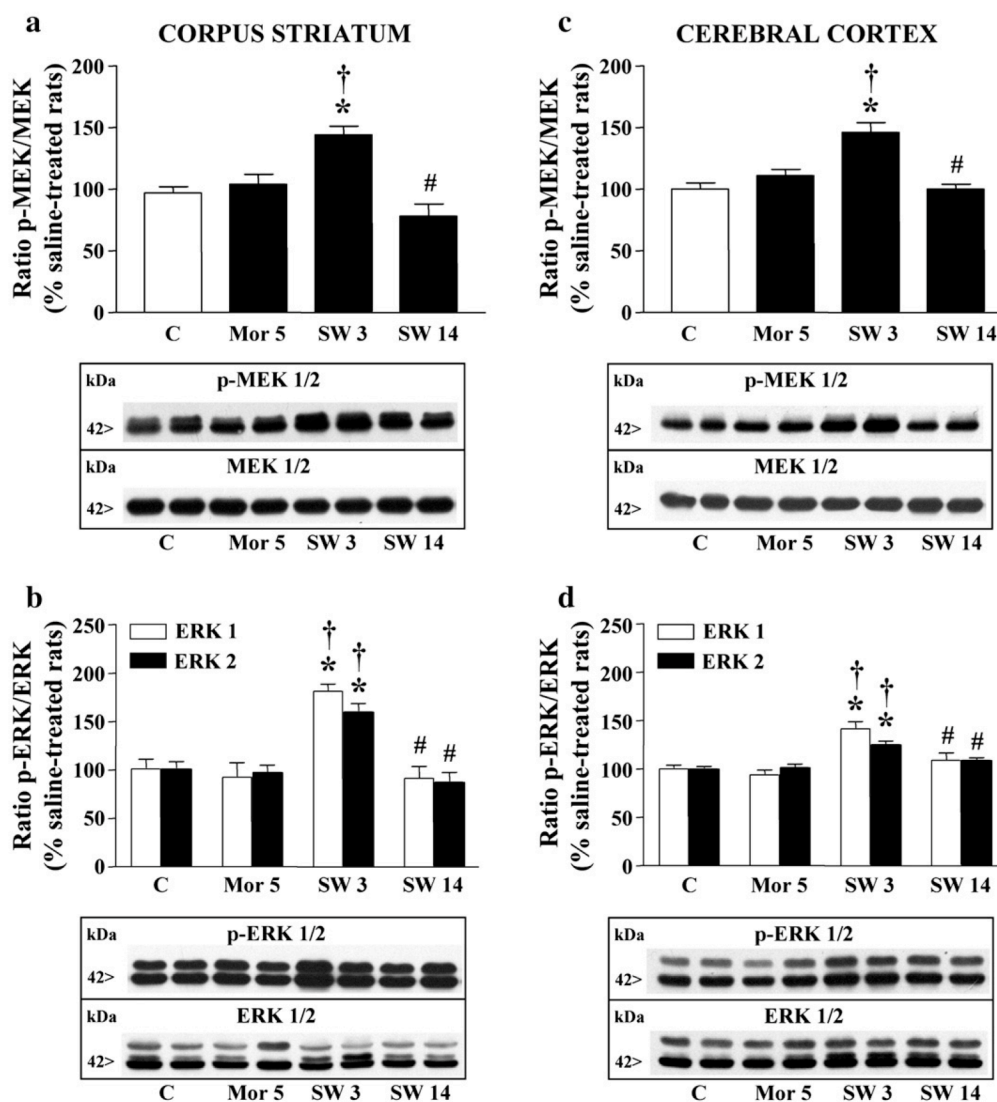


Figure 3 Effects of repeated morphine treatment (10 mg/kg, i.p., 5 days; Mor 5, $n=6-7$) and spontaneous opiate withdrawal during 3 (SW 3, $n=7-9$) or 14 (SW 14, $n=7-9$) days on the sequential activation of MEK1/2 and ERK1/2 (ratio of p-kinase to total kinase) in the rat corpus striatum (a,b) and cerebral cortex (c,d). In these experiments the animals did not receive the morphine challenge at SW 3 and SW 14. Columns are means \pm SEM of n experiments per group with an animal per experiment, and expressed as percentage of saline-treated rats (C, $n=12-15$). In both brain regions, one-way ANOVA detected significant differences between the groups of treatments for MEK/ERK phosphorylation [e.g. data for the striatum: p-MEK1/2, $F(3,31)=13.0$, $p<0.0001$; p-ERK1, $F(3,28)=17.0$, $p<0.0001$, and p-ERK2, $F(3,32)=14.0$, $p<0.0001$]. At least $*p<0.05$ vs C, $\dagger p<0.05$ vs Mor 5, and $\#p<0.05$ vs SW 3 (ANOVA followed by Bonferroni's test). Bottom (a-d): Representative immunoblots of p-kinases and total kinases with two different samples for each set of experiments.

and Davis, 1972; Jeziorski et al., 1994; Johnson and Napier, 2000; Chefer and Shippenberg, 2009; Smith et al., 2009). Finally, under the reported experimental conditions (i.e., unconditioned behavioral testing), the expression of psychomotor sensitization, provoked by a morphine challenge, was short-lasting as it was observed 3 days (SW 3), but not 14 days (SW 14), after opiate withdrawal. In agreement with this finding, dopamine turnover in the striatal complex (a brain structure involved in motor activity) was accelerated at SW 3 only. Similarly, the increase in dopamine transmission in the nucleus accumbens induced by a morphine challenge has been reported to be potentiated during early withdrawal from

repeated morphine (Vanderschuren and Kalivas, 2000). Previous studies (Spanagel and Shippenberg, 1993; Jeziorski et al., 1994; Vanderschuren et al., 1997, 1999; Cadoni and Di Chiara, 1999; Eitan et al., 2003; Atalla and Kuschinsky, 2006; McDaid et al., 2006) have also characterized the development and/or expression of morphine-induced psychomotor sensitization without the powerful influence of environmental factors, which induce long-term context-sensitization (up to 8 months; Babbini et al., 1975; Bartoletti et al., 1983) and long-lasting neuroplastic changes (Badiani and Robinson, 2004; Ferguson et al., 2004; Taracha et al., 2008). In this context, for example, Borgkvist et al. (2008) have clearly demonstrated

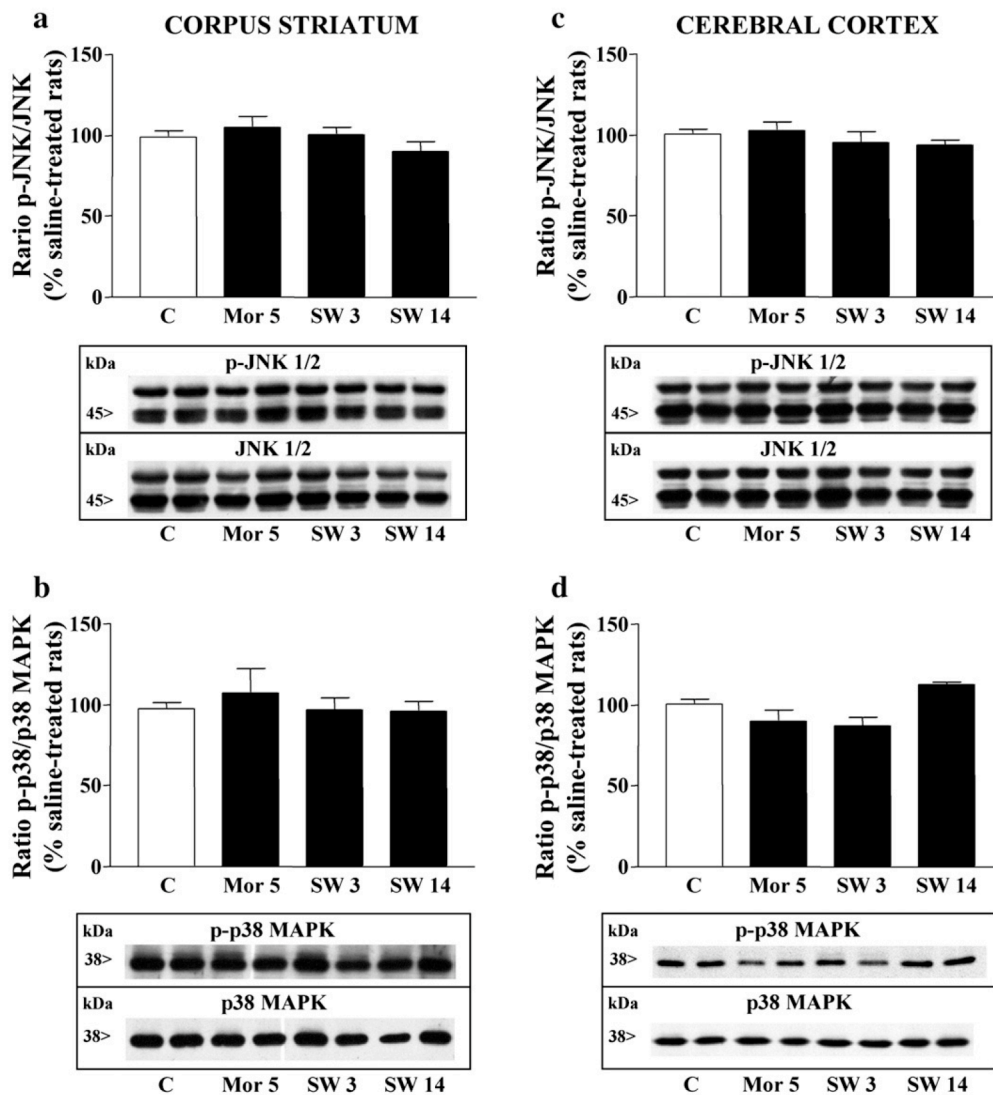


Figure 4 Lack of effects of repeated morphine treatment (10 mg/kg, i.p., 5 days; Mor 5, $n=6-7$) and spontaneous opiate withdrawal during 3 (SW 3, $n=8-9$) or 14 (SW 14, $n=8-9$) days on the activation of pro-apoptotic JNK and p38 MAP kinases (ratio of p-kinase to total kinase) in the rat corpus striatum (a,b) and cerebral cortex (c,d). In these experiments the animals did not receive the morphine challenge at SW 3 and SW 14. Columns are means \pm SEM of n experiments per group with an animal per experiment, and expressed as percentage of saline-treated rats (C, $n=13-15$). One-way ANOVA did not detect significant differences between the groups of treatments in any brain region. Bottom (a-d): Representative immunoblots of p-kinases and total kinases with two different samples for each set of experiments.

that the psychomotor enhancement to morphine in opiate-sensitized mice was lost (after 4 weeks of abstinence) when the animals were previously exposed to the drug environment in the absence of morphine.

The variable temporal expression of morphine-induced psychomotor sensitization (short-term: 1-7 days, or long-term: up to 4 weeks) reported in several context-independent behavioral studies (see e.g. Jeziorski et al., 1994; Vanderschuren et al., 1997; Cadoni and Di Chiara, 1999; Badiani et al., 2000; Eitan et al., 2003; McDaid et al., 2006; present study) is probably related to methodological issues such as species differences (rat, mouse), rat strains (Sprague-Dawley, Wistar), the morphine pretreatment regimen used (single doses:

2, 10 or 20 mg/kg; ascending doses: 10-50 mg/kg), the pattern of morphine administration (every 12, 24 or 48 h), the duration of morphine pre-exposure (1-14 days), the challenge dose of morphine (1, 2, 5 or 10 mg/kg), and the possible influence of conditioning to the test environment (same home and test cage: Badiani et al., 2000; Eitan et al., 2003, and present study; different home and test cages: Jeziorski et al., 1994; Vanderschuren et al., 1997; Cadoni and Di Chiara, 1999; McDaid et al., 2006; although in these studies the animals were allowed to habituate to the test cages for 30 min or 2 h). Notably, two studies that used identical experimental protocols resulted in either long-term (14 days; different home and test cages; McDaid et al., 2006) or short-term (3 days; same

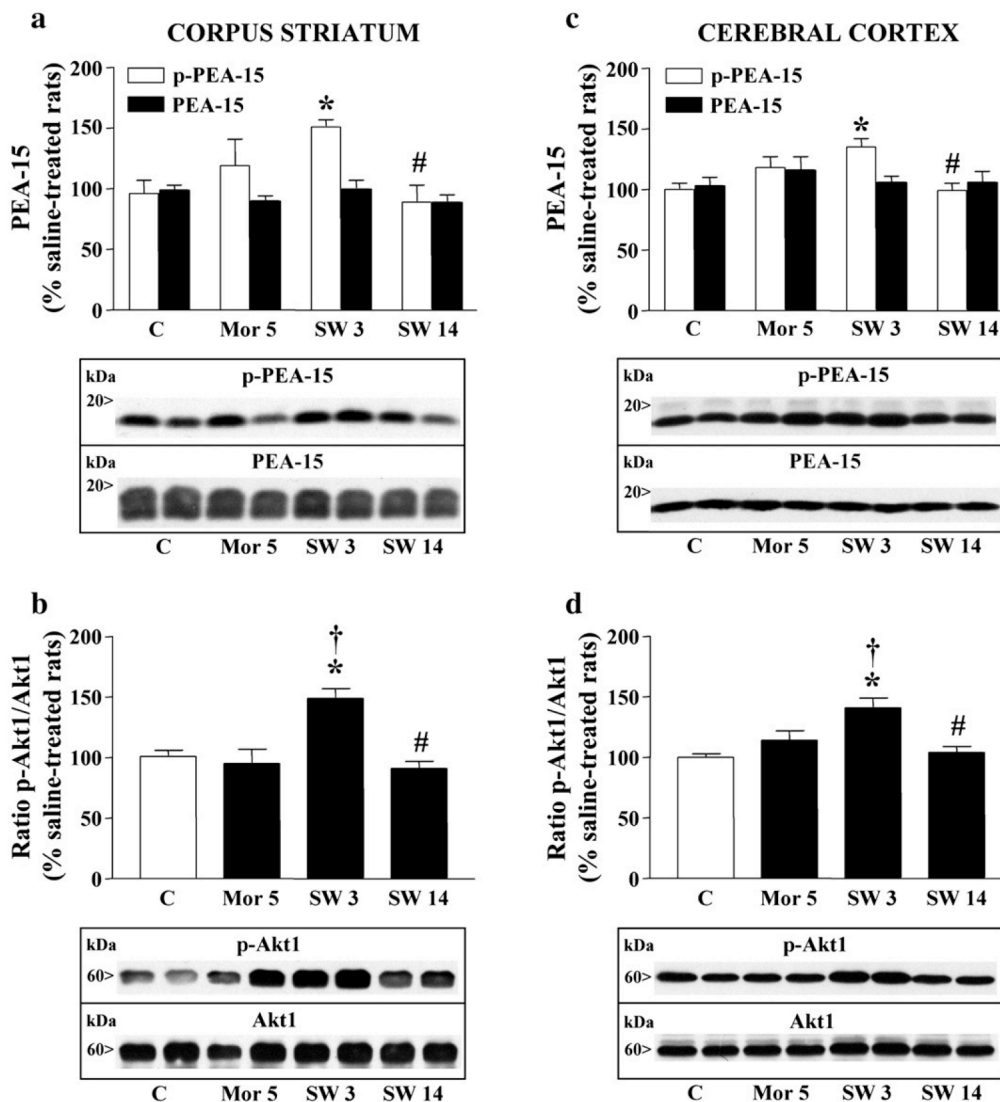


Figure 5 Effects of repeated morphine treatment (10 mg/kg, i.p., 5 days; Mor 5, $n=6-7$) and spontaneous opiate withdrawal during 3 (SW 3, $n=7-9$) or 14 (SW 14, $n=7-9$) days on the content of p-Ser116 PEA-15 and total PEA-15, as well as on the activation of Akt1 (ratio of p-kinase to total kinase) in the rat corpus striatum (a,b) and cerebral cortex (c,d). In these experiments the animals did not receive the morphine challenge at SW 3 and SW 14. Columns are means \pm SEM of n experiments per group with an animal per experiment, and expressed as percentage of saline-treated rats (C, $n=12-15$). One-way ANOVA detected significant differences between the groups of treatments for p-Ser116 PEA-15 [striatum, $F(3,28)=4.1$, $p=0.017$; cortex, $F(3,33)=6.4$, $p=0.0015$], and p-Akt1 [striatum, $F(3,32)=13.0$, $p<0.0001$; cortex, $F(3,36)=9.7$, $p<0.0001$]. At least * $p<0.05$ vs C, † $p<0.05$ vs Mor 5, and # $p<0.05$ vs SW 3 (ANOVA followed by Bonferroni's test). Bottom (a-d): Representative immunoblots of p-Ser116 and total PEA-15, and p-Akt1 and total kinase with two different samples for each set of experiments.

home and test cage; present study) morphine-induced psychomotor sensitization.

Under the experimental conditions of the present study, the neurochemical results revealed that the content of p-Ser191/194 FADD was robustly upregulated in the corpus striatum, and to a lesser extent in the cerebral cortex, during the short-term expression of unconditioned morphine-induced psychomotor sensitization (SW 3, in the absence of morphine challenge). In contrast, total FADD content at SW 3 was downregulated in both brain regions. It has been reported that morphine and other opiate drugs modulate in

opposite directions p-FADD and FADD in the brain (García-Fuster et al., 2007, 2008a,b; Ramos-Miguel et al., 2009). Moreover, novelty-induced locomotion in high- and low-responder rats has been shown to correlate with the contents of p-FADD and FADD in the cerebral cortex (García-Fuster et al., 2009). In the current study, the opposite modulation of p-FADD and FADD observed during morphine sensitization (SW 3) indicated the existence of an altered balance between pro-apoptotic FADD and non-apoptotic p-FADD (increased p-FADD/FADD ratio), which would attenuate the induction of apoptotic effects favoring the neuroplastic

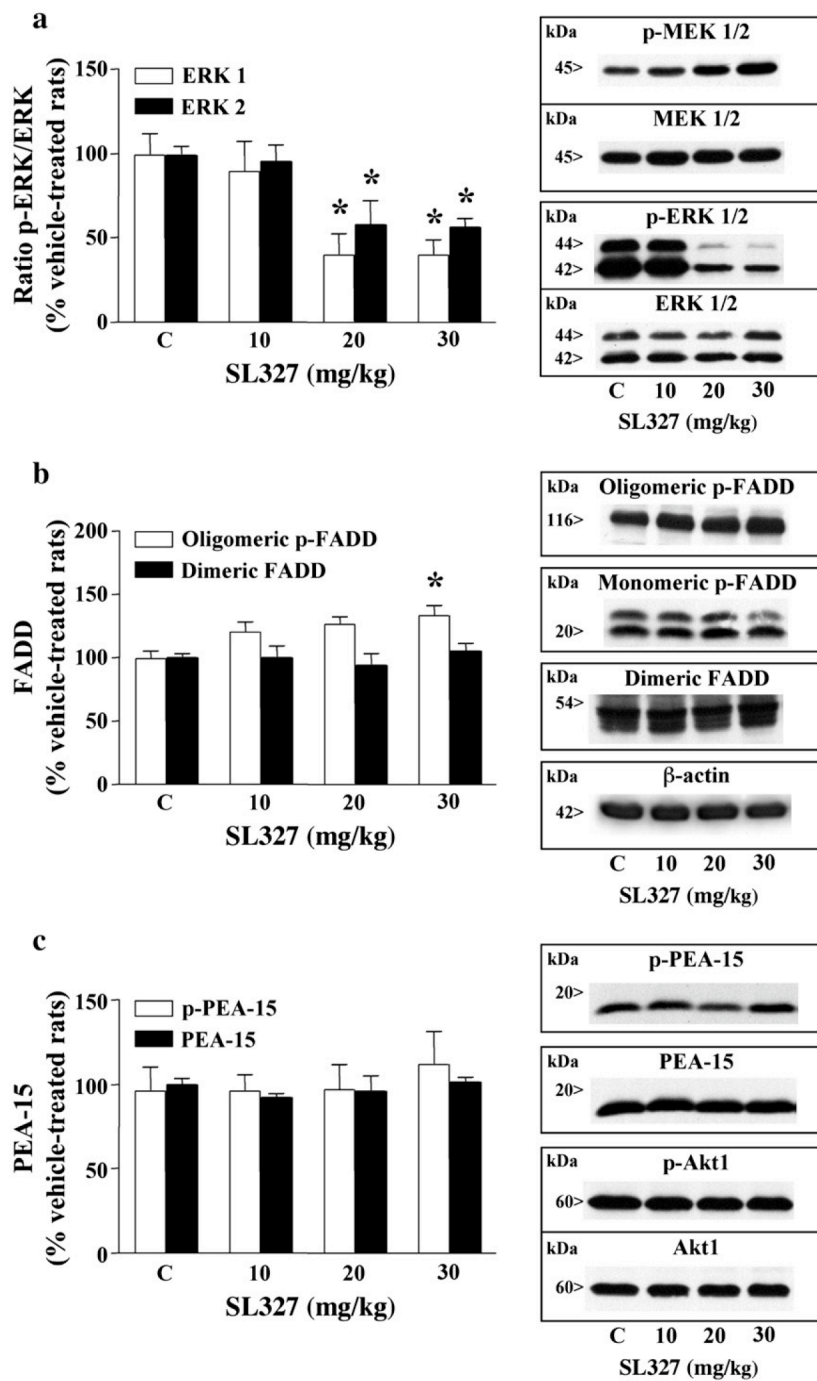


Figure 6 Effects of MEK1/2 inhibition with the compound SL 327 (10–30 mg/kg, i.p. 90 min) on (a) the phosphorylation of ERK1 and ERK2 (ratio of p-kinase to total kinase), (b) the content of p-FADD and FADD, and (c) the content of p-Ser116 PEA-15 and total PEA-15 in the rat corpus striatum. Columns are means \pm SEM of 5–7 experiments per dose with an animal per experiment, and expressed as percentage of saline-treated rats (C, $n=5$). One-way ANOVA detected significant differences between the groups of treatments for p-ERK1 [$F(3,18)=5.02$, $p=0.0106$], p-ERK2 [$F(3,18)=5.29$, $p=0.0100$], and p-FADD [$F(3,20)=3.5$, $p=0.0344$]. * $p<0.05$ vs C. Right panels: Representative SL 327 dose-response immunoblots (p- and total protein) of (a) MEK1/2 and ERK1/2; (b) FADD forms and β -actin; and (c) PEA-15 and Akt1.

actions of this multifunctional protein. A similar inverse relationship between these FADD forms has been reported in prefrontal cortex of chronic opiate addicts, which also suggested their involvement in neuroplasticity (Ramos-Miguel et al., 2009).

ERK activation in specific brain regions (e.g. striatal complex and amygdala) has been shown to play a crucial role in the expression of morphine-induced psychomotor sensitization (Borgkvist et al., 2008), morphine-induced reward (Mazzucchelli et al., 2002; Valjent et al., 2006a; Li et al., 2008)

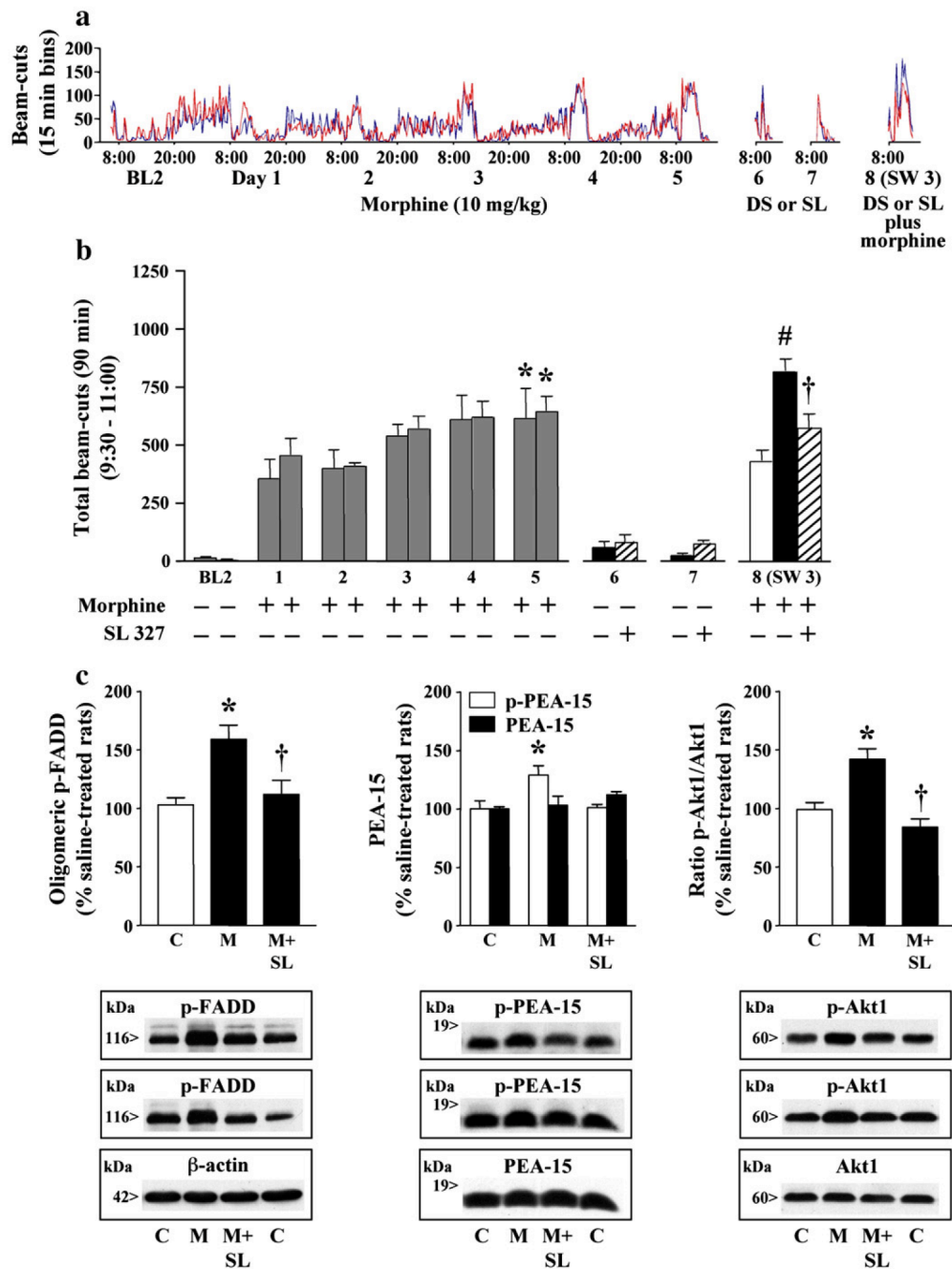


Figure 7 (a) Long-term (9 days) recording histograms of locomotor activity (rhythm of activity–rest) in two parallel groups of morphine-treated rats (10 mg/kg morphine, i.p., during 5 days) ($n=5$ in each group; red and blue lines). BL2: Second saline baseline. After the morphine treatment, the rats received three doses of the MEK1/2 inhibitor SL327 (SL, 20 mg/kg, i.p., red line) or vehicle DMSO (DS, 1 ml/kg, i.p., blue line) at 24 h (day 6), 48 h (day 7) and 72 h (day 8 or SW 3). After the last dose, all rats received a challenge injection of morphine (10 mg/kg, i.p.) to induce the expression of psychomotor sensitization at SW 3. See Fig. 1a for other details. (b) Quantification of motor activity (number of beam interruptions for 90 min; means \pm SEM values) in the two groups of morphine-treated rats ($n=10$) and an additional group of saline-pretreated animals ($n=5$) also challenged with morphine at SW 3. * $p<0.05$ vs Day 1 (repeated measures ANOVA followed by Bonferroni's test; see also Fig. 1b). One-way ANOVA (SW 3: saline-pretreated rats, white column; morphine-pretreated rats plus DMSO, black column; and morphine-pretreated rats plus SL 327, striped column) detected significant differences of locomotor responses to the challenge dose of morphine [$F(2,17)=11.1, p=0.0008$]. # $p<0.001$ vs white column; † $p<0.05$ vs black column (ANOVA followed by Bonferroni's test). (c) Striatal contents of p-Ser191/194 FADD, p-Ser116 PEA-15 and total PEA-15, and ratio p-Ser473 Akt1/total Akt1 in the same rats (b) challenged with morphine at SW 3 (means \pm SEM values; C, saline-pretreated rats, $n=10$ –13; M, morphine-pretreated rats plus DMSO, $n=7$ –10; M+SL, morphine-pretreated rats plus SL 327; $n=5$). One-way ANOVA detected significant differences between the groups of treatments for p-FADD [$F(2,22)=10.0, p=0.0008$], p-PEA-15 [$F(2,22)=4.5, p=0.0223$], and p-Akt1 [$F(2,25)=20.0, p<0.0001$]. At least * $p<0.05$ vs C, † $p<0.05$ vs M (ANOVA followed by Bonferroni's test). Bottom: Representative immunoblots of p-FADD and β -actin, p-PEA-15 and total protein, and p-Akt1 and total kinase with two different samples for each set of experiments.

as well as in other forms of drug of abuse-induced behavioral neuroplasticity (e.g. Ferguson et al., 2006; Valjent et al., 2006b; reviewed in Girault et al., 2007; Zhai et al., 2008; Brami-Cherrier et al., 2009). Similarly to p-FADD, the MEK/ERK pathway was found markedly activated in the striatum and cerebral cortex during the expression of morphine-induced psychomotor sensitization (SW 3, in the absence of morphine challenge). In contrast, pro-apoptotic JNK and p38 MAP kinases and the cleavage of caspase-8 and nuclear enzyme PARP-1 were found unchanged (SW 3), further indicating that apoptotic mechanisms were not involved in this form of sensitization to morphine. Notably, the concomitant upregulation of p-FADD and p-MEK/ERK in the brain matched the time course of morphine-induced psychomotor sensitization, which strongly suggested that both signaling pathways could participate in its expression.

Like FADD, PEA-15 (also expressed in neurons; Sharif et al., 2004) is a cytosolic death effector domain-containing protein that interacts with FADD and can regulate cell apoptosis, transcription and proliferation (Ramos, *in press*; Valmiki and Ramos, 2009). Significantly, phosphorylation of PEA-15 at Ser116, mediated by Akt1 kinase (Trencia et al., 2003), has been shown to link FADD with ERK (Renganathan et al., 2005). Thus, PEA-15 can target ERK to specific substrates involved in neuroplasticity such as cAMP response element-binding protein (CREB) or to enhance the activation of the MAP kinase through its binding with the ERK substrate ribosomal S6 kinase 2 (RSK2) (Vaidyanathan and Ramos, 2003; Vaidyanathan et al., 2007). Besides, non-p PEA-15 can also play functional roles by itself such as the sequestration of ERK in the cytosol, which prevents the nuclear accumulation of ERK and limits ERK activated transcription (Formstecher et al., 2001; Glading et al., 2007). These findings indicate that PEA-15 might serve as a point of signal integration of the MEK/ERK pathway. Interestingly the content of p-Ser116 PEA-15 (but not total PEA-15) and the activation of p-Ser473 Akt1 kinase were markedly increased in the striatum and cerebral cortex during the expression of morphine-induced psychomotor sensitization (SW 3, in the absence of morphine challenge). Again the concomitant upregulation of p-Ser116 PEA-15 and p-Akt1 (a powerful anti-apoptotic kinase; Dudek et al., 1997), and that of p-FADD and p-MEK/ERK in the rat corpus striatum coincided in perfect match with the short-lasting expression of unconditioned psychomotor sensitization induced by morphine (SW 3). Together, these remarkable findings strongly suggested the involvement of PEA-15/Akt1 in the complex chain of molecular mechanisms (FADD and ERK interaction) underlying this form of behavioral plasticity induced by morphine. It is worth noting that the modulations of FADD, ERK, PEA-15, Akt1 were quantified in rats subjected to spontaneous withdrawal only (i.e. without the input of the morphine challenge), and consequently the reported changes preceded the expression of morphine-induced psychomotor sensitization.

Other behavioral studies (conditioned place preference; locomotor sensitization) have revealed the important roles played by ERK and Akt1 in the synaptic plasticity of drug of abuse, including the reward induced by morphine (Mazzucchelli et al., 2002; Valjent et al., 2006a,b; Girault et al., 2007; Russo et al., 2007). Moreover, reduced ERK and Akt1 activities in brains of chronic heroin/methadone addicts were also postulated to participate in the induction of tolerance to opiate reward (Ramos-Miguel et al., 2009). To further assess the role

of ERK, FADD, PEA-15 and Akt1 kinase in the expression of unconditioned morphine-induced psychomotor sensitization, the activation of ERK1/2 was interrupted with the MEK1/2 inhibitor SL 327. As expected, SL 327 decreased the content of p-ERK1/2 and increased that of p-MEK1/2 (feedback regulation; García-Fuster et al., 2007) in the rat striatum. Pretreatment of rats with SL 327 (20 mg/kg; three doses 24-h apart before the behavioral testing) significantly attenuated (58%) the expression of morphine sensitization (SW 3). It is possible that the relatively moderate decrease of p-ERK1/2 (60%) induced by SL 327 and/or the short half-life of the MEK inhibitor (Selcher et al., 1999) may not have allowed sufficient and sustained inhibition of MEK/ERK to completely block morphine sensitization. Higher doses of SL 327 were not tested because they either alter spontaneous locomotion in rodents (Einat et al., 2003; Valjent et al., 2006b) or the content of p-FADD in the brain (this study). Another limitation of the current study refers to the absence of an extra control group in the reported experiments (i.e., the effect of SL 327 in saline-pretreated rats receiving acute morphine at SW3), which was not included because of the limited number of animals that could be simultaneously tested. In this context, however, SL 327 (30 mg/kg) was reported not to alter acute cocaine or amphetamine-induced locomotion after saline pretreatment (Valjent et al., 2006b). Therefore, it can be expected that 20 mg/kg SL 327 (moderate MEK1/2 inhibition) does not modify the effect of acute morphine in saline-pretreated animals.

In spite of these limitations but in striking accordance with the postulated functional interactions (see above), SL 327 fully prevented the upregulation of p-FADD, p-PEA-15 and the activation of Akt1 kinase associated with the expression of unconditioned morphine-induced psychomotor sensitization (SW 3). These results clearly indicated that FADD and PEA-15/Akt1 are downstream signaling molecules under the control of the MEK/ERK pathway, which also participate in the expression of the behavioral response. Further studies are needed to assess whether or not these new signaling molecules (FADD, PEA-15) are involved in the long-term (context-specific) expression of psychomotor sensitization to morphine.

In conclusion, the results of this study indicate that the activation of MEK/ERK, the upregulation of p-FADD and that of the linking partners PEA-15/Akt1 have, together, a major role in mediating the short-lasting expression of unconditioned psychomotor sensitization induced by morphine in rats.

Role of the funding source

Funding for this study was provided by Ministerio de Ciencia e Innovación, Plan Nacional sobre Drogas, and Red Temática de Investigación Cooperativa en Salud (Madrid, Spain). These Public Entities had no further role in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the paper for publication.

Contributors

A. Ramos-Miguel and J. A. García-Sevilla designed the experimental protocols and wrote the paper. A. Ramos-Miguel carried out most of the experimental work, data collection and statistical analyses, and S. Esteban contributed with experiments dealing with brain dopamine turnover. J. A. García-Sevilla coordinated the overall project. All authors discussed the results and approved the final manuscript.

Conflict of interest

None of the authors declare any conflict of interest.

Acknowledgment

This study was supported by grant SAF2008-01311 (MICINN and FEDER, Madrid, Spain) and grant 20071032 (Plan Nacional sobre Drogas, MSC, Madrid). The research was also funded by Red Temática de Investigación Cooperativa en Salud (RETICS, Instituto de Salud Carlos III, MSC and FEDER, Madrid): Red de Trastornos Adictivos, Grupo RD06/001/003. A. Ramos-Miguel was supported by a predoctoral FPI fellowship from MICINN (Madrid). We thank Dr. Rubén V. Rial for kindly providing access to the equipments for the recording of locomotor activity, and Mr. Antonio J. Crespo for skillful technical assistance. J. A. García-Sevilla is a member of the Institut d'Estudis Catalans (Barcelona, Catalonia, Spain).

References

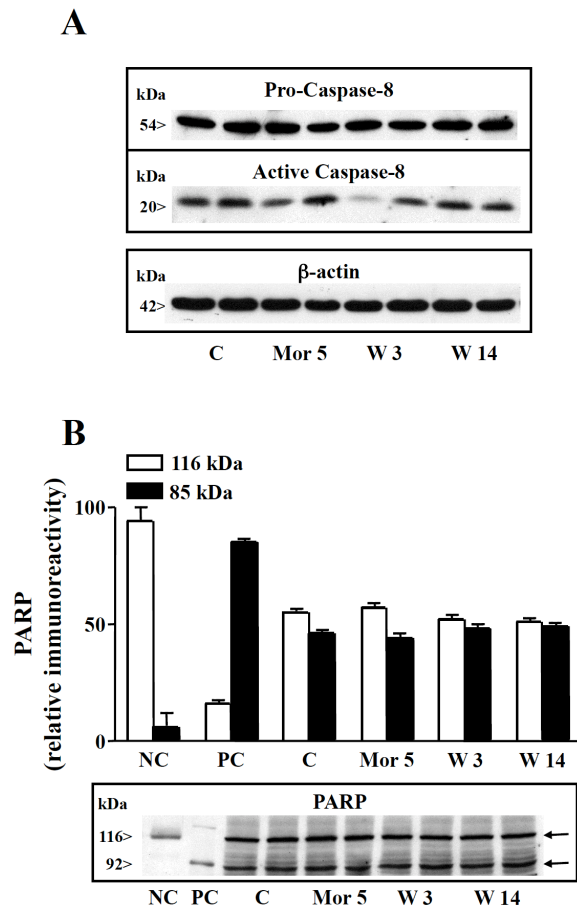
- Alappat, E.C., Feig, C., Boyerinas, B., Volkland, J., Samuels, M., Murmann, A.E., Thorburn, A., Kidd, V.J., Slaughter, C.A., Osborn, S.L., Winoto, A., Tang, W.J., Peter, M.E., 2005. Phosphorylation of FADD at serine 194 by CKI alpha regulates its nonapoptotic activities. *Mol. Cell.* 19, 321–332.
- Algeciras-Schimmich, A., Shen, L., Barnhart, B.C., Murmann, A.E., Burkhardt, J.K., Peter, M.E., 2002. Molecular ordering of the initial signaling events of CD95. *Mol. Cell. Biol.* 22, 207–220.
- Anglès-Pujolràs, M., Díez-Noguera, A., Soria, V., Urretavizcaya, M., Menchón, J.M., Cambras, T., 2009. Electroconvulsive shock alters the rat overt rhythms of motor activity and temperature without altering the circadian pacemaker. *Behav. Brain Res.* 196, 37–43.
- Araujo, H., Danziger, N., Cordier, J., Glowinski, J., Chneiweiss, H., 1993. Characterization of PEA-15, a major substrate for protein kinase C in astrocytes. *J. Biol. Chem.* 268, 5911–5920.
- Atalla, A., Kuschinsky, K., 2006. Effects of blockade of glutamate NMDA receptors or of NO synthase on the development or the expression of associative or non-associative sensitization to locomotor activation by morphine. *J. Neural Transm.* 113, 1–10.
- Babbini, M., Davis, W.M., 1972. Time-dose relationships for locomotor activity effects of morphine after acute and repeated treatment. *Br. J. Pharmacol.* 46, 213–224.
- Babbini, M., Gaiardi, M., Bartoletti, M., 1975. Persistence of chronic morphine effects upon activity in rats 8 months after ceasing the treatment. *Neuropharmacology* 14, 611–614.
- Badiani, A., Robinson, T.E., 2004. Drug-induced neurobehavioral plasticity: the role of environmental context. *Behav. Pharmacol.* 15, 327–339.
- Badiani, A., Oates, M.M., Robinson, T.E., 2000. Modulation of morphine sensitization in the rat by contextual stimuli. *Psychopharmacology* 151, 273–282.
- Ballesteros-Yáñez, I., Ambrosio, E., Benavides-Piccione, R., Pérez, J., Torres, I., Miguéns, M., García-Lecumberri, C., DeFelipe, J., 2007. The effects of morphine self-administration on cortical pyramidal cell structure in addiction-prone lewis rats. *Cereb. Cortex* 17, 238–249.
- Bartoletti, M., Gaiardi, M., Gubellini, G., Bacchi, A., Babbini, M., 1983. Long-term sensitization to the excitatory effects of morphine. A motility study in post-dependent rats. *Neuropharmacology* 22, 1193–1196.
- Before, K., Filliol, D., Ghate, A., Darcq, E., Matifas, A., Muller, J., Lardenois, A., Thibault, C., Dembele, D., Le Merrer, J., Becker, J.A., Poch, O., Kieffer, B.L., 2008. Mu-opioid receptor activation induces transcriptional plasticity in the central extended amygdala. *Eur. J. Neurosci.* 27, 2973–2984.
- Borgkvist, A., Valjent, E., Santini, E., Hervé, D., Girault, J.-A., Fisone, G., 2008. Delayed, context- and dopamine D1 receptor-dependent activation of ERK in morphine-sensitized mice. *Neuropharmacology* 55, 230–237.
- Brami-Cherrier, K., Roze, E., Girault, J.-A., Betuing, S., Caboche, J., 2009. Role of the ERK/MSK1 signalling pathway in chromatin remodelling and brain responses to drugs of abuse. *J. Neurochem.* 108, 1323–1335.
- Cadoni, C., Di Chiara, G., 1999. Reciprocal changes in dopamine responsiveness in the nucleus accumbens shell and core and in the dorsal caudate-putamen in rats sensitized to morphine. *Neuroscience* 90, 447–455.
- Campuzano, A., Vilaplana, J., Cambras, T., Díez-Noguera, A., 1998. Dissociation of the rat motor activity rhythm under T cycles shorter than 24 hours. *Physiol. Behav.* 63, 171–176.
- Chefer, V.I., Shippenberg, T.S., 2009. Augmentation of morphine-induced sensitization but reduction in morphine tolerance and reward in delta-opioid receptor knockout mice. *Neuropsychopharmacology* 34, 887–898.
- Chinnaiyan, A.M., O'Rourke, K., Tewari, M., Dixit, V.M., 1995. FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. *Cell* 81, 505–512.
- Christie, M.J., 2008. Cellular neuroadaptations to chronic opioids: tolerance, withdrawal and addiction. *Br. J. Pharmacol.* 154, 384–396.
- Cordonnier, L., Sanchez, M., Roques, B.P., Noble, F., 2007. Blockade of morphine-induced behavioral sensitization by a combination of amisulpride and RB101, comparison with classical opioid maintenance treatments. *Br. J. Pharmacol.* 151, 94–102.
- Desbarats, J., Birge, R.B., Minouni-Rongy, M., Weistein, D.E., Palerme, J.S., Newell, M.K., 2003. Fas engagement induces neurite growth through ERK activation and p35 upregulation. *Nat. Cell Biol.* 5, 118–125.
- Dudek, H., Datta, S.R., Franke, T.F., Birnbaum, M.J., Yao, R., Cooper, G.M., Segal, R.A., Kaplan, D.R., Greenberg, M.E., 1997. Regulation of neuronal survival by the serine-threonine protein kinase Akt. *Science* 275, 661–665.
- Einat, H., Yuan, P., Gould, T.D., Li, J., Du, J., Zhang, L., Manji, H.K., Chen, G., 2003. The role of the extracellular signal-regulated kinase signaling pathway in mood modulation. *J. Neurosci.* 23, 7311–7316.
- Eitan, S., Bryant, C.D., Saliminejad, N., Yang, Y.C., Vojdani, E., Keith Jr., D., Polakiewicz, R., Evans, C.J., 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.
- Elsworth, J.D., Roth, R.H., 1997. Dopamine synthesis, uptake, metabolism, and receptors: relevance to gene therapy. *Exp. Neurol.* 144, 4–9.
- Falcón, E., McClung, C.A., 2009. A role for the circadian genes in drug addiction. *Neuropharmacology* 56, 91–96.
- Ferguson, S.M., Robinson, T.E., 2004. Amphetamine-evoked gene expression in striatopallidal neurons: regulation by corticostriatal afferents and the ERK/MAPK signaling cascade. *J. Neurochem.* 91, 337–348.
- Ferguson, S.M., Thomas, M.J., Robinson, T.E., 2004. Morphine-induced c-Fos mRNA expression in striatofugal circuits: modulation by dose, environmental context, and drug history. *Neuropsychopharmacology* 29, 1664–1674.
- Ferguson, S.M., Fasano, S., Yang, P., Brambilla, R., Robinson, T.E., 2006. Knockout of ERK 1 enhances cocaine-evoked immediate early gene expression and behavioral plasticity. *Neuropsychopharmacology* 31, 2660–2668.
- Formstecher, E., Ramos, J.W., Fauquet, M., Calderwood, D.A., Hsieh, J.C., Canton, B., Nguyen, X.T., Barnier, J.V., Camonis, J., Ginsberg, M.H., Chneiweiss, H., 2001. PEA-15 mediates cytoplasmic sequestration of ERK MAP kinase. *Dev. Cell* 1, 239–250.

- García-Fuster, M.J., Miralles, A., García-Sevilla, J.A., 2007. Effects of opiate drugs on Fas-associated protein with death domain (FADD) and effector caspases in the rat brain: regulation by the ERK1/2 MAP kinase pathway. *Neuropsychopharmacology* 32, 399–411.
- García-Fuster, M.J., Ramos-Miguel, A., Miralles, A., García-Sevilla, J.A., 2008a. Opioid receptor agonists enhance the phosphorylation state of Fas-associated death domain (FADD) protein in the rat brain: functional interactions with casein kinase I α , G α_i proteins, and ERK1/2 signaling. *Neuropharmacology* 55, 886–899.
- García-Fuster, M.J., Ramos-Miguel, A., Rivero, G., La Harpe, R., Meana, J.J., García-Sevilla, J.A., 2008b. Regulation of the extrinsic and intrinsic apoptotic pathways in the prefrontal cortex of short- and long-term human opiate abusers. *Neuroscience* 157, 105–119.
- García-Fuster, M.J., Clinton, S.M., Watson, S.J., Akil, H., 2009. Effect of cocaine on Fas-associated protein with death domain in the rat brain: individual differences in a model of differential vulnerability to drug abuse. *Neuropsychopharmacology* 34, 1123–1134.
- Girault, J.A., Valjent, E., Caboche, J., Hervé, D., 2007. ERK2: a logical AND gate critical for drug-induced plasticity? *Curr. Opin. Pharmacol.* 7, 77–85.
- Glading, A., Koziol, J.A., Krueger, J., Ginsberg, M.H., 2007. PEA-15 inhibits tumor cell invasion by binding to extracellular signal-regulated kinase 1/2. *Cancer Res.* 67, 1536–1544.
- Jeziorski, M., White, F.J., Wolf, M.E., 1994. MK-801 prevents the development of behavioral sensitization during repeated morphine administration. *Synapse* 16, 137–147.
- Johnson, P.I., Napier, P.C., 2000. Ventral pallidal injections of a mu antagonist block the development of behavioral sensitization to systemic morphine. *Synapse* 38, 61–70.
- Kalivas, P.W., O'Brien, C., 2008. Drug addiction as a pathology of staged neuroplasticity. *Neuropsychopharmacology* 33, 166–180.
- Kuan, C.Y., Yang, D.D., Samanta Roy, D.R., Davis, R.J., Rakic, P., Flavell, R.A., 1999. The Jnk1 and Jnk2 protein kinases are required for regional specific apoptosis during early brain development. *Neuron* 22, 667–676.
- Kuan, C.Y., Whitmarsh, A.J., Yang, D.D., Liao, G., Schloemer, A.J., Dong, C., Bao, J., Banasiak, K.J., Haddad, G.G., Flavell, R.A., Davis, R.J., Rakic, P., 2003. A critical role of neural-specific JNK3 for ischemic apoptosis. *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 15184–15189.
- Li, Y.-Q., Li, F.-Q., Wang, X.-Y., Wu, P., Zhao, M., Xu, C.-M., Shaham, Y., Lu, L., 2008. Central amygdala extracellular signal-regulated kinase signaling pathway is critical to incubation of opiate craving. *J. Neurosci.* 28, 13248–13257.
- Martin, T.J., Kahn, W.R., Xiao, R., Childers, S.R., 2007. Differential regional effects of methadone maintenance compared to heroin dependence on μ -opioid receptor desensitization in rat brain. *Synapse* 61, 176–184.
- Mazzucchelli, C., Vantaggiato, C., Ciamei, A., Fasano, S., Pakhotin, P., Krezel, W., Welzl, H., Wolfer, D.P., Pagès, G., Valverde, O., Marowsky, A., Porrazzo, A., Orban, P.C., Maldonado, R., Ehrengruber, M.U., Cestaru, V., Lipp, H.P., Chapman, P.F., 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.
- McClung, C.A., Nestler, E.J., 2008. Neuroplasticity mediated by altered gene expression. *Neuropsychopharmacology* 33, 3–17.
- McDaid, J., Dallimore, J.E., Mackie, A.R., Napier, T.C., 2006. Changes in accumbal and pallidal pCREB and Δ Fos in morphine-sensitized rats: correlations with receptor-evoked electrophysiological measures in the ventral pallidum. *Neuropsychopharmacology* 31, 1212–1226.
- Moranta, D., Esteban, S., García-Sevilla, J.A., 2009. Chronic treatment and withdrawal of the cannabinoid agonist WIN 55, 212–2 modulate the sensitivity of presynaptic receptors involved in the regulation of monoamine syntheses in rat brain. *Naunyn Schmiedeberg Arch. Pharmacol.* 379, 61–72.
- O'Brien, C.P., 2006. Drug addiction and drug abuse. In: Brunton, L.L. (Ed.), *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 11th edition. McGraw-Hill, New York, pp. 607–627.
- Park, S.M., Schickel, R., Peter, M.E., 2005. Nonapoptotic functions of FADD-binding death receptors and their signaling molecules. *Curr. Op. Cell Biol.* 17, 610–616.
- Ramos, J.W., in press. Pea15. *UCSD Nat. Mol. Pages.* doi:10.1038/mp.a002536.01.
- Ramos-Miguel, A., Miralles, A., García-Sevilla, J.A., 2007. Morphine-induced locomotor sensitization increases FADD phosphorylation in rat brain. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 17 (Suppl 4), S251–S252.
- Ramos-Miguel, A., García-Fuster, M.J., Callado, L.F., La Harpe, R., Meana, J.J., García-Sevilla, J.A., 2009. Phosphorylation of FADD (Fas-associated death domain protein) at serine 194 is increased in the prefrontal cortex of opiate abusers: relation to mitogen activated protein kinase, phosphoprotein enriched in astrocytes of 15 kDa, and Akt signaling pathways involved in neuroplasticity. *Neuroscience* 161, 23–38.
- Reich, A., Spering, C., Schultz, J.B., 2008. Death receptor Fas (CD95) signaling in the central nervous system: tuning neuroplasticity? *Trends Neurosci.* 31, 478–486.
- Renganathan, H., Vaidyanathan, H., Knapinska, A., Ramos, J.W., 2005. Phosphorylation of PEA-15 switches its binding specificity from ERK/MAPK to FADD. *Biochem. J.* 390, 729–735.
- Robinson, T.E., Kolb, B., 1999. Morphine alters the structure of neurons in the nucleus accumbens and neocortex of rats. *Synapse* 33, 160–162.
- Robinson, T.E., Kolb, B., 2004. Structural plasticity associated with exposure to drugs of abuse. *Neuropharmacology* 47, 33–46.
- Rochat-Steiner, V., Becker, K., Micheau, O., Schneider, P., Burns, K., Tschopp, J., 2000. FIST/HIPK3: a Fas/FADD-interacting serine/threonine kinase that induces FADD phosphorylation and inhibits fas-mediated Jun NH(2)-terminal kinase activation. *J. Exp. Med.* 192, 1165–1174.
- Romanova, E.V., Hatcher, N.G., Rubakhin, S.S., Sweedler, J.V., 2009. Characterizing intercellular signaling peptides in drug addiction. *Neuropharmacology* 56, 196–204.
- Russo, S.J., Bolanos, C.A., Theobald, D.E., DeCarolis, N.A., Renthal, W., Kumar, A., Winstanley, C.A., Renthal, N.E., Wiley, M.D., Self, D.W., Russell, D.S., Neve, R.L., Eisch, A.J., Nestler, E.J., 2007. IRS2-Akt pathway in midbrain dopamine neurons regulates behavioral and cellular responses to opiates. *Nat. Neurosci.* 10, 93–99.
- Russo, S.J., Mazei-Robinson, M.S., Ables, J.L., Nestler, E.J., 2009. Neurotrophic factors and structural plasticity in addiction. *Neuropharmacology* 56, 73–82.
- Scherle, P.A., Ma, W.G., Lim, H., Dey, S.K., Trzaskos, J.M., 2000. Regulation of cyclooxygenase-2 induction in the mouse uterus during decidualization. *J. Biol. Chem.* 275, 37086–37092.
- Scott, F.L., Stec, B., Pop, C., Dobaczewska, M.K., Lee, J.J., Monosov, E., Robinson, H., Salvesen, G.S., Schwarzenbacher, R., Riedl, S.J., 2009. The Fas-FADD death domain complex structure unravels signalling by receptor clustering. *Nature* 457, 1019–1022.
- Selcher, J.C., Atkins, C.M., Trzaskos, J.M., Paylor, R., Sweatt, J.D., 1999. A necessity for MAP kinase activation in mammalian spatial learning. *Learn. Mem.* 6, 478–490.
- Sharif, A., Renault, F., Beuvon, F., Castellanos, R., Canton, B., Barbeito, L., Junier, M.P., Chneiweiss, H., 2004. The expression of PEA-15 (phosphoprotein enriched in astrocytes of 15 kDa) defines subpopulations of astrocytes and neurons throughout the adult mouse brain. *Neuroscience* 126, 236–275.
- Smith, M.A., Greene-Naples, J.L., Lyle, M.A., Iordanou, J.C., Felder, J.N., 2009. The effects of repeated opioid administration on locomotor activity: I. opposing actions of μ and κ receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 330, 468–475.
- Spanagel, R., Shippenberg, T.S., 1993. Modulation of morphine-induced sensitization by endogenous kappa opioid systems in the rat. *Neurosci. Lett.* 153, 232–236.

- Stemmelin, J., Lukovic, L., Salome, N., Griebel, G., 2005. Evidence that the lateral septum is involved in the antidepressant-like effects of the vasopressin V_{1b} receptor antagonist, SSR149415. *Neuropsychopharmacology* 30, 35–42.
- Taracha, E., Chrapusta, S.J., Lehner, M., Skórzewska, A., Maciejak, P., Szyndler, J., Plaznik, A., 2008. Morphine and methadone pre-exposures differently modify brain regional Fos protein expression and locomotor activity responses to morphine challenge in the rat. *Drug Alcohol Depend.* 97, 21–32.
- Thomas, M.J., Kalivas, P.W., Shaham, Y., 2008. Neuroplasticity in the mesolimbic dopamine system and cocaine addiction. *Br. J. Pharmacol.* 154, 327–342.
- Trencia, A., Perfetti, A., Cassese, A., Vigliotta, G., Miele, C., Oriente, F., Santopietro, S., Giacco, F., Condorelli, G., Formisano, P., Beguinot, F., 2003. Protein kinase B/Akt binds and phosphorylates PED/Pea-15, stabilizing its antiapoptotic action. *Mol. Cell. Biol.* 23, 4511–4521.
- Vaidyanathan, H., Ramos, J.W., 2003. RSK2 activity is regulated by its interaction with PEA-15. *J. Biol. Chem.* 278, 32367–32372.
- Vaidyanathan, H., Opoku-Ansah, J., Pastorino, S., Renganathan, H., Matter, M.L., Ramos, J.W., 2007. ERK MAP kinase is targeted to RSK2 by the phosphoprotein PEA-15. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 19837–19842.
- Valjent, E., Corbillé, A.G., Bertran-Gonzalez, J., Hervé, D., Girault, J.A., 2006a. Inhibition of ERK pathway or protein synthesis during reexposure to drugs of abuse erases previously learned place preference. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 2932–2937.
- Valjent, E., Corvol, J.C., Trzaskos, J.M., Girault, J.A., Hervé, D., 2006b. Role of the ERK pathway in psychostimulant-induced locomotor sensitization. *BMC Neurosci.* 7, 20. doi:10.1186/1471-2202-7-20.
- Valmiki, M.G., Ramos, J.W., 2009. Death effector domain-containing proteins. *Cell. Mol. Life Sci.* 66, 814–830.
- Vanderschuren, L.J.M.J., Kalivas, P.W., 2000. Alterations in dopaminergic and glutamatergic transmission in the induction and expression of behavioral sensitization: a critical review of preclinical studies. *Psychopharmacology* 151, 99–120.
- Vanderschuren, L.J.M.J., Tjon, G.H.K., Nestby, P., Mulder, A.H., Schoffelmeer, A.N.M., De Vries, T.J., 1997. Morphine-induced long-term sensitization to the locomotor effects of morphine and amphetamine depends on the temporal pattern of the pretreatment regimen. *Psychopharmacology* 131, 115–122.
- Vanderschuren, L.J.M.J., Schoffelmeer, A.N.M., Mulder, A.H., De Vries, T.J., 1999. Dopaminergic mechanisms mediating the long-term expression of locomotor sensitization following pre-exposure to morphine or amphetamine. *Psychopharmacology* 143, 244–253.
- Vezina, P., Stewart, J., 1984. Conditioning and place-specific sensitization of increases in activity induced by morphine in the VTA. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 20, 925–934.
- Zhai, H., Li, Y., Wang, X., Lu, L., 2008. Drug-induced alterations in the extracellular signal-regulated kinase (ERK) signalling pathways: implications for reinforcement and reinstatement. *Cell. Mol. Neurobiol.* 28, 157–172.
- Zhang, J., Zhang, D., Hua, Z., 2004. FADD and its phosphorylation. *IUBMB Life* 56, 395–401.

Material complementario (Artículo IV)

Regulación de la maquinaria apoptótica durante el desarrollo y la expresión de la sensibilización a la morfina



▲ **Figura S4-1.** Ausencia de efecto del tratamiento repetido con morfina (10 mg/kg/día, 5 días; Mor 5; n = 7) y la abstinencia tras 3 (W3; n = 9) o 14 (W14; n = 9) días en ausencia del opiáceo en el estriado de ratas sobre la inmunodensidad de (A) la pro-caspasa-8 y su fragmento activo, y (B) el patrón de fragmentación PARP. Las columnas representan el promedio \pm SEM de la densidad calculada para cada grupo en porcentaje frente a las ratas control (C; n = 15). En los paneles inferiores se muestran autorradiogramas representativos del efecto de los tratamientos farmacológicos (dos ratas por grupo). (B) Las muestras fueron cargadas junto con un control negativo (NC) y otro positivo (PC) para identificar (véanse las flechas) las bandas correspondientes a PARP (116 kDa) y su fragmento (85 kDa)

La sobre-expresión de FADD podría incrementar la tasa apoptótica en células cerebrales. Aunque el incremento en la fosforilación de esta proteína observado en ratas sometidas a los tratamientos con morfina y abstinencia, no implique la activación de sus funciones apoptóticas, en este trabajo se evaluó la posible inducción de muerte celular en el tejido cerebral de estos animales.

Los resultados muestran que ni la pro-caspasa-8, una proteína que, junto a FADD se asocia al DISC para iniciar la vía apoptótica extrínseca, ni su fragmento activo se encontraron incrementados en las muestras cerebrales de las ratas sometidas a los tratamientos y abstinencia de morfina (figura S4-1A). Asimismo, el patrón de fragmentación de PARP, el enzima nuclear proteolizado tras la activación de los mecanismos efectores de la apoptosis, no se encontró alterado en las mismas muestras cerebrales (figura S4-1B).

Regulación de ERK a nivel subcelular y expresión de genes tempranos durante la expresión de la sensibilización a la morfina

Además de las alteraciones estriatales en homogenado total, en este trabajo se estudiaron sus posibles repercusiones en los distintos compartimentos subcelulares en dos ratas representativas de los tratamientos farmacológicos por cada grupo.

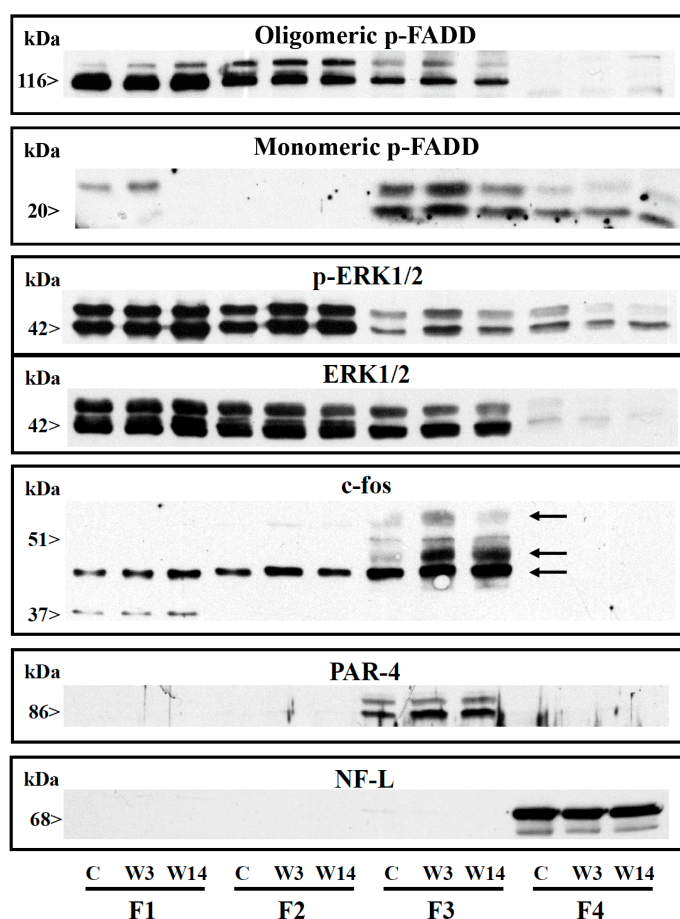


Figura S4-2. Autorradiogramas representativos del efecto del tratamiento repetido con morfina (10 mg/kg/día, 5 días) tras 3 (W3) o 14 (W14) días en ausencia del opiáceo en el estriado de ratas a nivel subcelular (F1: citosol; F2: membranas; F3: núcleo; y F4: citosequeleto) sobre p-FADD, la activación de ERK1/2 y la expresión del gen de expresión temprana c-fos. Las ratas control (C) recibieron salino en lugar de morfina. El elemento de respuesta apoptótica al cáncer de próstata-4 (PAR-4) y el neurofilamento de 68 kDa (NF-L) han sido empleados como marcadores (de núcleo y citoesqueleto, respectivamente) para comprobar la pureza de los extractos subcelulares.

Los resultados muestran que los incrementos observados en homogenado total durante la expresión de la sensibilización locomotora (W3), son producidos principalmente en la fracción nuclear (F3; figura S4-2), tanto para el oligómero (29-32%) y el monómero (21-49%) de p-FADD, como para p-ERK1/2 (101-132%), donde tienen la posibilidad de inducir a los denominados genes de expresión temprana. Entre ellos, c-fos es un factor de transcripción nuclear cuya inducción ha sido clásicamente asociada a cambios plásticos a nivel estructural. En la figura S4-2 se muestra cómo la activación de ERK1/2 en el núcleo durante W3 induce la expresión de c-fos de 65 kDa (2-3 veces), y de las formas truncadas de 45/50 kDa (4-5 veces). En W14, la inducción de c-fos remite, pero no la de sus formas truncadas, que se mantienen incrementadas dentro del mismo rango de inducción.

Regulación de statmina durante el desarrollo y la expresión de la sensibilización a la morfina

La activación de ERK1/2, así como de otras kinasas asociadas a la plasticidad neuronal, conlleva la sobre-expresión de genes cuyos productos están implicados en numerosas funciones. Entre ellas, la remodelación de la citoarquitectura neuronal es esencial en procesos de migración y ramificación dendrítica y/o axonal, sinaptogénesis u otras modificaciones estructurales de la neurona. La statmina es una proteína que regula la asociación entre α - y β -tubulina en la formación de los microtúbulos y, además es una diana de ERK.

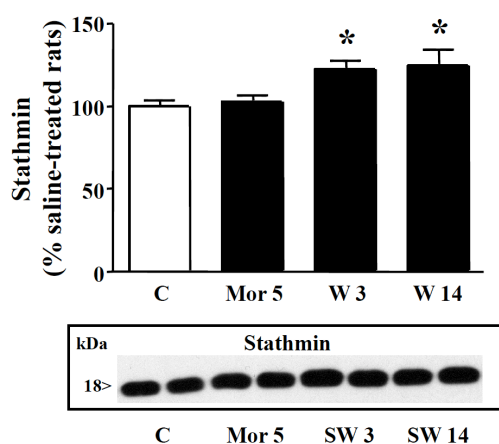


Figura S4-3. Efecto del tratamiento repetido con morfina (10 mg/kg/día, 5 días; Mor 5; $n = 7$) y la abstinencia tras 3 (W 3; $n = 9$) o 14 (W 14; $n = 9$) días en ausencia del opiáceo, en el estriado de ratas, sobre la inmunodensidad de statmina. Las columnas representan el promedio \pm SEM de la densidad calculada para cada grupo en porcentaje frente a las ratas control (C; $n = 15$). Un ANOVA detectó diferencias entre los grupos de tratamientos [$F(3, 36) = 5.8$; $p = 0.0025$]. * $p < 0.05$; ANOVA seguido del test de Bonferroni. En el panel inferior se muestra un autorradiograma representativo del efecto de los tratamientos farmacológicos (dos ratas por grupo).

En las muestras estriatales de las ratas sometidas a abstinencia de morfina (W 3 y W 14), tras el tratamiento repetido con el opiáceo (Mor 5), los niveles de statmina se hallaron incrementados (24-26%, $p < 0.05$; figura S4-3). Estos resultados sugieren que en este fenómeno de plasticidad conductual existe también una remodelación de la citoarquitectura neuronal, una alteración de largo plazo que es sostenida más allá que la alteración conductual.

ARTÍCULO V

Título Correlation of rat cortical FADD (Fas-associated death domain) protein phosphorylation with the severity of spontaneous morphine abstinence syndrome: Role of α_2 -adrenoceptors and extracellular signal-regulated kinases

Autores Ramos-Miguel A, Miralles A, García-Sevilla JA

Revista Journal of Psychopharmacology (en prensa; 31-7-2010)

Resumen

La fosforilación de FADD ha sido recientemente implicada en procesos de neuroplasticidad inducidos por los opiáceos. Con el propósito de explorar con más detalle el papel de esta proteína en los mecanismos moleculares que conducen a la dependencia a la morfina, la regulación de p-FADD, así como la posible interacción con los receptores adrenérgicos α_2 y con otras vías de señalización, fue evaluada en la corteza cerebral de ratas dependientes de morfina y durante la abstinencia a opiáceos. Los resultados indicaron que la inmunodensidad de la forma oligomérica de p-FADD fue correlativa a la intensidad del síndrome de abstinencia provocado por la retirada de la morfina (Spearman $\rho = 0.59$, $n = 39$, $p < 0.0001$). La inactivación de los adrenoceptores α_2 con EEDQ resultó en una potenciación tanto de la intensidad del síndrome conductual como del incremento de p-FADD oligomérico en la corteza cerebral durante la abstinencia a la morfina. Además, la inhibición de ERK1/2 astenuó la magnitud de la conducta asociada a la abstinencia a opiáceos después de 24 h tras la última dosis, pero no la observada tras 12 h en abstinencia. Sin embargo, esta inhibición de ERK1/2, no previno las alteraciones de p-FADD observadas durante el síndrome de abstinencia a opiáceos. Estos resultados indican que la forma oligomérica de p-FADD, en cooperación con los receptores α_2 , podría tener un papel en los mecanismos corticales que promueven la conducta prototípica de la abstinencia a la morfina en ratas.

Este artículo ha sido aceptado en "Journal of Psychopharmacology" con fecha de 31 de Julio de 2010, por lo que no ha sido posible adjuntarlo en el formato de la revista. Por ello, a continuación se incluye la carta de aceptación del mismo, remitida por el Dr. David Nutt, Editor Jefe de la revista, dirigida al Dr. García-Sevilla.

31st July 2010

Dear Prof. Garcia-Sevilla:

It is a pleasure to accept your manuscript entitled "Correlation of rat cortical FADD (Fas-associated death domain) protein phosphorylation with the severity of spontaneous morphine abstinence syndrome: Role of α 2-adrenoceptors and extracellular signal-regulated kinases" in its current form for publication in the Journal of Psychopharmacology. The comments of the reviewer(s) who reviewed your manuscript are included at the foot of this letter.

If you would like your article to be freely available online immediately upon publication (as some funding bodies now require), you can opt for it to be published under the SAGE Open Scheme on payment of a publication fee. Please simply follow the link to the Contributor Agreement form as normal and you will be able to access instructions and further information about this option within the online form.

Thank you for your fine contribution. On behalf of the Editors of the Journal of Psychopharmacology, we look forward to your continued contributions to the Journal.

Sincerely,

Prof. David Nutt

Editor, Journal of Psychopharmacology

D.Nutt@imperial.ac.uk

Journal of Psychopharmacology

Full Research Report (Revised Ms. ID JOP-2010-1156; July 7, 2010)

Correlation of rat cortical FADD (Fas-associated death domain) protein phosphorylation with the severity of spontaneous morphine abstinence syndrome: Role of α_2 -adrenoceptors and extracellular signal-regulated kinases

Alfredo Ramos-Miguel *Laboratori de Neurofarmacologia, IUNICS, Universitat de les Illes Balears, Palma de Mallorca, and RETICS – RTA, Spain*

Antonio Miralles *Laboratori de Neurofarmacologia, IUNICS, Universitat de les Illes Balears, Palma de Mallorca, and RETICS – RTA, Spain*

Jesús A. García-Sevilla *Laboratori de Neurofarmacologia, IUNICS, Universitat de les Illes Balears, Palma de Mallorca, and RETICS – RTA, Spain*

Corresponding author: Jesús A. García-Sevilla, Laboratory of Neuropharmacology, Institut Universitari d'Investigació en Ciències de la Salut (IUNICS), University of the Balearic Islands, Cra. Valldemossa km 7.5, E-07122 Palma de Mallorca, Spain. E-mail: jesus.garcia-sevilla@uib.es

Sources of support:

This research was supported by grant SAF2008-01311 from the Ministerio de Ciencia e Innovación (MICINN, Madrid), grant 2007I032 from the Plan Nacional sobre Drogas/Ministerio de Sanidad y Consumo (MSC, Madrid), and Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER), Spain. The study was also funded by Red Temática de Investigación Cooperativa en Salud—Trastornos Adictivos (RETICS-RTA, RD06/0001/0003, Instituto de Salud Carlos III, MICINN-FEDER, Madrid). A. R.-M. was supported by a predoctoral fellowship (FPI) from MICINN-FEDER and at present holds a contract from RETICS.

Conflict of interest:

The authors declare they have no conflicts of interest.

Running title: FADD phosphorylation and spontaneous morphine withdrawal.

Abbreviations: Akt/PKB, v-akt murine thymoma viral oncogene homologue/protein kinase B; Arc, activity-regulated cytoskeleton-associated protein; CK1 α , casein kinase 1 α ; DMSO, dimethyl sulfoxide; ECL, enhanced chemiluminescence; EEDQ, N-ethoxycarbonyl-2-ethoxy-1,2-dihydroquinoline; ERK, extracellular signal-regulated kinase; FADD, Fas-associated death domain; Fas, FS7-associated cell surface antigen or TNFRSF6, tumor necrosis factor receptor superfamily 6; FLIP_L, FLICE-like inhibitory protein; JNK, c-Jun NH₂-terminal protein kinase or stress-activated protein kinase (SAPK); MAPK, mitogen activated protein kinase; MEK, MAP/ERK kinase; NF- κ B, nuclear transcription factor- κ B; p, phosphorylated; p38 MAPK, p38 kinase of 38 kDa; PEA-15, phosphoprotein enriched in astrocytes of 15 kDa; SDS-PAGE, sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis; SL 327, α -amino-(4-aminophenylthio)-methylene-2-(trifluoromethyl)-benzeneacetonitrile; SW, spontaneous withdrawal.

Abstract

FADD phosphorylation was recently implicated in opiate-induced neuroplasticity. To further explore the role of FADD in the mechanisms of morphine-induced physical dependence, the regulation of cortical p-FADD (and their interactions with α_2 -adrenoceptors and other signaling pathways) was assessed during spontaneous opiate withdrawal (SW) in morphine-dependent rats (10-100 mg/kg for 6 days). The main results indicated that oligomeric p-FADD in the cerebral cortex mirrored the time course of morphine SW (12-96 h), which resulted in a striking correlation between p-FADD and the intensity (behavioral scores) of morphine abstinence (Spearman correlation coefficient: 0.59, $n = 39$, $p < 0.0001$). The inactivation of brain α_2 -adrenoceptors (EEDQ at SW 12 h) further enhanced morphine abstinence intensity and cortical p-FADD content at SW 24 h. The disruption of ERK1/2 signaling (SL 327 at SW 4 h and SW 8 h) did not alter morphine abstinence at SW 12 h, but it attenuated the behavioral syndrome at SW 24 h. This inhibition of ERK1/2, however, did not prevent the up-regulation of oligomeric p-FADD at SW 12 h and 24 h. These data indicate that cortical oligomeric p-FADD, mainly through an interaction with inhibitory α_2 -adrenoceptors, plays a functional role in the behavioral expression of morphine abstinence in rats.

Key words

Opiate addiction; morphine spontaneous withdrawal; FADD phosphorylation; α_2 -adrenoceptors; MAP kinases; Akt1 kinase; PEA-15; rat brain

Introduction

Fas-associated death domain (FADD) protein was originally described as an intermediate adaptor molecule mediating the apoptotic signals of Fas receptor (TNFRSF6, tumor necrosis factor receptor superfamily 6), a key function also shared by several types of death receptors (Chinnaiyan et al., 1995; Alexander et al., 2009). In Fas receptor-mediated cell death and after sufficient Fas-ligand stimulation (with massive receptor clustering), the intra-cytoplasmic tail of Fas and cytosolic FADD are bound through homotypic death domain (DD) interactions after a Fas DD opening transition (Salvesen and Riedl, 2009). Then FADD, also lacking enzymatic activity, can recruit death effector domain (DED)-containing initiator pro-caspase 8 through DED/DED interactions, which results in the formation of the death inducing signaling complex (Algeciras-Schimmich et al., 2002; Salvesen and Riedl, 2009). FADD also displays, outside its C-terminal DD, a single serine phosphorylation site (Ser194 in human; Ser191 in mouse; Ser194 or Ser195 in rat; Zhang et al., 2004; García-Fuster et al., 2008a), catalyzed by casein kinase 1 alpha (CK1 α) (Alappat et al., 2005) and possibly other as yet unidentified kinases (Scaffidi et al., 2000; Zhang et al., 2004), which is crucial for its additional role in mediating non-apoptotic actions such as *in vitro* cell survival/proliferation and cycle progression (Hua et al., 2003; Alappat et al., 2005) and *in vivo* neuroplasticity induced by opiate drugs (García-Fuster et al., 2008b; Ramos-Miguel et al., 2009; 2010) and cocaine (García-Fuster et al., 2009).

Chronic exposure to drugs of abuse induces aberrant forms of structural and behavioral plasticity that may underlie a number of brain dysfunctions in humans (Kalivas and O'Brien, 2008). Although numerous investigations have uncovered many relevant brain neurochemical adaptations in drug addiction (Hyman et al., 2006; Le Moal and Koob, 2007; Christie, 2008), the identification of new neural substrates and their interactions with classic targets is still needed to better understand the neurobiology of this chronic process. In opiate addiction, drug dependence and behavioral sensitization (neuroadaptation processes) have been shown to represent major causes in the long persistence of relapse risk in the addicted person. In this context, the imbalance between phosphorylated (p) FADD and FADD (increased p-FADD/FADD ratio) and their interactions with specific signaling pathways [e.g. mitogen activated protein (MAP) kinases; Akt or protein kinase B; and phosphoprotein enriched in astrocytes of 15 kDa (PEA-15)], were recently shown to play important neuroadaptive roles in brains of chronic opiate abusers (Ramos-Miguel et al., 2009) as well as in mediating the

short-lasting expression of unconditioned psychomotor sensitization induced by morphine in rats (Ramos-Miguel et al., 2010).

The distressful abstinence syndrome often experienced by opiate abusers during the course of addiction (negative reinforcing effects) is a complex behavioral/neurochemical process (Daglish et al., 2003; Williams et al., 2007), a major cause for restarting drug use (avoidance of drug withdrawal), and its manifestation a clear demonstration of opiate physical dependence. In opiate-dependent rodents, the involvement of the noradrenergic system in the expression of somatic symptoms and behavioral signs of morphine withdrawal is well documented (Maldonado, 1997). The spontaneous or antagonist-precipitated morphine withdrawal induces various changes in brain neuronal activities but especially in the nucleus locus ceruleus, whose hyperactive noradrenergic neurons and the increased release of norepinephrine in target areas (e.g. the cerebral cortex), mediate most of the behavioral features of the abstinence syndrome (Maldonado, 1997). The morphine withdrawal syndrome is also associated with adaptations of various neurotransmitter receptors (Maldonado, 1997) and receptor regulatory mechanisms (Ozaita et al., 1998), including the inhibitory α_2 -adrenoceptors whose stimulation induces anti-withdrawal effects (Aghajanian, 1978; Ulibarri et al., 1987; Maldonado, 1997). In this context, chronic morphine treatment followed by spontaneous opiate withdrawal was shown to induce upregulation of α_2 -adrenoceptors (receptor density and mRNA) in rat brain (Ulibarri et al. 1987; Gabilondo and García-Sevilla, 1995; Busquets et al., 1997). These findings indicated that the natural adaptation of inhibitory α_2 -adrenoceptors regulating norepinephrine release is a relevant mechanism by which the morphine abstinence syndrome can be counteracted.

To further explore the role of multifunctional FADD in opiate addiction (withdrawal syndrome as a consequence of physical dependence), this study was designed to assess the regulation of cortical p-FADD, the FADD species involved in neuroplasticity, during the development of spontaneous morphine withdrawal in opiate-dependent rats (time course and intensity during 2-96 h). The involvement of α_2 -adrenoceptors and signaling pathways (MAP kinases, Akt1 kinase, PEA-15) in the modulation of the behavioral syndrome and the content of p-FADD were also investigated. In addition, other proteins related to neural plasticity such as FLICE-like inhibitory protein (FLIP_L), Arc (activity-regulated cytoskeleton-associated protein), nuclear transcription factor- κ B (NF- κ B), c-Fos and FosB were also quantified in the rat brain during the development of spontaneous morphine withdrawal.

Materials and methods

Animals, induction of morphine dependence, and other drug treatments

Male Sprague-Dawley rats (180-220 g) were used (Charles River, Barcelona, Spain). The rats were housed (three per cage) in the animal facilities under controlled conditions of temperature ($20\pm 2^{\circ}\text{C}$), humidity (70%) and light/dark cycle (light period: 8:00 to 20:00), and they had free access to a standard diet and tap water. The studies were performed in accordance with the NIH Guidelines for Care and Use of Laboratory Animals (1985), the European Communities Council Directive 1986 (86/609/EEC), and the local Bioethical Committee of the University of the Balearic Islands (UIB).

Groups of rats were initially treated with morphine (i.p.), three times daily (at 09:00, 15:00 and 21:00 h), during six consecutive days (day 1: 10, 10 and 10 mg/kg; day 2: 10, 20 and 20 mg/kg; day 3: 20, 20 and 40 mg/kg; day 4: 40, 40 and 80 mg/kg; day 5: 80, 80 and 100 mg/kg; day 6: 100 mg/kg). Control rats ($n = 13$) received saline (1 ml/kg) by using the same injection schedule. This chronic intermittent and escalating dosing schedule of morphine administration to develop physical dependence was well tolerated and induced low mortality (9 rats out of 107 animals). Similar chronic morphine treatments in rats have been shown to induce a strong opiate physical dependence, which resulted in a severe abstinence syndrome following spontaneous or naloxone-precipitated withdrawal (Ulibarri et al., 1987, Gabilondo and García-Sevilla, 1995). After the chronic morphine treatment, the rats ($n = 98$) were randomly assigned to one of the following experimental protocols (Figure 1): (1) a first group of rats ($n = 46$) was left undisturbed in the home cages during 2 h ($n = 7$; representing the chronic effect), 12 h ($n = 11$), 24 h ($n = 12$), 48 h ($n = 8$), 72 h ($n = 4$), and 96 h ($n = 4$) to assess the time course and intensity of the spontaneous morphine withdrawal syndrome, and immediately after the behavioral assessment some rats were killed at each time point to quantify the modulation of p-FADD, total FADD and other target proteins in the brain; (2) a second group of rats ($n = 16$) received a single dose of vehicle (ethanol/propylene glycol/water, 1 ml/kg, i.p., $n = 8$) or EEDQ (1.6 mg/kg, i.p., $n = 8$) at 12 h of SW, and the intensity of abstinence and the content of selected target proteins were quantified 12 h later (24 h of SW) to assess the alteration in the system after α_2 -adrenoceptor protein inactivation (Miralles et al., 1993; Ozaita et al., 1999); (3) a third group of rats ($n = 36$) received two doses

of vehicle (DMSO, 1 ml/kg, i.p., n = 19) or SL 327 (20 mg/kg, i.p. n = 17) at 4 h and 8 h of SW, and abstinence intensity and target proteins were quantified at 12 h and/or 24 h of SW to assess the alteration in the system induced by disruption of MEK1/2/ERK1/2 signaling (Ramos-Miguel et al., 2010) (Figure 1). Other groups of naive rats received vehicle (n = 4) or a high dose of EEDQ (6 mg/kg i.p., n = 4) for 24 h to assess the effect of irreversible inactivation of several types of neurotransmitter receptors (Meller et al., 1988) on the content of Fas receptor, FADD, p-FADD and p-ERK1/2 in the brain.

Quantification of morphine withdrawal syndrome

In morphine-dependent rats (10-100 mg/kg for 6 days), the behavioral syndrome induced by spontaneous opiate withdrawal (SW) was assessed by an observer blind to the treatments as previously described (Bläsig et al, 1973; Ulibarri et al., 1987). At specific time intervals after the last morphine administration (i.e. at 2 h, n = 46; 12 h, n = 39; 24 h, n = 28; 48 h, n = 16; 72 h, n = 8; and 96 h, n = 4), various withdrawal signs were checked (scream on touch/hostility on handling, lacrimation, and diarrhea) and counted (wet-dog shaking, teeth chattering, grooming, digging, rearing, cage crossing, and writhing) during a 10-min period (excluding the initial 5 min of habituation to the observation cage and environment). For each rat, the score on the withdrawal syndrome rating scale was the number of checked signs (multiplied by a weighting factor; Gellert and Holtzman, 1978) plus the number of times the counted behaviors occurred during the observation period. After the behavioral assessment, some rats were killed at each time point for brain neurochemical analyses (see above). In addition, body weight loss was evaluated at 12 h and 24 h of SW as a characteristic peripheral somatic feature of physical dependence on morphine, and it was analyzed in experiments involving EEDQ and SL 327 (see above). In contrast to naloxone-precipitated withdrawal, the spontaneous withdrawal of morphine in rats induces a less intense abstinence syndrome in which some of the antagonist-precipitated signs are not observed (e.g. ptosis, chromodacryorrhea, profuse salivation, jumping/flying, and penile erection or ejaculation) (see Gabilondo and García-Sevilla, 1995). Chronic saline-treated rats (6 days) were similarly rated for altered behavioral signs 2-96 h post-treatment.

Brain samples, immunoblot assays, and quantification of target proteins

The rats were killed without anesthesia by decapitation. The brains were removed and the parieto-occipital cortices were dissected on ice, frozen in liquid nitrogen, and stored at -80°C . Brain samples (150-200 mg; total homogenate) were prepared for Western blot analysis of proteins as described (García-Fuster et al., 2007). Protein concentration was determined with the BCA Assay (Pierce Biotechnology). Brain proteins (40 μg) were resolved by electrophoresis on 10-12% SDS-PAGE minigels (Bio-Rad Laboratories), which was followed by immunoblot standard procedures (Ramos-Miguel et al., 2010). The primary affinity-purified antibodies (1:500-1:10,000 dilution; overnight incubation at 4°C) are listed in Supplementary Table S1, and they were characterized and validated previously (Ramos-Miguel et al., 2010 and other references therein). In brain tissue, FADD and p-FADD are immunodetected as monomeric (23 kDa), homo-dimeric/trimeric (51-75 kDa) and higher oligomeric (116 kDa) species (García-Fuster et al., 2007, 2008a). In particular, oligomeric p-FADD was mainly immunodetected with anti-p-Ser191 FADD mouse antibody, and monomeric p-FADD with anti-p-Ser194 FADD human antibody (see García-Fuster et al., 2008a). The blots were developed with peroxidase-conjugated secondary antibodies, subjected to ECL detection system, and the signal of bound antibody visualized by exposure to autoradiographic film (Amersham International). The intensity of the protein bands on autoradiograms was quantified by densitometric scanning (GS-800 Imaging Densitometer, Bio-Rad Laboratories). The amount of target proteins in brain samples of morphine-treated and morphine-withdrawn rats (see Figure 1, experimental protocols) was compared in the same gel with that of control rats, which had received saline and/or vehicle solution. The quantification procedure was assessed 3-5 times in different gels (each gel with different brain samples from control and drug-treated rats). Finally, percent changes in immunoreactivity with respect to control samples (100%) were calculated for each treated rat in the various gels and the mean value used as a final estimate (Ramos-Miguel et al., 2010). As a control for sample loading and protein transfer, the blots were stripped and reprobed with anti- β -actin monoclonal antibody, and target protein content was normalized to that of β -actin. Activation of MAP kinases and Akt1 kinase, as well as PEA-15 protein phosphorylation, were expressed as the ratio of p-enzyme or p-protein to the corresponding total enzyme or total protein and reported as a percentage of that in control rats.

Drugs and materials

Morphine hydrochloride was obtained from Alcaliber S.A. (Madrid, Spain) and dissolved in 0.9% saline. The MEK1/2 inhibitor SL 327, [α -amino-(4-aminophenylthio)-methylene-2-(trifluoromethyl)-benzeneacetonitrile], was from Tocris Cookson Ltd. (Avonmouth, UK) and dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO). The alkylating agent EEDQ (N-ethoxycarbonyl-2-ethoxy-1,2-dihydroquinoline) was from Sigma Chemical Co. (St Louis, MO, USA) and dissolved in ethanol and diluted with propylene glycol/water in a final volume ratio of 1:1:2. The primary affinity-purified antibodies and their sources are listed in Supplementary Table1. Other materials and reagents for immunoblot analyses were from Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, USA), Amersham International (Buckinghamshire, UK), Pierce Biotechnology (Rockford, IL, USA) or Sigma Chemical Co.

Data analysis and statistics

All series of data were analyzed with GraphPad Prism™ software, version 4.0. Results are expressed as mean values \pm standard error of the mean (SEM). Data conforming to the assumptions of parametric analysis (neurochemical data) were analyzed by using one-way ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparison tests. Data not conforming to the assumptions of parametric analysis (morphine withdrawal syndrome: behavioral scores) were analyzed by using Kruskal-Wallis one-way ANOVA followed by Dunn's multiple comparison tests. The correlation between variables was carried out by using Pearson's r (parametric variables) or Spearman's ρ (non-parametric variables) tests. All tests were two-tailed and $p < 0.05$ was considered significant.

Results

p-FADD upregulation in the cerebral cortex of chronic morphine-withdrawn rats: correlation with the intensity of abstinence syndrome

After the chronic administration of morphine (10-100 mg/kg for 6 days), the spontaneous opiate withdrawal (SW) induced a severe behavioral syndrome that peaked around 24 h and declined gradually up to 96 h (Figure 2A). In the same rats, chronic morphine (2 h post-

treatment) did not significantly alter the content of total FADD (data not shown) or oligomeric and monomeric p-FADD in cortex (Figure 2B). In parallel with the time-course and intensity of morphine SW, oligomeric p-FADD was significantly upregulated (33-45% at 12-24 h) and monomeric p-FADD downregulated (34-65% at 12-96 h) in cortex (Figure 2B). In the same brain samples, the ratio of oligomeric p-FADD to monomeric p-FADD was markedly increased (2.2- to 2.9-fold) at all time points (12-96 h) of morphine SW (Figure 3). Total FADD was not significantly altered in cortex during the time-course of morphine SW (12-96 h), although it showed a tendency for a decrease (2-27%, $p > 0.05$). Chronic morphine treatment and morphine SW (12-96 h) did not alter brain CK1 α content (increases up to 11%, $p > 0.05$), the main enzyme that induces FADD phosphorylation in human and mouse cells.

Notably, Spearman correlation analyses carried out on 39 rats during morphine SW (12-96 h) demonstrated that the intensity of the abstinence syndrome (behavioral scores) significantly correlated with the content of oligomeric p-FADD in cerebral cortices ($\rho = 0.59$, $p < 0.0001$) (Figure 2C). In contrast, the behavioral ratings of morphine SW did not significantly correlate with the content of monomeric p-FADD ($\rho = 0.21$, $p = 0.22$) or total FADD ($\rho = 0.07$, $p = 0.70$) in the cerebral cortex of the same rats.

Brain α_2 -adrenoceptor inactivation enhanced the intensity of morphine abstinence and the content of cortical oligomeric p-FADD in rats

The selective inactivation of brain α_2 -adrenoceptors with a low dose of EEDQ (1.6 mg/kg, i.p.), during the development of morphine SW (EEDQ at SW 12), markedly enhanced the intensity of the behavioral syndrome 12 h later (SW 24: 52% above values after vehicle) (Figure 4, left), without significantly altering the observed loss of body weight at SW 24 h (Figure 4, right). Concomitantly with the potentiation of morphine abstinence, α_2 -adrenoceptor inactivation induced a significant increase in the content of oligomeric p-FADD (SW 24: 34 % above values after vehicle), but not of monomeric p-FADD, in the cerebral cortex of the same rats (Figure 4B).

Treatment of naive rats with a high dose of EEDQ (6 mg/kg, i.p.), which results in irreversible inactivation of several types of neurotransmitter receptors (Meller et al., 1988), did not alter the gross behavior of the animals or the contents of Fas receptor, total FADD, p-

FADD (oligomeric and monomeric forms) or p-ERK1/2 MAP kinase in cortex (data not shown).

Regulation of ERK, JNK and p38 MAP kinases, Akt1 kinase and PEA-15 after chronic morphine and during opiate withdrawal in rats

Chronic morphine (10-100 mg/kg for 6 days, and 2 h post-treatment) was associated with a marked downregulation (37%) in the rate of phosphorylation (activation) of ERK1/2 (similar changes for ERK1 and ERK2 isoforms) in cortex (Figure 5A). The SW of morphine induced a rapid rebound in the activation of ERK1/2 toward control values (at SW 12 h), and ERK activity remained unchanged during the following 24-96 h of morphine SW. In contrast, chronic morphine and morphine SW (12-96 h) did not significantly alter the activation of JNK1/2 or p38 MAP kinases in cortex (Figure 5B/C).

Chronic morphine (10-100 mg/kg for 6 days, and 2 h post-treatment) did not significantly alter the content of p-Ser473 Akt1 or p-Ser116 PEA-15 in the cerebral cortex (Figure 6A/B). However, morphine SW (12-96 h) induced progressive decreases in p-Akt1 (3-26%) and p-PEA-15 (3-39%) in cortex (Figure 6A/B). As expected, the contents of p-Akt1 and p-PEA-15 correlated in the same cortical samples ($r = 0.65$, $n = 38$, $p < 0.0001$). The content of p-PEA-15 also showed a positive and significant correlation with that of monomeric p-FADD ($r = 0.61$, $n = 38$, $p < 0.0001$), but not with oligomeric p-FADD ($r = 0.23$, $n = 39$, $p = 0.167$).

MEK/ERK1/2 inhibition reduced the intensity of morphine abstinence but not the upregulation of cortical oligomeric p-FADD in rats

Treatment with the brain penetrating MEK inhibitor SL 327 (2 x 20 mg/kg, i.p.) during the development of morphine SW (SL 327 injected at 4 and 8 h of SW) markedly decreased (45%) the activation of ERK1/2 in the cerebral cortex 4 h later (SW 12 h), but not at longer time intervals (SW 24 h) (Figure 7A). The disruption of ERK1/2 signaling during the initiation of morphine SW (4-8 h) did not alter the intensity of morphine abstinence at SW 12 h, but markedly attenuated (45%) the behavioral syndrome at SW 24 h, without altering the observed loss of body weight (Figure 7C/D). The early inhibition of ERK1/2 signaling (SW

4-8 h), however, did not prevent the up-regulation of oligomeric p-FADD (21-35%) and down-regulation of monomeric p-FADD (44-54%) induced by morphine SW at 12 h and 24 h (Figure 7B).

Modulation of other proteins related to structural and/or behavioral plasticity in chronic morphine-withdrawn rats

Chronic morphine (10-100 mg/kg for 6 days; 2 h post-treatment) and morphine SW (12-96 h) did not significantly alter the contents of FLIP_L (a binding partner of FADD), NF- κ B (precursor protein and subunits), Arc protein (a regulator of cytoskeleton dynamics), and Fos early gene products (c-Fos, FosB, and Δ FosB truncated form) in the cerebral cortex (Figure 8, representative immunoblots).

Discussion

The main finding of this study revealed that the content of oligomeric p-FADD in the cerebral cortex paralleled the time-course and intensity of the spontaneous abstinence syndrome in chronic morphine-withdrawn rats. In addition, there was a striking correlation between the severity of morphine SW and the content of oligomeric p-FADD in the cortex of individual rats, suggesting that the non-apoptotic/neuroplastic actions of p-FADD (García-Fuster et al., 2008a; Ramos-Miguel et al., 2009, 2010) participate in the complex molecular mechanisms associated with the expression of physical dependence on morphine. Moreover, α_2 -adrenoceptors had a crucial role in regulating simultaneously the intensity of morphine SW and the content of p-FADD in the cerebral cortex. MEK/ERK signaling also participated in the expression of the morphine abstinence syndrome through mechanisms not directly related to the modulation of p-FADD.

In contrast to oligomeric p-FADD, the modulation of monomeric p-FADD and total FADD in the cerebral cortex did not show significant associations with the intensity of morphine abstinence. These FADD forms were markedly down-regulated (monomeric p-FADD) or slightly decreased (FADD) during the time-course of morphine SW. These data suggested that the relevant up-regulation of oligomeric p-FADD during SW was related to the

known process of monomeric p-FADD self-association (see Ramos-Miguel et al., 2009), which can explain the opposite regulation of oligomeric and monomeric p-FADD forms (dynamic relationship) in chronic morphine-withdrawn rats. In fact, the ratio of oligomeric p-FADD to monomeric p-FADD was markedly increased during morphine SW (12-96 h), suggesting that the abstinence syndrome induced p-FADD oligomerization and the involvement of this p-FADD form in neuroplasticity (Ramos-Miguel et al., 2009, 2010). Interestingly, chronic morphine treatment and SW did not modulate other neuroplastic proteins in rat cortex (FLIP_L, NF- κ B, Arc protein, c-Fos, and FosB), which have been associated with opiate-induced neuroadaptations in the human prefrontal cortex (García-Fuster et al., 2008b) and in rodent dopaminergic brain regions (McClung et al., 2004; Bramham et al., 2008; Russo et al., 2009). These negative data further reinforced the functional role of up-regulated cortical p-FADD in the molecular mechanisms and behavioral expression of physical dependence on morphine.

The activation of inhibitory α_2 -adrenoceptors in brain has been demonstrated to suppress most of the symptoms of morphine abstinence in rodents (see Ulibarri et al., 1987; Maldonado, 1997). In chronically morphine-treated rats, the modulation of α_2 -adrenoceptor density during SW (3-72 h) was shown to directly correlate with the bell-shaped intensity of the abstinence syndrome (Ulibarri et al., 1987). This remarkable finding appears to be consistent with the striking correlation between morphine abstinence severity and the regulation of cortical p-FADD observed in the current study. Thus, the selective inactivation of brain α_2 -adrenoceptors (EEDQ for 12 h was shown to reduce receptor density by 90%; Miralles et al., 1993) during the development of morphine SW resulted in a potentiation in the intensity of behavioral signs and in a greater up-regulation of oligomeric p-FADD in cortex at SW 24 h. These findings not only reinforced the important functional role of oligomeric p-FADD in the behavioral expression of morphine abstinence, but they also suggested that FADD participated in the signaling of α_2 -adrenoceptors in brains of morphine-dependent rats. In fact, treatment of naive rats with the α_2 -adrenoceptor agonist clonidine or brimonidine (UK14303) was shown to dose-dependently (0.03-3 mg/kg) reduce total FADD in cortex (27-54%), an effect that was prevented with the selective α_2 -adrenoceptor antagonist RX821002 (García-Sevilla and García-Fuster, 2009). These results clearly indicated that multifunctional FADD is a relevant down-stream molecule that participates in the signaling mechanisms associated with the stimulation of α_2 -adrenoceptors.

The involvement of ERK1/2 signaling in the induction of behavioral plasticity to drugs of abuse, including the opiates, is well documented in laboratory animals (see Zhai et al., 2008; Brami-Cherrier et al., 2009). Long-term opiate addiction was also shown to be associated with a pronounced down-regulation in the phosphorylation status (activation) of ERK1/2 in the prefrontal cortex of human addicts (Ferrer-Alcón et al., 2004; Ramos-Miguel et al., 2009). Furthermore, the activation of ERK1/2, but not JNK1/2 and p38 MAP kinases, has been involved in mediating the short-lasting expression of morphine-induced psychomotor sensitization in rats (Ramos-Miguel et al., 2010). In the current study, chronic morphine treatment (10-100 mg/kg for 6 days) induced a marked reduction of ERK1/2 activation in cortex (2 h post-treatment), an inhibitory effect that was rapidly lost during the time-course of SW (12-96 h). In contrast, chronic morphine and SW did not modulate the activities of pro-apoptotic JNK1/2 and p38 MAP kinases. To further assess the role of ERK1/2 during morphine abstinence (behavioral syndrome and p-FADD regulation), the compound SL 327 was used to inhibit MEK1/2 and consequently ERK1/2 activation in the brain. As expected, SL 327 (administered at SW 4 h and 8 h) strongly reduced ERK1/2 activation at SW 12 h but not at SW 24 h, possibly due to the short half-life of the MEK inhibitor (Selcher et al., 1999; Ramos-Miguel et al., 2010). Interestingly, the disruption of ERK1/2 signaling attenuated the intensity of morphine abstinence at SW 24 h (but not at SW 12 h), suggesting that the delayed behavioral response to ERK1/2 inhibition may involve longer time periods that are required for the regulation of ERK-associated nuclear targets (Brami-Cherrier et al., 2009). In any case, the inhibition of ERK1/2 did not prevent the up-regulation of oligomeric p-FADD or the down-regulation of monomeric p-FADD at SW 12 h and 24 h, indicating that ERK1/2 signaling was not directly involved in the regulation of p-FADD during morphine SW. The ERK1/2 pathway had, however, a direct impact on the modulation of morphine abstinence symptoms [chronic morphine: reduced p-ERK1/2 and absence of withdrawal signs (Figures 5A and 1A); acute SL 327 during morphine SW: reduced p-ERK1/2 and attenuation of withdrawal signs (Figure 7)]. In contrast, other studies have reported that disruption of ERK1/2 signaling with high doses of SL 327 (50-100 mg/kg) did not attenuate opiate abstinence symptoms induced by naloxone-precipitated withdrawal in morphine-dependent rodents (Almela et al., 2007; Moulédous et al., 2007). It appears that morphine SW (slow appearance of symptoms lasting 2-3 days) is a better method than antagonist-precipitated withdrawal (rapid appearance of symptoms lasting 1-2 hours) to unravel the time-dependent involvement of relevant receptors and signaling (neuroadaptive) proteins (e.g. α_2 -

adrenoceptors and ERK1/2) in the regulation of the abstinence syndrome (see Gabilondo and García-Sevilla, 1995; Ozaita et al., 1998; Edwards et al., 2009). Therefore, the paradigm of morphine SW is particularly pertinent when specific findings in brains of laboratory animals are translated to the context of human opiate addiction.

Finally, FADD has been shown to interact with other cytosolic DED-molecules such as PEA-15 to further regulate the ERK pathway (Valmiki and Ramos, 2009). The phosphorylation of PEA-15 at Ser116, mediated by Akt1, is a necessary step to alter the balance between FADD and ERK1/2 (Renganathan et al., 2005), and thus PEA-15 can participate in opiate-induced neuroplasticity (Ramos-Miguel et al., 2009, 2010). In a previous study, the striatal up-regulation of oligomeric p-FADD working in concert with increased activations of PEA-15/Akt1 and ERK1/2 were shown to play a major role in mediating the short-lasting expression of unconditioned psychomotor sensitization induced by morphine in rats (Ramos-Miguel et al., 2010). In the present study, however, the cortical up-regulation of oligomeric p-FADD during the development of morphine SW was associated with decreased PEA-15/Akt1 activation and normal ERK1/2 activity. These contrasting results (striatal plasticity vs cortical plasticity) indicated that although p-FADD was clearly involved in both opiate behavioral models they were regulated by different brain region-specific mechanisms.

In conclusion, cortical oligomeric p-FADD, through interactions with α_2 -adrenoceptors and ERK1/2 signaling, plays a functional role in the behavioral expression of spontaneous morphine abstinence syndrome in chronically opiate-treated rats. The neuroplastic actions induced by multifunctional FADD protein can help to better understand the complex neuropharmacological and neuroadaptive mechanisms involved in the induction of physical dependence on morphine.

Acknowledgements

This research was supported by grant SAF2008-01311 from the Ministerio de Ciencia e Innovación (MICINN, Madrid), grant 2007I032 from the Plan Nacional sobre Drogas/Ministerio de Sanidad y Consumo (MSC, Madrid), and Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER), Spain. The study was also funded by Red Temática de Investigación Cooperativa en Salud—Trastornos Adictivos (RETICS-RTA, RD06/0001/0003, Instituto de Salud Carlos III, MICINN-FEDER, Madrid). A. R.-M. was supported by a predoctoral

fellowship (FPI) from MICINN and at present holds a contract from RETICS. The authors thank Mr. Antonio J. Crespo for skillful technical assistance. Jesús A. García-Sevilla is a member of the Institut d'Estudis Catalans (Barcelona, Catalonia, Spain).

References

- Aghajanian GK (1978) Tolerance of locus coeruleus neurones to morphine and suppression of withdrawal response by clonidine. *Nature* 276: 186-188.
- Alappat EC, Feig C, Boyerinas B, Volkland J, Samuels M, Murmann AE, Thorburn A, Kidd VJ, Slaughter CA, Osborn SL, Winoto A, Tang WJ, Peter ME (2005) Phosphorylation of FADD at serine 194 by CKI α regulates its nonapoptotic activities. *Mol Cell* 19: 321-332.
- Alexander SPH, Mathie A, Peters JA (2009) *Guide to Receptors and Channels (GRAC)*, 4th edn. *Br J Pharmacol* 158 (Suppl. 1): S1-S254.
- Algeciras-Schimmich A, Shen L, Barnhart BC, Murmann AE, Burkhardt JK, Peter ME (2002) Molecular ordering of the initial signaling events of CD95. *Mol Cell Biol* 22: 207-220.
- 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.
- Bläsig J, Herz A, Reinhold K, Zieglgänsberger S (1973) Development of physical dependence on morphine in respect to time and dosage and quantification of the precipitated withdrawal syndrome in rats. *Psychopharmacology (Berlin)* 33: 19-28.
- Bramham CR, Worley PF, Moore MJ, Guzowski JF (2008) The immediate early gene *arc/arg3.1*: regulation, mechanisms, and function. *J Neurosci* 28: 11760-11767.
- Brami-Cherrier K, Roze E, Girault J-A, Betuing S, Caboche J (2009) Role of the ERK/MSK1 signaling pathway in chromatin remodelling and brain responses to drugs of abuse. *J Neurochem* 108: 1323-1335.
- Busquets X, Ventayol P, García-Sevilla JA (1997) Naloxone-precipitated withdrawal in morphine-dependent rats increases the expression of α_{2a} -adrenoceptor mRNA in brain. *Mol Brain Res* 45: 154-158.
- Chinnaiyan AM, O'Rourke K, Tewari M, Dixit VM (1995) FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. *Cell* 81: 505-512.

- Christie MJ (2008) Cellular neuroadaptations to chronic opioids: tolerance, withdrawal and addiction. *Br J Pharmacol* 154: 384-396.
- Daglish MR, Weinstein A, Malizia AL, Wilson S, Melichar JK, Lingford-Hughes A, Myles JS, Grasby P, Nutt DJ (2003) Functional connectivity analysis of the neural circuits of opiate craving: "more" rather than "different"? *Neuroimage* 20: 1964-1970.
- Edwards S, Graham DL, Whisler KN, Self DW (2009) Phosphorylation of GluR1, ERK, and CREB during spontaneous withdrawal from chronic heroin self-administration. *Synapse* 63: 224-235.
- Ferrer-Alcón M, García-Fuster MJ, La Harpe R, García-Sevilla JA (2004) Long-term regulation of signalling components of adenylyl cyclase and mitogen-activated protein kinase in the pre-frontal cortex of human opiate addicts. *J Neurochem* 90: 220-230.
- Gabilondo AM, García-Sevilla JA (1995) Spontaneous withdrawal from long-term treatment with morphine accelerates the turnover of α_2 -adrenoceptors in the rat brain: Up-regulation of receptors associated with increased receptor appearance. *J Neurochem* 64: 2590-2597.
- García-Sevilla JA, García-Fuster MJ (2009) Acute and chronic antidepressants downregulate FADD in rat brain: involvement of monoamine receptors. *Eur Neuropsychopharmacol* 19 (Suppl. 3): S431.
- García-Fuster MJ, Miralles A, García-Sevilla JA (2007) Effects of opiate drugs on Fas-associated protein with death domain (FADD) and effector caspases in the rat brain: regulation by the ERK1/2 MAP kinase pathway. *Neuropsychopharmacology* 32: 399-411.
- García-Fuster MJ, Ramos-Miguel A, Miralles A, García-Sevilla JA (2008a) Opioid receptor agonists enhance the phosphorylation state of Fas-associated death domain (p-Ser191/194 FADD) protein in the rat brain: functional interactions with casein kinase I α , G α_i proteins, and ERK1/2 signaling. *Neuropharmacology* 55: 886-899.
- García-Fuster MJ, Ramos-Miguel A, Rivero G, La Harpe R, Meana JJ, García-Sevilla JA (2008b) Regulation of the extrinsic and intrinsic apoptotic pathways in the prefrontal cortex of short- and long-term human opiate abusers. *Neuroscience* 157: 105-119.

- García-Fuster MJ, Clinton SM, Watson SJ, Akil H (2009) Effect of cocaine on Fas-associated protein with death domain in the rat brain: Individual differences in a model of differential vulnerability to drug abuse. *Neuropsychopharmacology* 34: 1123-1134.
- Gellert VF, Holtzman SG (1978) Development and maintenance of morphine tolerance and dependence in the rat by scheduled access to morphine drinking solutions. *J Pharmacol Exp Ther* 205: 536-546.
- Hua ZC, Sohn SJ, Kang C, Cado D, Winoto A (2003) A function of Fas-associated death domain protein in cell cycle progression localized to a single amino acid at its C-terminal region. *Immunity* 18: 513-521.
- Hyman SE, Malenka RC, Nestler EJ (2006) Neural mechanisms of addiction: The role of reward-related learning and memory. *Annu Rev Neurosci* 29: 565-598.
- Kalivas PW, O'Brien C (2008) Drug addiction as a pathology of staged neuroplasticity. *Neuropsychopharmacology* 33: 166-180.
- Le Moal M, Koob GF (2007) Drug-addiction: Pathways to the disease and pathophysiological perspectives. *Eur Neuropsychopharmacol* 17: 377-393.
- Maldonado R (1997) Participation of noradrenergic pathways in the expression of opiate withdrawal: Biochemical and pharmacological evidence. *Neurosci Biobehav Rev* 21: 91-104.
- McClung CA, Ulery PG, Perrotti LI, Zachariou V, Berton O, Nestler EJ (2004) DeltaFosB: a molecular switch for long-term adaptation in the brain. *Mol Brain Res* 132: 146-154.
- Meller E, Goldstein M, Friedhorff AJ, Schweitzer JW (1988) N-Ethoxycarbonyl-2-ethoxy-1,2-dihydroquinoline (EEDQ): a new tool to probe CNS receptor function. *Adv Exp Med Biol* 235: 121-136.
- Miralles A, Ribas C, Olmos G, García-Sevilla JA (1993) Differential effects of the alkylating agent N-ethoxycarbonyl-2-ethoxy-1,2-dihydroquinoline on brain α_2 -adrenoceptors and I₂-imidazoline sites in vitro and in vivo. *J Neurochem* 61: 1602-1610.

- Moulédous L, Díaz MF, Gutstein HB (2007) Extracellular signal-regulated kinase (ERK) inhibition does not prevent the development or expression of tolerance to and dependence on morphine in the mouse. *Pharmacol Biochem Behav* 88: 39-46.
- Ozaita A, Escribá PV, Ventayol P, Murga C, Mayor Jr F, García-Sevilla JA (1998) Regulation of G protein-coupled receptor kinase 2 in brains of opiate-treated rats and human opiate addicts. *J Neurochem* 70: 1249-1257.
- Ozaita A, Escribá PV, García-Sevilla JA (1999) The alkylating agent EEDQ facilitates protease-mediated degradation of the human brain α_{2A} -adrenoceptor as revealed by a sequence-specific antibody. *Neurosci Lett* 262: 105-108.
- Ramos-Miguel A, García-Fuster MJ, Callado LF, La Harpe R, Meana JJ, García-Sevilla JA (2009) Phosphorylation of FADD (Fas-associated death domain protein) at serine 194 is increased in the prefrontal cortex of opiate abusers: relation to mitogen activated protein kinase, phosphoprotein enriched in astrocytes of 15 kDa, and Akt signaling pathways involved in neuroplasticity. *Neuroscience* 161: 23-38.
- Ramos-Miguel A, Esteban S, García-Sevilla JA (2010) The time course of unconditioned morphine-induced psychomotor sensitization mirrors the phosphorylation of FADD and MEK/ERK in rat striatum: role of PEA-15 as a FADD-ERK binding partner in striatal plasticity. *Eur Neuropsychopharmacol* 20: 49-64.
- Renganathan H, Vaidyanathan H, Knapinska A, Ramos JW (2005) Phosphorylation of PEA-15 switches its binding specificity from ERK/MAPK to FADD. *Biochem J* 390: 729-735.
- Russo SJ, Wilkinson MB, Mazei-Robison MS, Dietz DM, Maze I, Krishnan V, Renthal W, Graham A, Birnbaum SG, Green TA, Robison B, Lesselyong A, Perrotti LI, Bolaños CA, Kumar A, Clark MS, Neumaier JF, Neve RL, Bhakar AL, Barker PA, Nestler EJ (2009) Nuclear factor kappa B signaling regulates neuronal morphology and cocaine reward. *J Neurosci* 29: 3529-3537.
- Salvesen GS, Riedl SJ (2009) Structure of the Fas/FADD complex. *Cell Cycle* 17: 2723-2727.

- Scaffidi C, Volkland J, Blomberg I, Hoffmann I, Krammer PH, Peter ME (2000) Phosphorylation of FADD/MORT I at serine 194 and association with a 70-kDa cell cycle-regulated protein kinase. *J Immunol* 164: 1236-1242.
- Selcher JC, Atkins CM, Trzaskos JM, Paylor R, Sweatt JD (1999) A necessity for MAP kinase activation in mammalian spatial learning. *Learn Mem* 6: 478-490.
- Ulibarri I, García-Sevilla JA, Ugedo, L (1987) Modulation of brain α_2 -adrenoceptor and μ -opioid receptor densities during morphine dependence and spontaneous withdrawal in rats. *Naunyn-Schmiedegerg's Arch Pharmacol* 336: 530-537.
- Valmiki MG, Ramos JW (2009) Death effector domain-containing proteins. *Cell Mol Life Sci* 66: 814-830.
- Williams TM, Daghlish MRC, Lingford-Hughes A, Taylor LG, Hammers A, Brooks DJ, Grasby P, Myles JS, Nutt DJ (2007) Brain opioid receptor binding in early abstinence from opioid dependence. *Br J Psychiatry* 191: 63-69.
- Zhai H, Li Y, Wang X, Lu L (2008) Drug-induced alterations in the extracellular signal-regulated kinase (ERK) signalling pathway: implications for reinforcement and reinstatement. *Cell Mol Neurobiol* 28: 157-172.
- Zhang J, Zhang D, Hua Z (2004) FADD and its phosphorylation. *IUBMB Life* 56: 395-401.

Figure legends

Figure 1 Schematic diagram illustrating the experimental designs of the study.

Figure 2 (A) Severity of spontaneous abstinence syndrome in morphine-dependent rats (10-100 mg/kg for 6 days). Time course (● SW): 2 h, n = 46; 12 h, n = 39; 24 h, n = 28; 48 h, n = 16; 72 h, n = 8; 96 h, n = 4. Chronically saline-treated rats (O, n = 13). Circles (behavioral score) are means \pm SEM of n rats per group. Kruskal-Wallis ANOVA (SW: 2-96 h): [KW (5,139) = 47.7; $p < 0.0001$]. *** $p < 0.001$ when compared with chronically morphine-treated rats (2 h post-treatment) or chronic saline (KW/Dunn's test). (B) Effect of SW from chronic morphine on the contents of oligomeric (●) and monomeric (■) p-FADD forms in the cerebral cortex of the same rats. Time course (SW): 2 h, n = 7; 12 h, n = 11; 24 h, n = 12; 48 h, n = 8; 72 h, n = 4; 96 h, n = 4. Chronically saline-treated rats (O and □, n = 13). Symbols are means \pm SEM of n experiments per group with an animal per experiment, and expressed as percentage of the control (saline) group. ANOVA: oligomeric p-FADD [F(6,52) = 4.67, $p = 0.0007$], monomeric p-FADD [F(6, 52) = 7.81, $p < 0.0001$]. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ when compared with the control group (ANOVA/Bonferroni's test). Bottom: representative immunoblots of oligomeric and monomeric p-FADD, and β -actin, in cortical samples of control (Sal) and SW (2-96 h) rats. (C) Scatterplot depicting a significant correlation between the intensity of morphine abstinence syndrome and the content of oligomeric p-FADD in the cerebral cortex of the same rats during SW (12-96 hours). Each circle (●) represents a different animal. The solid line ($y = 99.4 + 2.15x$) is the best fit of the correlation (Spearman's $\rho = 0.59$, $n = 39$, $p < 0.0001$).

Figure 3 Ratio of oligomeric to monomeric p-FADD forms in the cerebral cortex after spontaneous withdrawal (SW) in morphine-dependent rats (10-100 mg/kg for 6 days). Time course (● SW): 2 h, n = 7; 12 h, n = 11; 24 h, n = 12; 48 h, n = 8; 72 h, n = 4; 96 h, n = 4. Chronically saline-treated rats (O, n = 13). Circles are means \pm SEM of n experiments per group with an animal per experiment, and expressed as percentage of the control (saline) group. ANOVA: [F(6, 52) = 3.79, $p = 0.0033$]. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ when compared with the control group (ANOVA/Bonferroni's test). Bottom: representative immunoblot of oligomeric and monomeric p-FADD forms (anti-p-Ser194 FADD antibody; same film with different exposure times) in cortical samples of control (Sal) and SW (2-96 h) rats.

Figure 4 (A) Intensity of spontaneous withdrawal syndrome in morphine-dependent rats (10-100 mg/kg for 6 days) after the selective inactivation of brain α_2 -adrenoceptors with EEDQ (1.6 mg/kg, i.p.). Groups of morphine-withdrawn rats were treated (SW 12 h) with vehicle (n = 8) or EEDQ (n = 8) and abstinence severity was assessed 12 h later (SW 24 h). A group of chronically saline-treated rats (also treated with vehicle at SW 12 h) served as control (n = 8). Left: global behavioral score. Right: change in body weight. Columns are means \pm SEM of n rats per group. Left: Kruskal-Wallis ANOVA: [KW(2,21) = 18.0; p = 0.0001]. * p < 0.05, *** p < 0.001 when compared with the control group; † p < 0.05 when compared with vehicle+SW 24 h (KW/Dunn's test). Right: ANOVA: [F(2,21) = 91.0; p < 0.0001]. *** p < 0.001 when compared with the control group (ANOVA/Bonferroni's test). (B) Contents of oligomeric and monomeric p-FADD forms in the cerebral cortex of the same rats treated as above. Columns are means \pm SEM of n = 8 experiments per group with an animal per experiment, and expressed as percentage of the control group. ANOVA: oligomeric p-FADD [F(2,21) = 23.9, p < 0.0001]; monomeric p-FADD [F(2,21) = 5.68, p = 0.011]. * p < 0.05; ** p < 0.01, *** p < 0.001 when compared with the control group; † p < 0.05 when compared with vehicle+SW 24 h (ANOVA/Bonferroni's test). Right: representative immunoblots of oligomeric and monomeric p-FADD, and β -actin, in cortical samples of control (C), SW 24 h, and EEDQ+SW 24 h rats.

Figure 5 Phosphorylation of (A) ERK1/2, (B) JNK1/2, and (C) p38 MAP kinases (ratio of p-kinase to total kinase) in the cerebral cortex after spontaneous withdrawal (SW) in morphine-dependent rats (10-100 mg/kg for 6 days). Time course (● SW): 2 h, n = 7; 12 h, n = 8; 24 h, n = 8; 48 h, n = 8; 72 h, n = 4; 96 h, n = 4. Chronically saline-treated rats (O, n = 8). Circles are means \pm SEM of n experiments per group with an animal per experiment, and expressed as percentage of the control (saline) group. ANOVA detected a significant difference between the groups of treatments only for p-ERK1/2: [F(6, 40) = 6.00, p = 0.0001]. *** p < 0.001 when compared with the control group; ††† p < 0.001 when compared with SW 2 h (ANOVA/Bonferroni's test). Bottom (A,B,C): representative immunoblots of phosphorylated and total MAP kinases in cortical samples of control (Sal) and SW (2-96 h) rats.

Figure 6 Phosphorylation of (A) Akt1, and (B) PEA-15 (ratio of p-protein to total protein) in the cerebral cortex after spontaneous withdrawal (SW) in morphine-dependent rats (10-100

mg/kg for 6 days). Time course (● SW): 2 h, n = 7; 12 h, n = 8; 24 h, n = 8; 48 h, n = 8; 72 h, n = 4; 96 h, n = 4. Chronically saline-treated rats (○, n = 8). Circles are means \pm SEM of n experiments per group with an animal per experiment, and expressed as percentage of the control (saline) group. ANOVA: Akt1 [F(6, 40) = 2.50, p = 0.046]; PEA-15 [F(6, 40) = 2.47, p = 0.040]. * p < 0.05 when compared with the control group and/or SW 2 h (ANOVA/Bonferroni's test). Bottom (A,B): representative immunoblots of phosphorylated and total Akt1 and PEA-15 in cortical samples of control (Sal) and SW (2-96 h) rats.

Figure 7 (A) Inhibition of ERK1/2 activation with SL 327 (a brain penetrating MEK1/2 inhibitor) in morphine-dependent rats (10-100 mg/kg for 6 days). Groups of morphine-withdrawn rats were treated twice (SW 4 h and SW 8 h) with vehicle (n = 7) or SL 327 (20 mg/kg, i.p., n = 10) and the activation of ERK1/2 was assessed at SW 12 h (n = 8) and SW 24 h (n = 9). A group of chronically saline-treated rats (and vehicle at SW 4 h and SW 8 h) served as control (n = 10). Columns (ratio of p-kinase to total kinase) are means \pm SEM of n rats per group. ANOVA: SW 12 h [F(2,10) = 5.64; p = 0.023], SW 24 h [F(2,11) = 0.97; p = 0.41]. * p < 0.05 when compared with the control group (ANOVA/Bonferroni's test); # p < 0.005 when compared with the corresponding SW 12 h group (Student's t -test). Bottom: representative immunoblots of p-ERK1/2 and total ERK1/2 in cortical samples of control (Veh), SW 12 h and SW 24 h rats treated with vehicle (-) or SL 327 (+). (B) Contents of oligomeric and monomeric p-FADD forms in the cerebral cortex of the same morphine-withdrawn rats (SW 12 h and SW 24 h) after treatment with SL 327 as above. Columns are means \pm SEM of n = 5-14 experiments per group with an animal per experiment, and expressed as percentage of the control group. ANOVA: oligomeric p-FADD at SW 12 h [F(2,12) = 2.90, p = 0.094]; monomeric p-FADD at SW 12 h [F(2,1) = 14.20, p = 0.0007]; oligomeric p-FADD at SW 24 h [F(2,33) = 8.87, p = 0.0008]; monomeric p-FADD at SW 24 h [F(2,33) = 10.10, p = 0.0004]. * p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.0001 when compared with the control group (ANOVA/Bonferroni's test). Bottom: representative immunoblots of p-FADD forms, and β -actin, in cortical samples (duplicates) of control (vehicle), SW 24 h and SL 327+SW 24 h rats. (C,D) Intensity of spontaneous withdrawal syndrome (behavioral score and body weight) in the same morphine-withdrawn rats (SW 12 h and SW 24 h) after treatment with vehicle or SL 327 as above. Columns are means \pm SEM of n rats per group. C: Kruskal-Wallis ANOVA (behavioral score): SW 12 h [KW(2,38) = 8.60; p = 0.013]; SW 24 h [KW(2,30) = 15.0; p = 0.0007]. * p < 0.05, *** p < 0.001 when compared with the

corresponding control group; † $p < 0.05$ when compared with vehicle+SW 24 h (KW/Dunn's test). D: ANOVA (body weight): SW 12 h [$F(2,38) = 18.0$; $p < 0.0001$]; SW 24 h [$F(2,30) = 140.0$; $p < 0.0001$]. *** $p < 0.001$ when compared with the corresponding control group (ANOVA/Bonferroni's test).

Figure 8 Representative immunoblots of neuroplastic proteins (FLIP_L, NF- κ B, Arc, c-Fos and FosB) in the cerebral cortex after spontaneous withdrawal (SW 2-96 h) in morphine-dependent rats (10-100 mg/kg for 6 days). Sal: chronically saline-treated rats. PC: positive control for the corresponding protein.

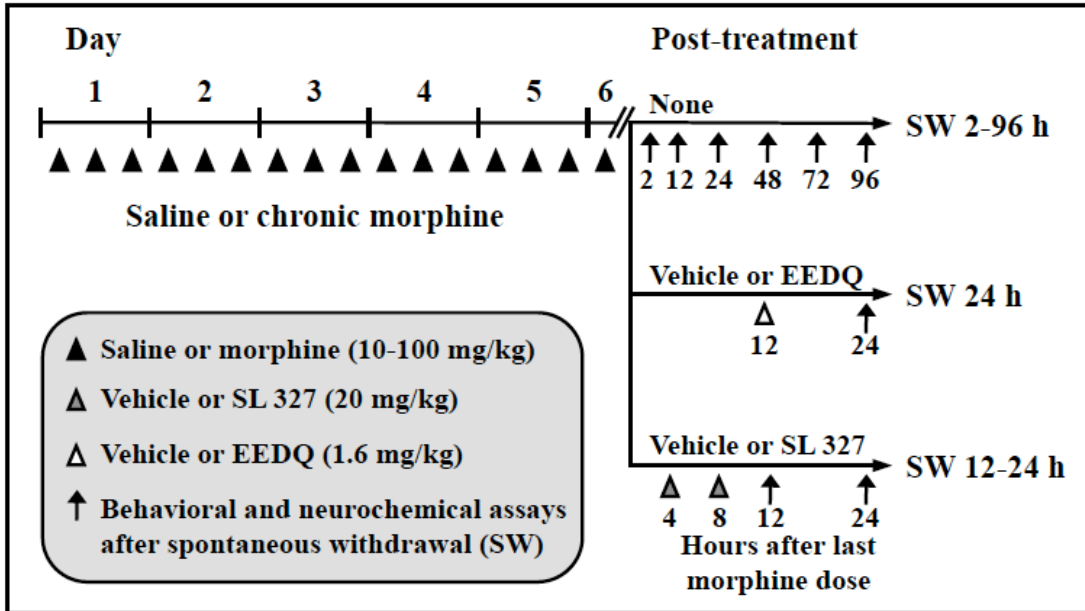


Fig. 1
Ramos-Miguel et al.

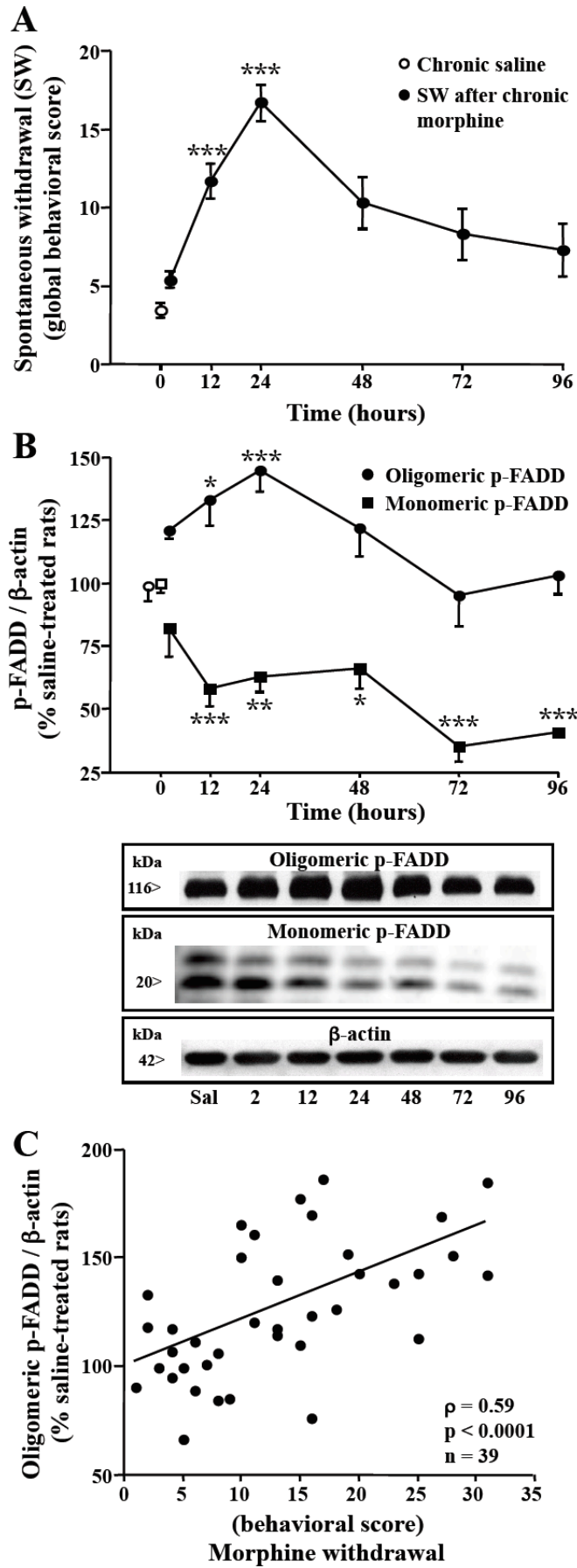


Fig. 2
Ramos-Miguel et al.

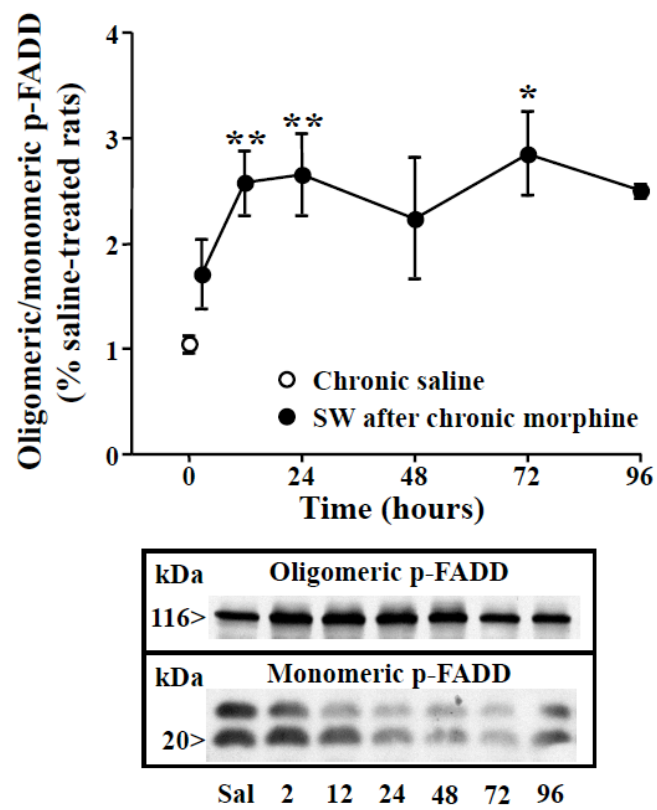


Fig. 3
Ramos-Miguel et al.

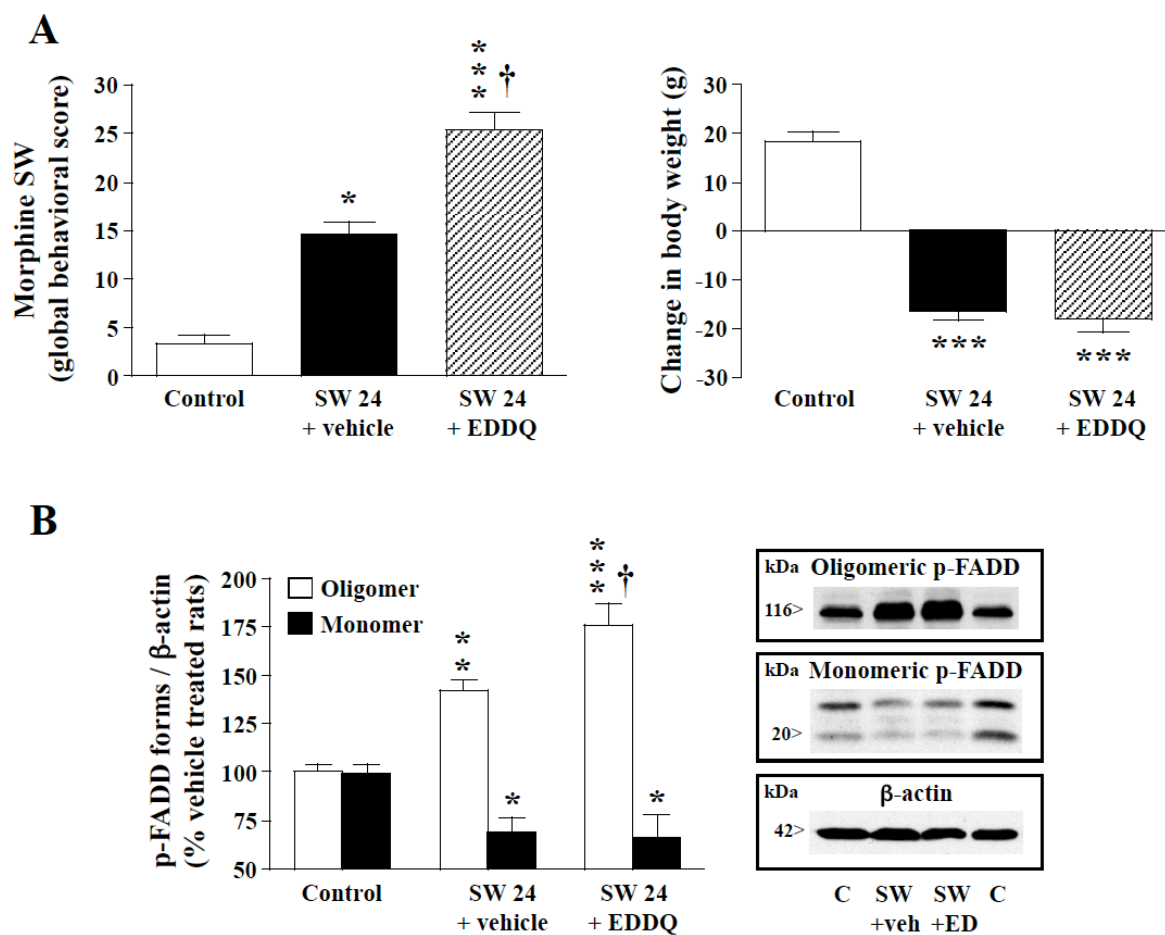


Fig. 4
Ramos-Miguel et al.

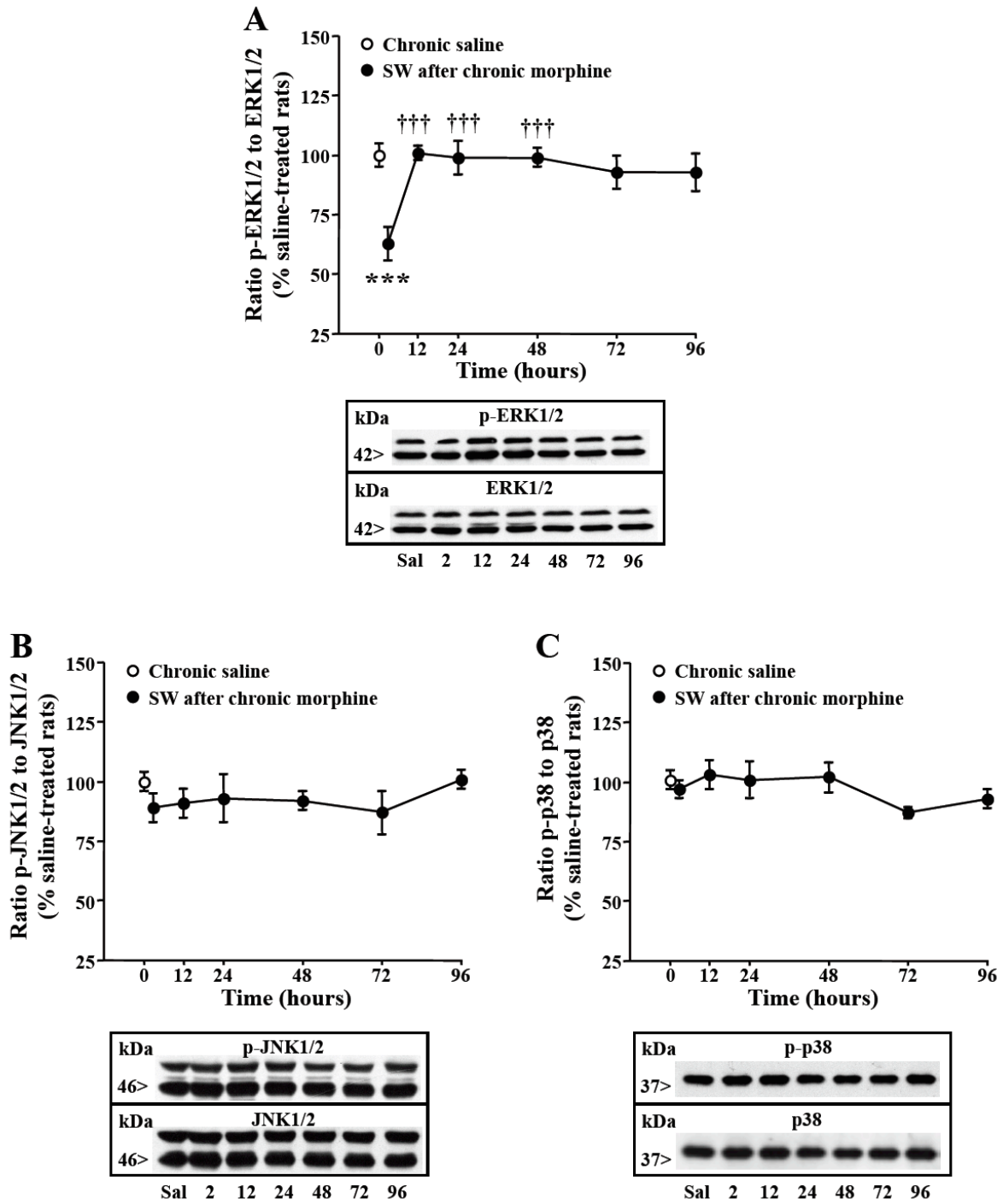


Fig. 5
Ramos-Miguel et al.

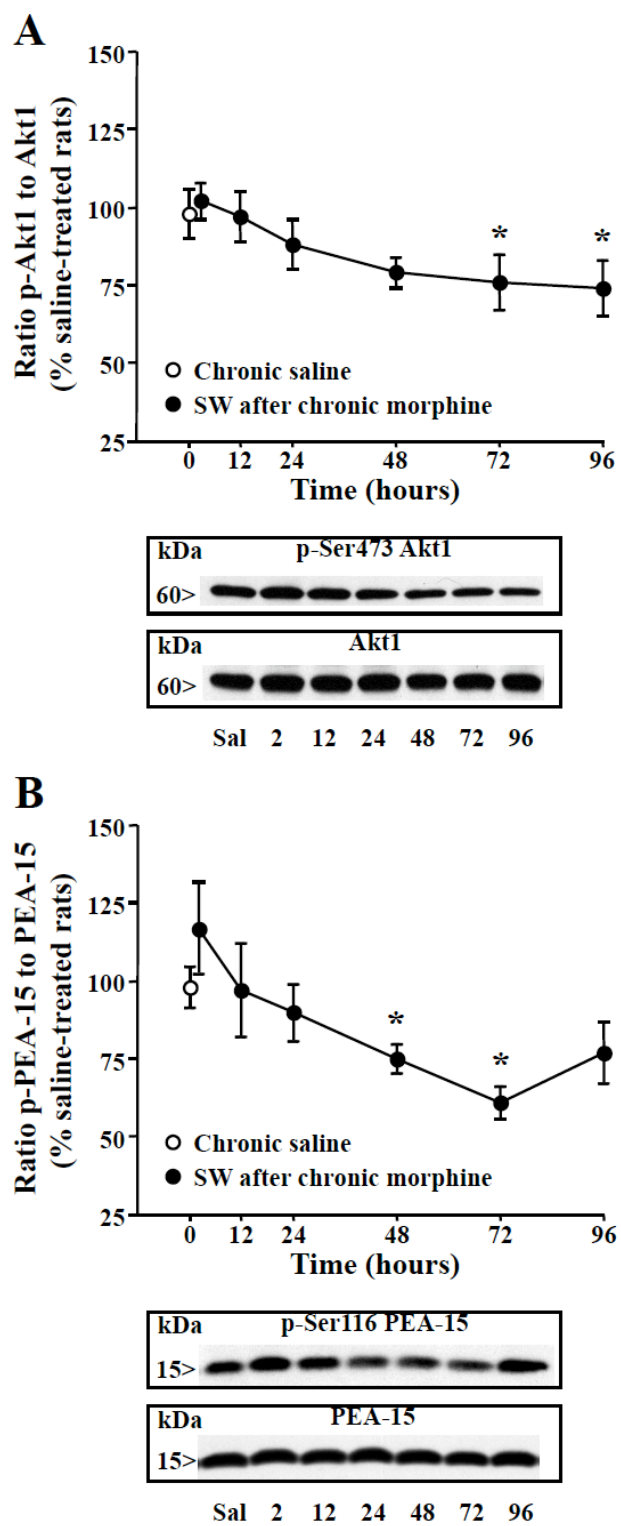


Fig. 6
Ramos-Miguel et al.

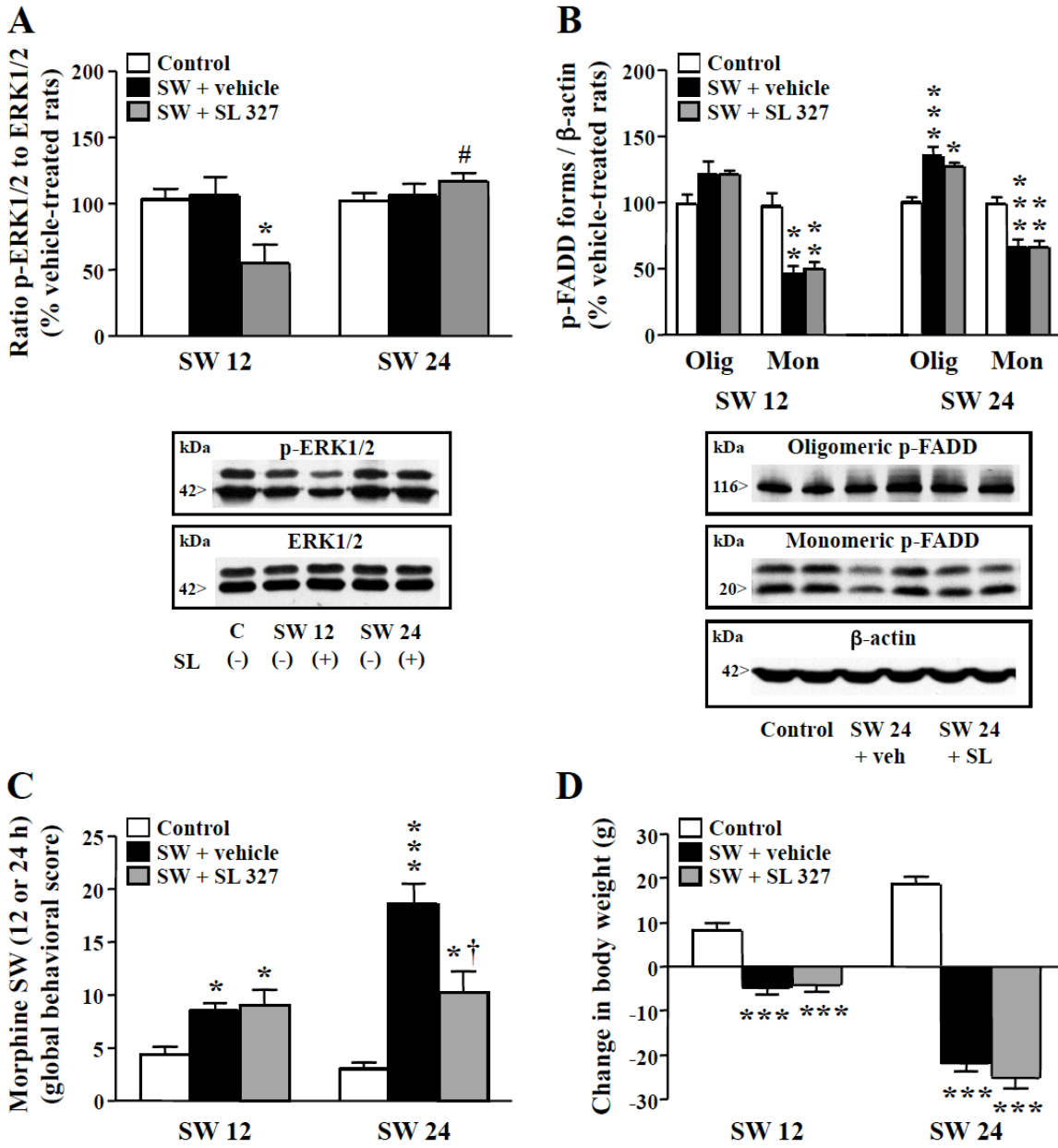


Fig. 7
Ramos-Miguel et al.

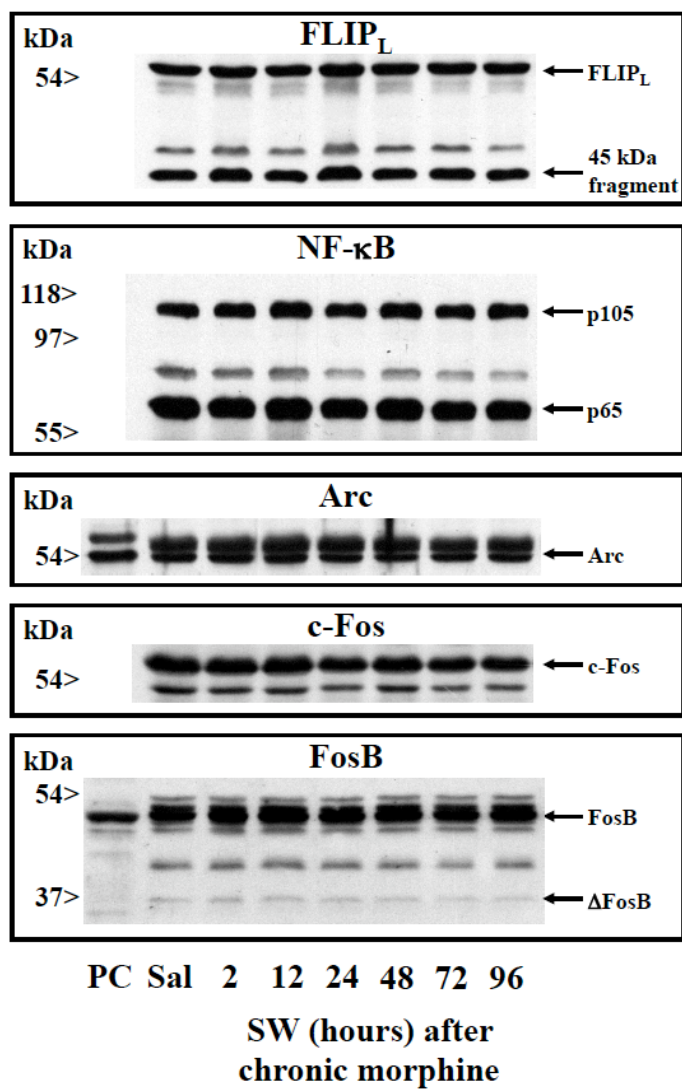


Fig. 8
Ramos-Miguel et al.

Supplementary Table S1

Antibodies used for the immunodetection and quantification of target proteins and signaling molecules associated with phenomena of neuroplasticity in opiate addiction

Protein	Antigen	Host	Catalog	Batch	Company
p-FADD	Mouse p-FADD (peptide containing p-Ser191)	Rabbit	2785	1	Cell Signaling, USA
p-FADD	Human p-FADD (peptide containing p-Ser194)	Rabbit	sc-12439	C072	Santa Cruz, USA
FADD	Human FADD (28-208 residues)	Rabbit	sc-5559	J-2004	Santa Cruz, USA
Fas	Mouse Fas receptor (C-terminal residues)	Rabbit	sc-716	F1306	Santa Cruz, USA
CK1 α	Human casein kinase 1 α (C-terminal residues)	Goat	sc-6477	K2305	Santa Cruz, USA
p-ERK1/2	Human p44 MAPK (peptide containing p-Thr202/Tyr204)	Rabbit	9101	20	Cell Signaling, USA
ERK1/2	Rat and human p42 MAPK (synthetic peptide)	Rabbit	442704	D33075	Calbiochem, FRG
p-JNK	Human JNK (peptide containing p-Thr183/Tyr185)	Rabbit	9251	10	Cell Signaling, USA
JNK	Human JNK2 (GST fusion protein)	Rabbit	9252	6	Cell Signaling, USA
p-p38 MAPK	Human p38 (peptide containing p-Thr180/Tyr182)	Rabbit	9211	16	Cell Signaling, USA
p38 MAPK	Human p38 (synthetic peptide)	Rabbit	9212	9	Cell Signaling, USA
p-PEA-15	Human PEA-15 (peptide containing p-Ser116)	Rabbit	44-836G	0103	BioSource Inc., USA
PEA-15	Human PEA-15 (peptide containing Leu60)	Rabbit	2780	1	Cell Signaling, USA
p-Akt1	Mouse Akt1 (peptide containing p-Ser473)	Rabbit	9721	10	Cell Signaling, USA
Akt1	Human Akt1, α -isoform (88-100 residues)	Rabbit	530311	D35774	Calbiochem, FRG
Arc	Human Arc (1-300 residues)	Rabbit	sc-15325	B2309	Santa Cruz, USA
FLIP	Human FLIP (2-18 residues)	Rabbit	F 9800	048K1495	Sigma Chemical, USA
NF- κ B	Human NF- κ B (peptide containing Ser276)	Rabbit	3034	7	Cell Signaling, USA
FosB	Human FosB (1-237 residues)	Rabbit	sc-28213	K0805	Santa Cruz, USA
c-Fos	Human c-Fos (peptide mapping internal region)	Rabbit	sc-253	D012	Santa Cruz, USA
β -actin	Human β -actin (2-16 residues)	Mouse	A1978 AC-15	016K4817	Sigma Chemical, USA

See the section of Materials and methods for specific details of some antibodies.

DISCUSIÓN

REGULACIÓN DE LOS OPIÁCEOS SOBRE LOS MECANISMOS APOPTÓTICOS EN CEREBRO DE RATA Y HUMANO

Los resultados de este trabajo demuestran que las proteínas pro-apoptóticas más relevantes de las vías extrínseca (el receptor Fas, FADD, y la caspasa-8) e intrínseca (Bax, citocromo c, y AIF), así como los mecanismos apoptóticos efectores (principalmente la caspasa-3) en los cuales finalmente convergen ambas vías, no se hallan sobre-expresados en la corteza prefrontal de consumidores de opiáceos de corto o largo plazo. Por el contrario, en estos adictos a heroína o metadona, la reducción de FADD (posible atenuación de la señalización de Fas), los incrementos de FLIP_L y Bcl-2 (poderosos inhibidores de la activación de las proteínas apoptóticas), con el consecuente desplazamiento del cociente Bcl-2/Bax (un indicador de supervivencia/muerte celular), la reducción del citocromo c, la ausencia de una activación anormal de la caspasa-3 y, finalmente, la presencia de un patrón de fragmentación de PARP-1 muy similar en comparación con los sujetos control, claramente indican que estas vías de muerte celular, tras un posible estado de activación inicial de corta duración, han alcanzado un nuevo estado de adaptación que podría reflejar la inducción de efectos anti-apoptóticos (neuroprotectores) u otras acciones no apoptóticas (neuroplasticidad).

Así pues, parece improbable que la cuantificación de otras proteínas relacionadas con la señalización de muerte celular, tales como el ligando de Fas (FasL) u otras caspasas (como por ejemplo las caspasas 6, 7 ó 9), revelen la presencia de una tasa apoptótica más elevada en la corteza prefrontal de adictos a opiáceos que contradiga las conclusiones derivadas de este trabajo.

Regulación de la vía extrínseca

Los contenidos del receptor Fas, así como la expresión de las formas agregadas del receptor (formas activas en la transducción de la señal apoptótica extrínseca), se hallaron inalteradas, indicando que cualquier incremento en los niveles de FasL se vería contrarrestado por la ausencia de FADD (reducido en estas muestras cerebrales), el cual es imprescindible para acoplar la señal de muerte al interior de la célula. Por otra parte, la caspasa-9, que es la unidad proteolítica del complejo molecular denominado apoptosoma formado tras la activación de la vía intrínseca, es la encargada de fragmentar y activar la caspasa-3 (revisado en Kumar, 2007). Sin embargo, no se halló ninguna evidencia de la activación de la caspasa-3, en la cual confluyen ambas cascadas apoptóticas, en las muestras cerebrales de los grupos de

consumidores de opiáceos estudiados. Por otro lado, la caspasa-7, muy similar estructural y funcionalmente a la caspasa-3, presenta idénticos substratos nucleares que su homóloga, incluida la PARP-1. Esta polimerasa de reparación del ADN es fragmentada por la actividad proteolítica de ambas caspasas, y su patrón de fragmentación es habitualmente empleado como trazador de procesos apoptóticos tanto en cultivos celulares como en tejidos *in vivo* (Putt et al., 2005; Garnett et al., 2006; Galluzzi et al., 2009). No obstante, el patrón de fragmentación de PARP-1 en la corteza prefrontal de los adictos a opiáceos fue muy similar al observado en las muestras de los sujetos control, sugiriendo que ninguna de las caspasas efectoras (3 y 7) presentaba una actividad anormalmente acelerada en dichas muestras cerebrales. En cuanto a la caspasa-6, también una caspasa efectora, no parece jugar un papel importante en la apoptosis de mamíferos (Kumar, 2007).

Estudios anteriores han descrito incrementos del receptor Fas (incluyendo las formas agregadas), así como de otras proteínas asociadas, en el cerebro y la espina dorsal de animales de laboratorio tras diferentes tratamientos con fármacos opiáceos (Boronat et al., 2001; Mao et al., 2002; García-Fuster et al., 2003, 2004; Pérez-San Emeterio et al., 2006; Tramullas et al., 2007). Por el contrario, la administración aguda de agonistas μ -, δ - y κ -opioides redujo (en un mecanismo dependiente de la integridad de la señalización de ERK) la inmunodensidad de FADD en la corteza cerebral de ratas, un efecto que remitió tras el tratamiento crónico con estas sustancias (García-Fuster et al., 2007a). Además, la abstinencia (espontánea y/o precipitada por antagonista) a estos fármacos opioides indujo una nueva reducción en los contenidos corticales de FADD (García-Fuster et al., 2007a; y resultados presentes). Ninguno de estos tratamientos promovió la activación de la iniciadora caspasa-8, o la caspasa-3 ejecutora (García-Fuster et al., 2007a), lo cual es congruente con la presente observación de un patrón normal de fragmentación de PARP-1. En conjunto, estos resultados sugieren que, a pesar de una posible activación del receptor Fas, la reducida disponibilidad de FADD, impediría la activación de mecanismos efectoras de muerte celular en la corteza cerebral tras la exposición aguda y crónica, o en la abstinencia a opiáceos.

Por otra parte, la activación del receptor Fas no siempre resulta en la inducción de apoptosis debido a la presencia de poderosos inhibidores endógenos que desarticulan los mecanismos apoptóticos de la vía extrínseca, tales como FLIP (Tschopp et al., 1998; Peter y Krammer, 2003; Kataoka, 2005). Estructuralmente, FLIP pertenece a la familia de proteínas que contienen DED, y es prácticamente idéntico a la caspasa-8, aunque carece del dominio

catalítico. Cuando es sobre-expresado, FLIP puede unirse tanto a la caspasa-8 como a FADD, impidiendo el reclutamiento de la caspasa iniciadora al DISC y bloqueando el comienzo de la vía apoptótica extrínseca (Tschopp et al., 1998; Krueger et al., 2001). Esta proteína sufre un procesamiento post-transcripcional que permite la expresión de principalmente dos isoformas de la molécula: una larga (FLIP_L, presente en casi todos los tejidos) y otra corta (FLIP_S, principalmente en tejido linfático) (Kataoka, 2005). En el tejido cerebral del ratón adulto se ha observado la expresión selectiva de FLIP_L en neuronas corticales (Taoufik et al., 2007), y en la corteza prefrontal humana sólo se inmunodetectó la presencia de FLIP_L. Aunque muy sutilmente, pero de forma significativa, los adictos crónicos presentaron un incremento en la expresión cortical de este inhibidor de la apoptosis, sin ser observada modulación alguna sobre la caspasa-8, lo que podría indicar (junto con la mencionada reducción de FADD) la inducción de mecanismos anti-apoptóticos adicionales. De hecho, se ha descrito que la sobre-expresión de FLIP_L es capaz de reducir significativamente el volumen de la lesión inducida por una isquemia cerebral provocada en la corteza de ratones transgénicos (Taoufik et al., 2007), demostrando que este inhibidor endógeno de la caspasa-8 puede mediar neuroprotección en mamíferos.

Regulación de la vía intrínseca

En respuesta a las señales de muerte, muchas proteínas pro- y anti-apoptóticas de la vía intrínseca (mitocondrial) son también activadas (Burke, 2008). Algunas de los mecanismos más relevantes en la apoptosis intrínseca incluyen la liberación citosólica del citocromo c, con la consecuente activación de caspasas efectoras (en mamíferos, principalmente la caspasa-3; Kumar, 2007), así como la liberación de AIF, el principal mediador mitocondrial de la apoptosis independiente de actividad caspasa (Reed, 1997; Walensky, 2006; Krantic et al., 2007; Burke, 2008). Resumidamente, mientras que la efectora caspasa-3, al introducirse en el núcleo de la célula, proteoliza diversos substratos, entre los que destaca la PARP-1, un trazador de fenómenos apoptóticos (véase más arriba), la actividad nuclear de AIF participa en la fragmentación del ADN (Krantic et al., 2007). Diversos estudios en cerebro de rata han mostrado incrementos en los contenidos de algunas proteínas pro-apoptóticas de la vía mitocondrial (Bad, Bax) y caspasa-3 tras tratamientos prolongados con opiáceos (Mao et al., 2002; Tramullas et al., 2007, 2008). En otros estudios *in vivo*, sin embargo, la administración de fármacos opioides de forma aguda y crónica, así como en la abstinencia (espontánea o inducida por antagonista), no fue asociada a alteraciones en la activación, es decir, procesamiento proteolítico a su forma activa, de las caspasas-8 (iniciadora) ó -3 (efectora)

(García-Fuster et al., 2007). También se ha demostrado, no obstante, que el tratamiento crónico con morfina induce una reducción moderada de la proteína anti-apoptótica Bcl-2 en muestras corticales de cerebro de rata (Boronat et al., 2001), así como en la médula espinal (Mao et al., 2002). En este estudio en cerebro humano post mórtem, los contenidos de las proteínas pro-apoptóticas Bax y AIF no se hallaron incrementados en las muestras corticales de consumidores de opiáceos de corto o largo plazo. Sin embargo, el contenido de citocromo c se encontró reducido, mientras que el de Bax se halló incrementado en las mismas muestras cerebrales. Consecuentemente, el cociente Bcl-2/Bax en la corteza prefrontal de estos sujetos mostró una tendencia clara hacia la supervivencia celular (Korsmeyer et al., 1993). Además, las muestras cerebrales de los consumidores de opiáceos no presentaron incrementos en los contenidos de la caspasa-3 (forma activa o precursora) o la PARP-1.

En conjunto, estos resultados sugieren que la maquinaria responsable de la vía apoptótica intrínseca o mitocondrial, así como los sistemas ejecutores que finalmente promueven la destrucción cromosómica y celular, no se encuentran activados por el consumo de estas sustancias de abuso en la corteza prefrontal de adictos a heroína o metadona. Por el contrario, las adaptaciones al consumo crónico de opiáceos de algunos de los componentes de la vía mitocondrial (Bcl-2 y citocromo c) podrían indicar la inducción de mecanismos neuroprotectores mediante un freno molecular de la apoptosis intrínseca.

Estudios post mórtem versus modelos animales

Las discrepancias entre los estudios en cerebro de rata y humano podrían ser debidas a la gran heterogeneidad entre los seres humanos, el tiempo de exposición a opiáceos, el elevado grado de tolerancia que presentan los adictos a estas sustancias, incluyendo la ausencia de recompensa tras el consumo de una nueva dosis (excluyendo únicamente el alivio de la ansiedad y los síntomas del síndrome de abstinencia), y/o la manera en que la droga es consumida por los humanos (auto-administración), que difiere radicalmente del régimen de bajas y espaciadas dosis a las que los animales de laboratorio son sometidos, en ausencia de los estímulos contextuales asociados al abuso de opiáceos en humanos. Además, se han documentado diferencias notables en las relaciones farmacocinéticas-farmacodinámicas de la morfina y sus derivados entre ambas especies, que podrían ser debidas a las diferencias en el metabolismo de los opiáceos, así como a la permeabilidad de estos compuestos a través de la barrera hematoencefálica entre otros factores (Whiteside et al., 2008). A pesar de esta variabilidad entre especies, es remarcable que la reducción de FADD, el acoplador de la

señalización de los receptores de muerte, ha sido observada tanto en la corteza prefrontal de consumidores de heroína o metadona de corto y largo plazo, como en la corteza cerebral de rata tras tratamientos agudos y crónicos con opiáceos (García-Fuster et al., 2007a). Así pues, la regulación de FADD por fármacos opiáceos parece un hallazgo de relevancia en la neurobiología de la adicción a opiáceos.

De acuerdo con estos estudios, la marcada reducción del contenido de FADD observada en la corteza prefrontal de humanos adictos a heroína o metadona (incluyendo a aquéllos que también presentan un historial de consumo de cocaína), podría funcionar un mecanismo de contra-regulación para las posibles señales apoptóticas enviadas a través de Fas u otros receptores de muerte.

Por último, es destacable que las proteínas pertenecientes a las cascadas apoptóticas podrían jugar un papel importante mediando procesos de plasticidad sináptica en el SNC (Gilman y Mattson, 2002; Mattson y Gleichmann, 2005; Jonas, 2006). Este debate se amplía en el siguiente apartado.

LA FOSFORILACIÓN DE FADD EN LOS MECANISMOS NEUROADAPTATIVOS INDUCIDOS POR LOS OPIÁCEOS

Inmunodetección de p-Ser191/194 FADD en tejido cerebral: relevancia de su localización nuclear

En la corteza cerebral y cuerpo estriado de rata y ratón, así como en la corteza prefrontal de cerebro humano post mórtem, las formas monomérica (23 kDa), y oligoméricas (92/116 kDa) de p-FADD, fueron nítidamente inmunodetectadas independientemente del origen del anticuerpo empleado [anticuerpos fosfo-específicos dirigidos contra la secuencia de FADD de origen murino (Ab I) o humano (Ab II-IV)], o del lugar de fosforilación de FADD fuera de los dominios apoptóticos (Ser191 en ratón, o Ser194 en humano). Actualmente todavía no ha sido descrita la posición homóloga donde es fosforilado el FADD en rata, aunque, como se ha discutido anteriormente, la alineación de las secuencias predice que sería la Ser194 (Zhang et al., 2004; véase la figura 3-8 en Materiales y métodos).

El proceso de auto-ensamblaje de FADD es relevante desde el punto de vista funcional en la señalización apoptótica del receptor Fas (Sandu et al., 2006; Scott et al., 2009), y la oligomerización de p-FADD podría jugar un papel en las acciones no-apoptóticas mediadas

por esta proteína. De hecho, las formas de p-FADD observadas a 92/116 kDa encajarían con el modelo de estequiometría tetramérica recientemente propuesto para el conformación del DISC (Scott et al., 2009). Estas formas oligoméricas de FADD fueron inmunodetectadas no sólo en las muestras cerebrales de rata, ratón y humano, sino también en una muestra comercial purificada de FADD recombinante, lo que sugiere que el auto-ensamblaje de esta proteína es un proceso energéticamente favorable que puede tener lugar *in vitro*, incluso en condiciones desnaturalizantes. Así pues, se establece un equilibrio entre las formas monomérica y agregadas de FADD, que podría estar controlado en las células, y en el que la fosforilación juega un papel esencial, pues las formas dimerica/trimérica son principalmente no fosforiladas, y la monomérica y oligoméricas (92/116 kDa) son detectadas con mayor eficiencia por anticuerpos contra formas fosforiladas. Además, el hecho de que, mediante agentes químicos (DTT, Cu^{2+}), este equilibrio puede ser desplazado en uno u otro sentido, fortalece esta idea.

A nivel subcelular, las formas monomérica y oligoméricas de p-Ser191/194 FADD fueron localizadas principalmente en núcleo y citosol respectivamente. Mientras que en la sustancia gris se encontró la presencia de ambas formas de p-FADD, la sustancia blanca mostró una expresión casi exclusiva de la forma monomérica de p-FADD. Estas observaciones sugieren que la oligomerización de p-FADD (auto-asociación de monómeros) es un proceso que ocurre preferentemente en neuronas de la sustancia gris. Además, estos resultados concuerdan con la relación inversa entre las formas oligomérica y monomérica de p-FADD en la corteza prefrontal de humanos discutida más adelante.

Varios estudios han demostrado que la fosforilación de FADD es esencial para su acumulación en el núcleo y su exportación al citosol, así como para la participación de esta proteína multifuncional en procesos no-apoptóticos (Screaton et al., 2003; Alappat et al., 2005). Así pues, la localización nuclear de p-Ser191/194 FADD en tejido cerebral, y especialmente en neuronas del SNC (véase también Takagi et al., 2007), podría ser de especial relevancia en la adicción a opiáceos.

Los opiáceos regulan inversamente las formas fosforilada y no fosforilada de FADD

En un estudio anterior se ha demostrado que los agonistas μ -, δ - y κ -opioides reducen los contenidos de FADD (forma dimerica principalmente no fosforilada) en la corteza cerebral de ratas. Estas reducciones de FADD fueron acompañadas por incrementos de la forma oligomérica de p-FADD, tras los tratamientos con agonistas μ - (fentanilo, sufentanilo y

morfina) y δ - (SNC-80). En este trabajo, cuando se cuantificaron en las mismas muestras cerebrales, se halló que los agonistas opioides modularon de manera inversa estas formas de FADD, describiendo una correlación inversa entre ellas ($r = -0.685$; $n = 86$, $p < 0.0001$; figura 5-1). De forma similar, se ha observado recientemente que el agonista cannabinoide WIN55,212-2 altera los contenidos de estas formas de FADD en la misma dirección, y con una similar magnitud que los opioides (Álvaro-Bartolomé et al., 2010).

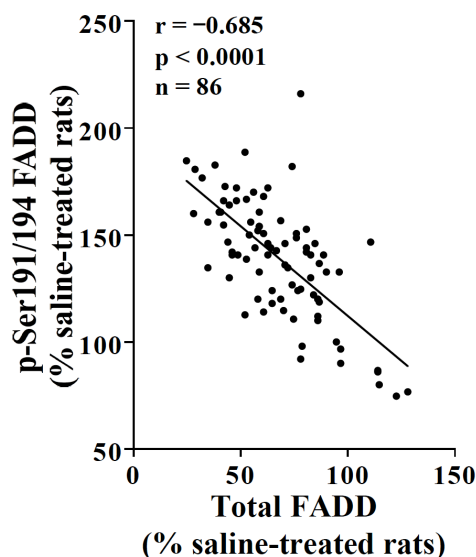


Figura 5-1. Correlación entre las inmunodensidades de la forma dimerica de FADD (51 kDa; Ab H-181) y la forma oligomérica de p-Ser191/194 FADD (116 kDa; Ab I) en la corteza cerebral de ratas sometidas a distintos tratamientos con agonistas específicos para los receptores opioides μ y δ , respecto a las ratas control. Sólo se incluyeron aquellas ratas pertenecientes a grupos de tratamientos que promovieron alteraciones significativas en los contenidos de p-FADD y FADD. La recta ($y = 197 - 0.842x$) representa el mejor ajuste posible de la correlación entre ambas variables.

Como se ha discutido anteriormente, la fosforilación en la Ser191/194 media las actividades no apoptóticas de FADD (Zhang et al., 2004; Alappat et al., 2005). De este modo, FADD se encontraría en un equilibrio homeostático entre sus formas no fosforilada y fosforilada en la Ser191/194. Se ha sugerido que este equilibrio es un determinante de la supervivencia celular, de tal manera que cuando el equilibrio se desplaza hacia la forma no fosforilada la célula entra en apoptosis, mientras que si se desplaza hacia la forma fosforilada se promueve la proliferación o diferenciación celular (Zhang et al., 2004; Park et al., 2005; Alappat et al., 2005; Valmiki y Ramos, 2009). El significado biológico de este equilibrio en neuronas no parece tan bien definido, pues la neurona cortical madura no es capaz de dividirse.

La CK1 α es el principal enzima que media la fosforilación de FADD en la Ser191/194 y, a su vez, esta interacción regula la localización subcelular y las actividades no apoptóticas de FADD (Alappat et al., 2005). Por ello, la expresión de esta kinasa fue investigada en las muestras cerebrales de ratas tras los diversos tratamientos con opiáceos. En homogenado total, los distintos tratamientos no alteraron la inmunodensidad de la CK1 α en las mismas muestras cerebrales en las que la fosforilación de FADD se halló incrementada. No obstante,

a nivel subcelular, el sufentanilo indujo una translocación del enzima del citosol a la membrana y el núcleo, coincidiendo con las modulaciones de p-FADD en estas mismas fracciones celulares. Estas observaciones son congruentes con la reducción de la actividad enzimática específica de la kinasa en las preparaciones citosólicas corticales de ratas sometidas al mismo tratamiento con sufentanilo. Asimismo, se halló paralelismo entre las modulaciones de CK1 α y p-FADD inducidas tras el tratamiento agudo con morfina en los distintos compartimentos subcelulares. Por el contrario, el SNC-80, el cual promovió el incremento de p-FADD en citosol, membranas y núcleo, no alteró la localización subcelular del enzima. Por tanto, aunque la CK1 α podría mediar la fosforilación aguda de p-FADD tras los tratamientos con agonistas μ -opioides, la alteración de p-FADD observada tras los tratamientos con los agonistas δ debería ser explicada mediante la actividad de otra kinasa todavía no descrita (Scaffidi et al., 2000; Rochat-Steiner, 2000).

La fosforilación de FADD es estimulada durante los fenómenos de neuroplasticidad inducidos por opiáceos

La adicción a opiáceos está asociada con el incremento de p-FADD en cerebro humano

El contenido de p-Ser194 FADD (principalmente la forma monomérica) se halló incrementado en la corteza prefrontal (homogenado total) de los consumidores de opiáceos de corto y largo plazo. A nivel subcelular, este incremento de la forma monomérica en el núcleo fue más evidente, y se vio acompañada de una reducción de la forma oligomérica en el mismo compartimento subcelular. Además, en los adictos crónicos a opiáceos, la forma oligomérica de p-Ser194 FADD estaba incrementada en la fracción citosólica, un resultado consistente con la observada translocación de su kinasa (CK1 α) del núcleo al citosol. Estos resultados sugieren que, en el tejido cerebral de adictos crónicos a opiáceos, la disminución de la forma dimérica de FADD es consecuencia de su fosforilación mediada por CK1 α en el citosol y su consiguiente oligomerización. La fosforilación de FADD es, posiblemente, una señal de translocación nuclear (Screaton et al., 2003). En este sentido, en la corteza prefrontal de adictos a opiáceos, la forma oligomérica de p-Ser194 FADD viajaría al núcleo donde es inmediatamente disociado, explicando, por un lado, el incremento tan marcado del monómero y, en contrapartida, la reducción del oligómero de p-Ser194 FADD observados en el núcleo de las muestras cerebrales de estos sujetos. Así pues, en el cerebro humano, la adicción a opiáceos parece alterar el equilibrio existente entre las diversas formas de FADD (fosforiladas y no fosforiladas; monoméricas, diméricas y oligoméricas), así como su localización en el

interior de la célula, en tal dirección que podría atenuar la posible inducción de efectos apoptóticos mediados por estas sustancias, y favoreciendo las acciones no-apoptóticas (neuroplásticas) de esta proteína multifuncional (figura 5-2).

La fosforilación de FADD está incrementada durante la expresión de la sensibilización locomotora inducida por morfina

La exposición repetida a la morfina induce incrementos progresivos en la estimulación de la actividad locomotora de animales de laboratorio (Babbini y Davis, 1972), un fenómeno que persiste (e incluso aumenta) después de largos periodos en abstinencia, tras una nueva administración del opiáceo (Babbini et al., 1975). Bajo estas alteraciones conductuales subyacen cambios adaptativos en regiones clave del cerebro a distintos niveles, e incluyen cambios en la expresión génica y/o proteica. Sin embargo, los mecanismos moleculares que controlan estas alteraciones plásticas no son completamente conocidos.

Con el objetivo de evaluar el papel de FADD y su fosforilación en este modelo de plasticidad neuronal, en este trabajo se escogió un tratamiento (10 mg/kg/día, durante 5 días) en base a estudios anteriores (McDaid et al., 2006), en el que se exploraron las posibles alteraciones neuroquímicas a corto (3 días; SW 3) y medio (14 días; SW 14) plazo tras la interrupción de los tratamientos. Es necesario subrayar que durante el desarrollo de estos ensayos la componente contextual de este fenómeno conductual fue evitada mediante el alojamiento de las ratas en las propias cajas donde la actividad locomotora fue registrada. Como se ha comentado anteriormente, la sensibilización locomotora inducida por morfina es favorecida por la presencia de estímulos externos que rodean al consumo/administración de la droga (revisado en Badiani y Robinson, 2004).

Bajo estas condiciones experimentales, la expresión de la sensibilización locomotora inducida por el tratamiento repetido de morfina fue observada únicamente a corto plazo (SW 3), habiendo cesado tras 14 días (SW 14) en ausencia del opiáceo. En consonancia con esta observación, el recambio de dopamina en el estriado de las ratas se encontró acelerado durante la expresión de la sensibilización locomotora, tras una nueva administración del opiáceo, después de 3 días en ausencia de morfina, y no cuando habían pasado 14 días. Otros estudios han descrito resultados similares a los de este trabajo (Vanderschuren y Kalivas, 2000).

De forma paralela a la conducta psicomotora y al recambio de dopamina, las ratas sometidas a abstinencia durante 3 días (SW 3), tras el tratamiento repetido con morfina, presentaron un incremento en los contenidos estriatales y corticales de la forma oligomérica de p-FADD, mientras que la forma dimérica de FADD se halló reducida. Asimismo, estas modulaciones de FADD y p-FADD remitieron en SW 14 en ambas regiones cerebrales. Es destacable que estas alteraciones fueron observadas en ausencia de la dosis final de morfina (véase Materiales y métodos) y, por tanto, preceden a la expresión de la conducta. Por tanto, como consecuencia del desarrollo de la sensibilización a la morfina, el balance homeostático entre FADD y p-FADD se desequilibró hacia la forma fosforilada de la proteína, lo que podría conducir, eventualmente, a la expresión de la conducta alterada. Es destacable que este desequilibrio no tuvo consecuencias sobre la tasa apoptótica en las células estriatales y, por tanto, la alteración en este sentido no juega un papel en la muerte celular programada. Además, los incrementos de p-FADD fueron observados principalmente en el núcleo de las células estriatales, donde posiblemente tenga funciones en la modulación de la expresión génica (véase Sreaton et al., 2003).

El contenido de p-FADD en la corteza cerebral de rata correlaciona con la severidad del síndrome de abstinencia a la morfina

Durante el síndrome de abstinencia a los opiáceos se desencadenan una serie de mecanismos adaptativos que tratan de compensar la ausencia de la droga, y que ponen de manifiesto la dependencia a la morfina. Estos mecanismos adaptativos tienen como consecuencia una respuesta conductual muy bien estereotipada (Bläsig et al., 1973; Gellert y Holtzman, 1978), sencillamente medible, y cuya intensidad es proporcional al grado de dependencia de los animales a la morfina.

Tras el tratamiento crónico con morfina (10-100 mg/kg, 6 días) las ratas respondieron con la conducta esperada a lo largo del tiempo que se mantuvieron en abstinencia espontánea, con un curso temporal acampanado, siendo la intensidad del síndrome máxima a las 24 horas después de la última dosis. Paralelamente a la respuesta conductual del síndrome de abstinencia, el curso temporal de la inmunodensidad de la forma oligomérica de p-FADD en la corteza cerebral de ratas dependientes de morfina, mostró también una función acampanada, siendo máxima 24 horas después de la retirada de la morfina. Estos fenómenos (conductual y neuroquímico) fueron confrontados, poniendo de manifiesto una correlación directa entre ellos. Por el contrario, las densidades de la forma monomérica de p-FADD y

FADD decayeron en las mismas muestras cerebrales de forma constante durante el tiempo que se mantuvo a las ratas en abstinencia. Una vez más, el equilibrio entre las formas de p-FADD y FADD se desplazó hacia la forma fosforilada en otro fenómeno de plasticidad conductual inducido por la exposición a opiáceos.

Papel de p-FADD en la plasticidad neuronal

Está bien documentado que, en animales de laboratorio, la exposición crónica a morfina, o la inducción de abstinencia a opiáceos resulta en cambios estructurales en neuronas dopaminérgicas (Sklair-Tavron et al., 1996; Spiga et al., 2003), como también alteraciones en la ramificación neuronal y la densidad de espinas dendríticas en regiones cerebrales de relevancia en los sistemas de recompensa y motivación, incluyendo la corteza orbitofrontal (Robinson y Kolb, 1999; Liao et al., 2005; Ballesteros-Yáñez et al., 2007). Puesto que las alteraciones de las espinas dendríticas son los mayores determinantes de la plasticidad neuronal (Hering y Sheng, 2001), el conocimiento sobre la regulación de estas estructuras anatómicas de las neuronas (Liao et al., 2007) por parte de las drogas de abuso, y en particular los opiáceos, es esencial para comprender con mayor precisión los fenómenos de neuroplasticidad inducidos por este tipo de sustancias. En este contexto, se ha observado que la estimulación del receptor Fas promueve el crecimiento de las neuritas en neuronas del tallo dorsal del ganglio en cultivo (Desbarats et al., 2003) así como la ramificación de axones y dendritas durante el desarrollo embrionario del cerebro (Zuliani et al., 2006), entre otras acciones neuroplásticas (Reich et al., 2008). Por tanto, estos hallazgos, en conjunto con la mostrada alteración de p-FADD/FADD en la corteza prefrontal de los adictos y en el cerebro de ratas expuestas a diversos tratamientos con opiáceos, sugieren que sistema de señalización Fas/FADD podría mediar, al menos en parte, las modulaciones anteriormente mencionadas sobre las espinas dendríticas inducidas por el consumo repetido y/o crónico de opiáceos. El aumento de la densidad nuclear de p-FADD en neuronas podría contribuir a un cambio en la expresión génica y/o en la translocación de proteínas relevantes en la plasticidad neuronal. Además, los astrocitos de la sustancia gris y blanca, en los cuales la presencia de p-Ser194 FADD también ha quedado patentada, podrían contribuir a la inducción de la plasticidad homeostática (Fellin, 2009).

INTERACCIÓN DE FADD CON OTRAS VÍAS DE SEÑALIZACIÓN EN LA ACCIÓN DE LOS OPIÁCEOS

Dependencia o independencia de la señalización a través de proteína G

Los receptores opioides pertenecen a la familia de receptores de 7 dominios transmembrana, más conocidos como receptores acoplados a proteínas G (GPCR). Estos receptores ejercen sus actividades bien a través de las proteínas G, que en el caso de los receptores opioides son de la familia G inhibitorias (Gi/o), o bien de forma independiente, normalmente a través de otra familia de proteínas de andamiaje conocida como arrestinas (β -arrestina1/2).

En este trabajo, la inhibición de las proteínas Gi/o mediante la administración i.c.v. de la toxina de pertusis, la cual ADP-ribosila de forma selectiva este grupo de proteínas G, no bloqueó la reducción de FADD ni el incremento de p-FADD inducidos por la administración aguda del agonista δ -opioide SNC-80. Por el contrario, la propia toxina promovió el desequilibrio de p-FADD/FADD hacia la forma fosforilada, de igual manera que lo hizo el SNC-80. Este resultado indica que, o bien el FADD es una nueva diana de la toxina, o bien existe un GPCR que tónicamente regula el equilibrio homeostático entre estas dos formas de la proteína. Por último, el SNC-80 y la toxina de pertusis actuaron de forma sinérgica sobre el sistema de p-FADD/FADD, lo que sugiere que el agonista opioide ejerce su acción sobre estas proteínas de manera independiente de la proteína Gi/o.

Vías de las MAPK en los mecanismos de acción de los opiáceos: Interacción de ERK y FADD a través de Akt/PEA-15

La activación de ERK es necesaria para la reducción de FADD mediada por el receptor δ

Las vías de las MAPKs también median algunas de las actividades de los receptores opioides. Existe un consenso entre la mayoría de autores en que, de forma aguda, los agonistas μ , δ y κ activan la vía de MEK/ERK, aunque se sigue debatiendo si esta acción es dependiente o independiente de proteína G. Por ejemplo, en neuronas estriatales ha sido demostrada la dependencia de GRK3 y β -arrestina-2 (Macey et al., 2006), mientras que otros autores han observado también una dependencia de proteína G (Zheng et al., 2008), en la activación de esta MAPK por los agonistas opioides.

En cualquier caso, en este estudio, la activación de ERK en la corteza cerebral y estriado de rata fue necesaria para mediar la reducción de FADD tras la administración aguda de SNC-

80. Sin embargo, la inhibición de ERK no atenuó el incremento de p-FADD inducido por el mismo tratamiento agudo. Por tanto, las propiedades neuroprotectoras de los agonistas δ podrían ser mediadas a través de la reducción de FADD, en un proceso dependiente de la integridad de la vía de ERK, pero la estimulación de p-FADD en la inducción aguda de actividades no apoptóticas por los mismos fármacos es independiente de esta kinasa.

La inhibición de ERK atenúa la expresión de la sensibilización a la morfina y bloquea la estimulación de p-FADD y Akt/PEA-15

Ha sido demostrado que la activación de ERK en regiones cerebrales específicas juega un papel fundamental en la expresión de la alteración de la conducta psicomotora inducida por distintas drogas de abuso (Valjent et al., 2006b; Borgkvist et al., 2008), así como en la recompensa a la morfina (Mazzucchelli et al., 2002; Valjent et al., 2006a; Li et al., 2008) u otras formas de neuroplasticidad en la exposición a las sustancias adictivas (revisado en Girault et al., 2007; Zhai et al., 2008; Brami-Cherrier et al., 2009). En este trabajo, de forma paralela al p-FADD, la fosforilación de MEK/ERK se encontró estimulada en el estriado y la corteza de ratas tras 3 días (SW 3) en ausencia de morfina, coincidiendo con la alteración de la conducta psicomotora y el recambio de dopamina.

Aunque otras MAPKs (JNK y p38) no parecieron intervenir en este fenómeno, la vía de Akt1/PEA-15 sí resultó modulada en rigurosa coincidencia con ERK y el resto de alteraciones conductuales y neuroquímicas. Al igual que FADD, PEA-15 es una proteína que contiene dominios efectores de muerte (DED), y que tampoco presenta ningún tipo de actividad enzimática (revisado en Valmiki y Ramos, 2009). Si bien FADD es fosforilado por CK1 α determinando su función celular, PEA-15 es fosforilado por Akt1 en la serina 116 (Trencia et al., 2003), promoviendo un cambio en su especificidad de unión. Mientras PEA-15 se une a ERK1/2 impidiendo que ésta entre en el núcleo, p-Ser116 PEA-15 se une a FADD para inhibir la formación del DISC y frenar la apoptosis (Formstecher et al., 2001; Renganathan et al., 2005). Esta última se halló sobre-expresada en las mismas muestras cerebrales que p-FADD y p-ERK1/2, sugiriendo que el equilibrio entre ambas formas de la proteína se encontraba desplazado hacia la forma fosforilada durante la expresión de la sensibilización locomotora a la morfina. La observación de que p-ERK se encontrara incrementado principalmente en el núcleo, y que se hallara una sobre-expresión de c-fos, es consistente con este desplazamiento del equilibrio entre las formas de PEA-15. También es congruente el incremento observado en las mismas muestras cerebrales de la forma activa (p-Ser473) de

Akt1, la kinasa que media la fosforilación de PEA-15. Otros estudios también han puesto de manifiesto la relevancia de ERK y Akt en la plasticidad neuronal asociada a las conductas inducidas tras la exposición de los animales de laboratorio a drogas de abuso, incluyendo las propiedades reforzantes de la morfina en el paradigma de la preferencia de lugar por condicionamiento (CPP; Mazzucchelli et al., 2002; Valjent et al., 2006a; Girault et al., 2007; Russo et al., 2007). En el siguiente apartado se discute más ampliamente las posibles relaciones entre FADD, ERK y Akt/PEA-15

Estos resultados, a pesar de que no eran demostrativos, sugerían la importancia de la señalización de FADD, ERK y Akt/PEA-15 en la expresión de la conducta alterada. Para poner de manifiesto el papel de estas vías en el desarrollo de la sensibilización a la morfina, se inhibió MEK/ERK de forma farmacológica. Esta inhibición atenuó significativamente la alteración de la respuesta locomotora a la dosis final del opiáceo, demostrando la necesidad de ERK en el fenómeno de la plasticidad neuronal durante el desarrollo de la sensibilización a la morfina, tal y como ya se ha demostrado para otras drogas de abuso (p. ej. cocaína y anfetaminas; Valjent et al., 2006b). La inhibición de ERK y la consiguiente atenuación de la alteración conductual, fue acompañada del bloqueo en la sobre-expresión de p-FADD, p-Akt1 y p-PEA-15, señalando que estas alteraciones son dependientes de la integridad de ERK, y que además, siempre acompañan a la expresión de la sensibilización locomotora a la morfina.

El bloqueo de la activación de ERK reduce la severidad del síndrome conductual durante la abstinencia a la morfina

La exposición crónica a morfina (10-100 mg/kg, 6 días) indujo una reducción en los contenidos de la forma activa de ERK, pero no los de otras MAPKs (JNK, p38) o aquéllos de Akt/PEA-15, en las muestras corticales de rata. Durante las primeras 12 horas en abstinencia espontánea, los niveles de activación de ERK volvieron al estado basal, manteniéndose estables durante al menos las siguientes 96 horas. Esta recuperación de los contenidos de p-ERK podría ser una adaptación a la ausencia de opiáceos durante la abstinencia, así como uno de los factores que impulsan la alteración conductual.

El papel de ERK1/2 en la adicción a opiáceos ha sido estudiado tanto en modelos animales (revisado en Girault et al., 2007; Zhai et al., 2008; Brami-Cherrier et al., 2009) como en cerebro humano post mórtem de adictos (Ferrer-Alcón et al., 2004; y resultados presentes). Por ejemplo, se ha observado que la activación de ERK1/2 es necesaria para las propiedades

reforzantes de la morfina (Valjent et al., 2006a; Mazzuchelli et al., 2005). Sin embargo, la regulación de su actividad tras la exposición crónica a opiáceos es un tema más controvertido, y parece ser dependiente de los protocolos de tratamiento empleados y de la región cerebral estudiada (véase Zhai et al., 2008). Así, se ha documentado que, de forma crónica, los opiáceos pueden reducir el estado de fosforilación de ERK1/2 en la corteza prefrontal de adictos que murieron de sobredosis, así como en la corteza cerebral (Ferrer-Alcón et al., 2004; y resultados presentes), el núcleo accumbens y el caudado putamen (Muller y Unterwald, 2004) de animales de laboratorio, o bien, por el contrario, estimular su actividad en el caudado putamen (Ortiz et al., 1995), área ventral del tectum (Berhow et al., 1996) y la espina dorsal (Cao et al., 2005). Además, en ratas dependientes de morfina, tanto la abstinencia precipitada por antagonista como la espontánea indujeron marcados incrementos en su estado de activación en varias regiones cerebrales (Cao et al., 2005; Edwards et al., 2009; resultados presentes).

En cualquier caso, la actividad de ERK1/2 parece mediar algunos de los efectos a corto y largo plazo de los opiáceos, con especial relevancia en los fenómenos de plasticidad conductual inducidos por estas drogas de abuso, y en particular, podría ser un factor esencial la conducta asociada al síndrome de abstinencia. Por ello, en este trabajo, se estudió el efecto de la inhibición de esta kinasa sobre el síndrome conductual inducido por la retirada espontánea de opiáceos en ratas dependientes de morfina. Los resultados demostraron que la conducta asociada a al síndrome de abstinencia, aunque de forma parcial, depende de la activación de ERK1/2, revelando el papel fundamental de esta proteína en esta forma de plasticidad neuronal. Curiosamente, a pesar de que la kinasa permaneció parcialmente inhibida durante tan solo las primeras 12 horas de abstinencia (a las 24 horas ya había recuperado su estado basal de activación), la intensidad del síndrome fue atenuada durante SW 24. Esta observación sugiere que la recuperación de la actividad de ERK pone en marcha una maquinaria (probablemente a nivel de expresión génica) cuyos efectos sobre la conducta se retrasan (aproximadamente) doce horas. A diferencia del efecto sobre la locomoción, donde la atenuación de la conducta conllevó un bloqueo de la sobre-expresión del p-FADD, en este experimento la inhibición de ERK1/2 desacopló el paralelismo entre la intensidad del síndrome de abstinencia (atenuado) y la sobre-expresión de p-FADD, la cual no fue bloqueada.

Contrariamente a los resultados de este estudio, trabajos anteriores han documentado una ausencia de efecto sobre la intensidad del síndrome de abstinencia tras la inhibición de la ERK en animales dependientes de morfina (Almela et al., 2007; Moulédous et al., 2007). No obstante, en estos trabajos, la abstinencia a la morfina fue inducida por antagonista, el cual desencadena un síndrome conductual de gran intensidad, y cuyos mecanismos moleculares subyacentes posiblemente no presenten un completo paralelismo. En este sentido, por ejemplo, se ha descrito que el adrenoceptor α_2 es sobre-expresado durante la abstinencia espontánea, pero no en la inducida por antagonista (Gabilondo y García-Sevilla, 1995). Además, el hecho de que durante la abstinencia inducida se manifiesten determinadas estereotipias que no se observan durante la espontánea, sugiere que ambos síndromes conductuales son consecuencia de fenómenos neuroquímicos próximos pero no idénticos (Gabilondo y García-Sevilla, 1995). Por tanto, la integridad de ERK parece ser necesaria para la expresión normal del síndrome de abstinencia espontáneo, pero no para el precipitado por antagonista.

La abstinencia espontánea de morfina tampoco alteró los contenidos de otras MAPKs, aunque los niveles de p-PEA-15 y p-Akt1 sufrieron reducciones progresivas durante este periodo en ausencia de opiáceos. Durante la expresión de la sensibilización a la morfina, el sistema p-Akt/p-PEA-15, que puede conectar la señalización entre FADD y ERK, se halló modulado de forma paralela a estas dos últimas, sugiriendo una posible actuación coordinada entre ellas. En cambio, en el modelo de dependencia y abstinencia a opiáceos no parece existir una alteración paralela que indique la existencia de una actuación conjunta entre FADD-ERK-PEA-15. No obstante, la reducción progresiva de p-Akt/p-PEA-15 podría tener un papel en los cambios adaptativos a largo plazo tras la exposición a la morfina.

La adicción a opiáceos está asociada a la reducción de ERK, JNK y Akt/PEA-15 en cerebro humano

Al contrario del incremento de p-Ser194 FADD, los resultados de este estudio demuestran que el abuso prolongado de opiáceos (pero no el consumo de corto plazo) está asociado a una reducción de la activación de las vías de señalización de ERK1/2, JNK1/2 y Akt1/PEA-15 en la corteza prefrontal. En cambio, la activación de p38 MAPK (una kinasa pro-apoptótica; Xia et al., 1995) no se observó significativamente alterada en las mismas muestras cerebrales. En un estudio previo, la vía de Raf/MEK/ERK se encontró marcadamente reducida en la corteza prefrontal de otra cohorte de adictos crónicos a opiáceos (Ferrer-Alcón et al., 2004). Aunque

ha sido demostrado que las cascadas de señalización de ERK y Akt1 desempeñan funciones esenciales en las alteraciones neuronales de largo plazo inducidas por opiáceos y asociadas a fenómenos de plasticidad sináptica (Girault et al., 2007; Russo et al., 2007), las funciones tanto de JNK (otra kinasa pro-apoptótica; Kuan et al., 1999; Weng et al., 2007) como de PEA-15 (factor apoptótico; Kitsberg et al., 1999; Ramos, 2008) en el proceso adictivo son ampliamente desconocidas. PEA-15, una fosfo-proteína enriquecida en astrocitos, podría jugar también un papel en alguna forma de plasticidad conductual, pues también se ha documentado la participación astrocitaria en las propiedades reforzantes de la morfina en ratones (Narita et al., 2006).

Los contenidos de p-Ser116 PEA-15 en las muestras cerebrales de adictos crónicos se hallaron reducidos, mientras que la forma total de la proteína permaneció inalterada. Puesto que la forma no fosforilada de PEA-15 también desempeña una función por sí misma (p. ej., el secuestro en el citosol de ERK; Formstecher et al., 2001), los resultados sugieren que el balance entre ambas formas de la proteína se encuentra desplazado (Renganathan et al., 2005) hacia la forma no fosforilada, lo que podría comprometer las acciones anti-apoptóticas de p-Ser116 PEA-15 de el cerebro de los adictos crónicos a opiáceos. Congruentemente, la activación de Akt1, la kinasa que fosforila a PEA-15 en la serina 116, se encontró también reducida en las muestras de adictos crónicos a opiáceos. Además, estudios anteriores han documentado que la proteína kinasa C (PKC), la cual promueve la fosforilación en la serina 104 de PEA-15 (Araujo et al., 1993), está reducida en el cerebro de adictos a opiáceos (Busquets et al., 1995; García-Sevilla et al., 1997), así como en la corteza cerebral de ratas dependientes de heroína, morfina o metadona (Ventayol et al., 1997). Los complejos entrecruzamientos entre las vías de señalización de FADD/p-FADD, PEA-15, ERK, como también las interacciones entre vías anti-apoptóticas (ERK; Xia et al., 1995) y pro-apoptóticas (JNK, Kuan et al., 1999; p38, Xia et al., 1995), podrían tener lugar en el cerebro resultando finalmente en la observada ausencia de muerte celular en la corteza prefrontal de adictos a opiáceos (figura 5-2).

Por otra parte, la reducción de la actividad de ERK1/2 y Akt1 en la corteza prefrontal podría jugar un papel fundamental en la inducción de tolerancia a la recompensa inducida por la ingesta de la droga. Es conocido que la tolerancia a los efectos eufóricos inducida por opiáceos aparece en etapas tempranas tras el consumo repetido de estas drogas de abuso (Jaffe, 1990). Este fenómeno de tolerancia conductual, que conduce al consumo compulsivo

de la droga, probablemente involucra adaptaciones neuronales en regiones corticales y subcorticales (Christie, 2008).

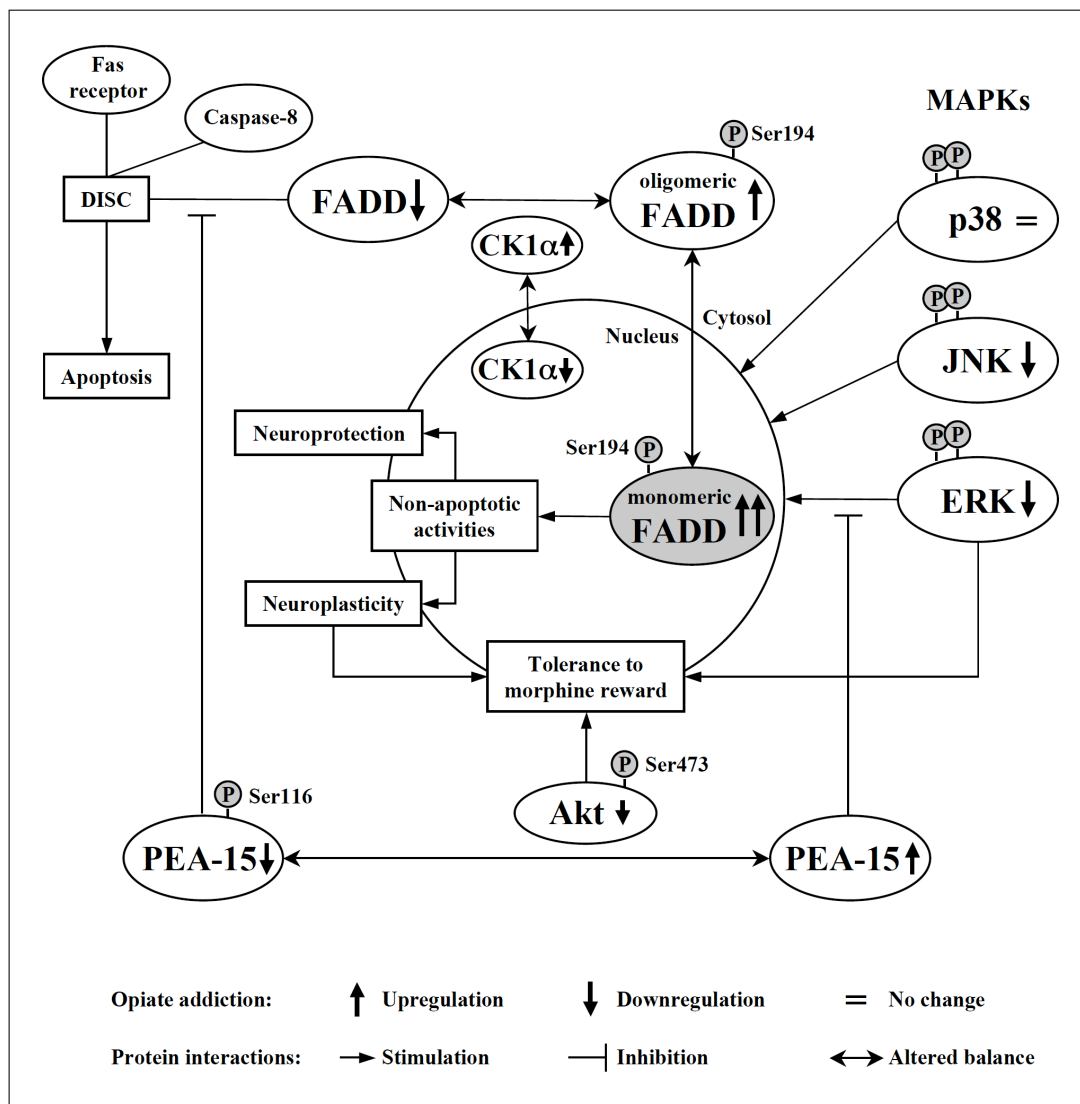


Figura 5-2. Nuevas vías de señalización en la adicción a opiáceos

Es destacable que tanto ERK como Akt1 pueden mediar la recompensa de morfina en animales de laboratorio. Así, ratones knockout (KO) para el gen que codifica ERK1 mostraron una respuesta mayor a los efectos reforzantes de la morfina en el test de condicionamiento por lugar de preferencia (CPP), fenómeno que fue asociado al incremento de la actividad de ERK2 (Mazzucchelli et al., 2002). Así mismo, el bloqueo farmacológico de la activación de ERK1/2 atenuó la recompensa a la morfina en el test de CPP (Valjent et al., 2006b), indicando que la señalización de ERK1/2 es necesaria para establecer esta respuesta conductual a la morfina (Girault et al., 2007). De acuerdo con estos hallazgos, en la corteza prefrontal de adictos crónicos a opiáceos, se halló una marcada reducción en la activación de

ERK1/2 (presente estudio; Ferrer-Alcón et al., 2004), lo que sugiere la participación de esta MAPK en la inducción de tolerancia a la recompensa. Recientemente, se ha asociado la reducción de la activación de Akt1 en el área ventral del tegmento (VTA), tras tratamientos crónicos con morfina, a una respuesta conductual disminuida a los efectos de recompensa de la morfina en la prueba de CPP (Russo et al., 2009), demostrando la importancia de esta quinasa en el proceso de la tolerancia conductual. En este estudio, los contenidos de p-Ser473 Akt1 se hallaron reducidos en la corteza prefrontal de adictos crónicos, lo que concuerda con la reducción de la actividad de Akt1 inducida tras tratamientos crónicos con morfina en el núcleo accumbens (Muller y Unterwald, 2004) y VTA (Russo et al., 2007) de rata. Así pues, dado que el progreso de la adicción en humanos (auto-administración compulsiva de altas dosis de opiáceos) viene acompañado de una tolerancia a los efectos positivos de la droga, es tentativo concluir que las reducciones de ERK1/2 y Akt1 observadas en la corteza prefrontal de adictos crónicos a opiáceos están directamente relacionadas con la inducción de tolerancia a la recompensa (figura 5-2).

La eliminación de los adrenoceptores α_2 acentúa la intensidad del síndrome de abstinencia y el incremento de p-FADD cortical

Ha sido demostrado que la activación de los receptores inhibitorios α_2 en el cerebro suprime la mayoría de los síntomas físicos y conductuales de la abstinencia en roedores (véase Ulibarri et al., 1987; Maldonado, 1997). En ratas dependientes de morfina, la densidad de estos receptores durante la ausencia de opiáceo (2-72 horas) mostró una correlación directa con la expresión acampanada de la intensidad del síndrome de abstinencia en el mismo periodo de tiempo (Ulibarri et al., 1987). Este hallazgo parece consistente con la correlación observada en este estudio entre los contenidos corticales de p-FADD y la severidad conductual del síndrome. Así, la eliminación selectiva de los adrenoceptores α_2 durante la retirada de la morfina resultó en una potenciación de la severidad del síndrome conductual, que fue acompañada de una sobre-estimulación de la forma oligomérica de p-FADD en la corteza cerebral. Estas observaciones no sólo reforzaron la importancia del papel desempeñado por esta forma de FADD durante la abstinencia a opiáceos, sino que también sugirieron que esta proteína podría mediar la señalización de los receptores α_2 en el cerebro de la dependencia a la morfina. De hecho, el tratamiento agudo con agonistas α_2 clonidina y brimonidina (UK14303) alteró de forma dosis-dependiente (0.03-3 mg/kg) las distintas formas de FADD, en un mecanismo sensible al antagonista selectivo RX821002 (García-Sevilla y García-Fuster, 2009). En conjunto, estos resultados indican claramente que la

proteína multifuncional FADD es una molécula que participa en los mecanismos de señalización asociados con la estimulación de los adrenoceptores α_2 .

CONCLUSIONES

Las conclusiones principales de esta Tesis doctoral son las siguientes:

1. La adicción a opiáceos en humanos no está asociada con alteraciones aberrantes en la expresión de proteínas apoptóticas involucradas en las vías de muerte celular extrínseca (complejo Fas/FADD) o intrínseca/mitocondrial que puedan sugerir un incremento de la tasa apoptótica en la corteza prefrontal, una región cerebral implicada en el desarrollo y expresión conductual de la adicción y que media el fenómeno de recompensa inducido por opiáceos, y otras drogas de abuso.
2. Por el contrario, la modulación de algunas de estas proteínas en la corteza prefrontal de adictos a opiáceos y, en concreto, la alteración del equilibrio entre p-Ser194 FADD (incrementado) y FADD (reducido), sugiere su participación en procesos de neuroprotección u otras actividades no apoptóticas.
3. El paralelismo entre la expresión conductual en los modelos de sensibilización y dependencia a la morfina, y los contenidos de p-Ser191/194 FADD en la corteza cerebral y/o estriado de ratas, indica la participación de esta proteína en el proceso de adicción a los opiáceos.
4. La atenuación de la intensidad de la sensibilización locomotora, así como de la abstinencia a opiáceos, tras la inhibición farmacológica de MEK/ERK, demuestra el papel de las MAPKs en estos fenómenos de neuroplasticidad conductual inducidos por la exposición repetida a la morfina.
5. También se ha demostrado que algunos de los efectos de los opiáceos sobre las distintas formas de FADD son dependientes de ERK, poniendo de manifiesto la interacción entre estas dos vías de señalización en las acciones farmacológicas de los opiáceos, posiblemente a través de la vía Akt/PEA-15.
6. La marcada reducción de la actividad de las kinasas estudiadas (ERK1/2, JNK1/2, Akt1) en los adictos crónicos a opiáceos podría ser clave en el proceso de plasticidad neuronal que da origen a las alteraciones estructurales y conductuales a largo plazo observados en esta patología.
7. La interacción entre p-Ser194 FADD y las vías de señalización asociadas a la plasticidad neuronal (MAPKs, Akt1/PEA-15) podría desempeñar un papel relevante en alguna de las

formas de plasticidad estructural y conductual inducidas por el consumo prolongado de opiáceos.

En conjunto, esta Tesis doctoral ha puesto de manifiesto que la fosforilación de la proteína multifuncional FADD puede ser un nuevo mecanismo mediante el cual los opiáceos ejercen diversas acciones neuroplásticas en el sistema nervioso central.

REFERENCIAS

- Abdolzade-Bavil A, Hayes S, Goretzki L, Kröger M, Yers J, Hendriks R (2004) Convenient and versatile subcellular extraction procedure, that facilitates classical protein expression profiling and functional protein analysis. *Proteomics* 4:1397-1405.
- Acehan D, Jiang X, Morgan DG, Heuser JE, Wang X, Akey CW (2002) Three-dimensional structure of the apoptosome: implications for assembly, procaspase-9 binding, and activation. *Mol Cell* 9:423-432.
- Aghajanian GK, Cedarbaum JM, Wang RY (1977) Evidence for norepinephrine-mediated collateral inhibition of locus coeruleus neurons. *Brain Res* 136:570-577.
- Aghajanian GK (1978) Tolerance of locus coeruleus neurones to morphine and suppression of withdrawal response by clonidine. *Nature* 276:186-188.
- Alappat E, Feig, C, Boyerinas B, Volkland J, Samuels M, Murmann AE, Thorburn A, Kidd VJ, Slaughter CA, Osborn SL, Winoto A, Tang WJ, Peter ME (2005) Phosphorylation of FADD at serine 194 by CKI α regulates its nonapoptotic activities. *Mol Cell* 19:321-332.
- 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* 151:787-797.
- Alreja M, Aghajanian GK (1993) Opiates suppress a resting sodium-dependent inward current and activate an outward potassium current in locus coeruleus neurons. *J Neurosci* 13:3525-3532.
- Algeciras-Schimmich A, Shen L, Barnhart BC, Murmann AE, Burkhardt JK, Peter ME (2002) Molecular ordering of the initial signaling events of CD95. *Mol Cell Biol* 22:207-220.
- Álvaro-Bartolomé M, Esteban S, García-Gutiérrez MS, Manzanares J, Valverde O, García-Sevilla JA. Regulation of Fas receptor/Fas-associated protein with death domain apoptotic complex and associated signalling systems by cannabinoid receptors in the mouse brain. *Br J Pharmacol* 160:643-656.
- Ammon S, Mayer P, Riechert U, Tischmeyer H, Höllt V (2003) Microarray analysis of genes expressed in the frontal cortex of rats chronically treated with morphine and after naloxone precipitated withdrawal. *Mol Brain Res* 112:113-125.
- Anagnostaras SG, Robinson TE (1996) Sensitization to the psychomotor stimulant effects of amphetamine: modulation by associative learning. *Behav Neurosci* 110:1397-1414.
- Anglès-Pujolràs M, Díez-Noguera A, Soria V, Urretavizcaya M, Menchón JM, Cambras T (2009) Electroconvulsive shock alters the rat overt rhythms of motor activity and temperature without altering the circadian pacemaker. *Behav Brain Res* 196:37-43.
- Araujo H, Danziger N, Cordier J, Glowinski J, Chneiweiss H (1993) Characterization of PEA-15, a major substrate for protein kinase C in astrocytes. *J Biol Chem* 268:5911-5920.

- Babbini M, Davis WM (1972) Time-dose relationships for locomotor activity effects of morphine after acute or repeated treatment. *Br J Pharmacol* 46:213-224.
- Babbini M, Gaiardi M, Bartoletti M (1975) Persistence of chronic morphine effects upon activity in rats 8 months after ceasing the treatment. *Neuropharmacology* 14:611-614.
- Badiani A, Robinson TE (2004) Drug-induced neurobehavioral plasticity: the role of environmental context. *Behav Pharmacol* 15:327-339.
- Bailey CP, Connor M (2005) Opioids: cellular mechanisms of tolerance and physical dependence. *Curr Opin Pharmacol* 5:60-68.
- Ballesteros-Yañez I, Ambrosio E, Benavides-Piccione R, Pérez J, Torres I, Miguéns M, García-Lecumberri C, De Felipe J (2007) The effects of morphine self-administration on cortical pyramidal cell structure in addiction-prone Lewis rats. *Cereb Cortex* 17:238-249.
- Beaulieu J-M, Gainetdinov RR, Caron MG (2007) The Akt-GSK-3 signaling cascade in the actions of dopamine. *Trends Pharmacol Sci* 28:166-172.
- Berhow MT, Hiroi N, Nestler EJ (1996) Regulation of ERK (extracellular signal regulated kinase), part of the neurotrophin signal transduction cascade, in the rat mesolimbic dopamine system by chronic exposure to morphine or cocaine. *J Neurosci* 16:4707-4715.
- Bi FF, Xiao B, Hu YQ, Tian FF, Wu ZG, Ding L, Zhou XF (2008) Expression and localization of Fas-associated proteins following focal cerebral ischemia in rats. *Brain Res* 1191:30-38.
- Biasini E, Seegulam ME, Patti BN, Solforosi L, Medrano AZ, Christensen HM, Senatore A, Chiesa R, Williamson RA, Harris DA (2008) Non-infectious aggregates of the prion protein react with several PrPSc-directed antibodies. *J Neurochem* 105:2190-2204.
- Bläsing J, Herz A, Reinhold K, Zieglgänsberger S (1973) Development of physical dependence on morphine in respect to time and dosage and quantification of the precipitated withdrawal syndrome in rats. *Psychopharmacologia* 33:19-38.
- Bohn LM, Lefkowitz RJ, Gainetdinov RR, Peppel K, Caron MG, Lin FT (1999) Enhanced morphine analgesia in mice lacking beta-arrestin 2. *Science* 286:2495-2498.
- Bohn LM, Gainetdinov RR, Lin FT, Lefkowitz RJ, Caron MG (2000) Mu-opioid receptor desensitization by beta-arrestin-2 determines morphine tolerance but not dependence. *Nature* 408:720-723.
- Bolaños CA, Nestler EJ (2004) Neurotrophic mechanisms in drug addiction. *Neuromolecular Med* 5:69-83.

- Borgkvist A, Usiello A, Greengard P, Fisone G (2007) Activation of the cAMP/PKA/DARPP-32 signaling pathway is required for morphine psychomotor stimulation but not for morphine reward. *Neuropsychopharmacology* 32:1995-2003.
- Borgkvist A, Valjent E, Santini E, Hervé D, Girault JA, Fisone G (2008) Delayed, context- and dopamine D1 receptor-dependent activation of ERK in morphine-sensitized mice. *Neuropharmacology* 55:230-237.
- Boronat MA, García-Fuster MJ, García-Sevilla JA (2001) Chronic morphine induces up-regulation of the pro-apoptotic Fas receptor and down-regulation of the anti-apoptotic Bcl-2 oncoprotein in rat brain. *Br J Pharmacol* 134:1263-1270.
- Boumba VA, Ziavrou KS, Vougiouklakis T (2006) Hair as a biological indicator of drug use, drug abuse or chronic exposure to environmental toxicants. *Inter J Toxicol* 25:143-163.
- Bradbury AF, Smyth DG, Snell CR, Birdsall NJM, Hulme EC (1976) C-fragment of lipoprotein has a high affinity for brain opiate receptors. *Nature* 200:793-795.
- Brami-Cherrier K, Roze E, Girault JA, Betuing S, Caboche J (2009) Role of the ERK/MSK1 signalling pathway in chromatin remodelling and brain responses to drugs of abuse. *J Neurochem* 108:1323-1335.
- Brandt MR, Furness MS, Rice KC, Fischer BD, Negus SS (2001) Studies of tolerance and dependence with the delta-opioid agonist SNC80 in rhesus monkeys responding under a schedule of food presentation. *J Pharmacol Exp Ther* 299:629-637.
- Briand LA, Blendy JA (2010) Molecular and genetic substrates linking stress and addiction. *Brain Res* 1314:219-234.
- Burke RE (2008) Programmed cell death and new discoveries in the genetics of parkinsonism. *J Neurochem* 104:875-890.
- Busquets X, Escribá PV, Sastre M, García-Sevilla JA (1995) Loss of protein kinase C- $\alpha\beta$ in brain of heroin addicts and morphine-dependent rats. *J Neurochem* 64:247-252.
- Camí J, Farré M (2003) Drug addiction. *N Engl J Med* 349:975-986.
- Campuzano A, Vilaplana J, Cambras T, Díez-Noguera A (1998) Dissociation of the rat motor activity rhythm under T cycles shorter than 24 hours. *Physiol Behav* 63:171-176.
- Cao JL, He JH, Ding HL, Zeng YM (2005) Activation of the spinal ERK signaling pathway contributes naloxone-precipitated withdrawal in morphine-dependent rats. *Pain* 118:336-349.
- Carlezon WA Jr, Thomas MJ (2009) Biological substrates of reward and aversion: a nucleus accumbens activity hypothesis. *Neuropharmacology* 56(Suppl 1):122-132.

- Chang KJ, Eckel RW, Blanchard SG (1982) Opioid peptides induce reduction of enkephalin receptors in cultured neuroblastoma cells. *Nature* 296:446-448.
- Chaturvedi K, Christoffers KH, Singh K, Howells RD (2000) Structure and regulation of opioid receptors. *Biopolymers* 55:334-346.
- Cheema ZF, Wade SB, Sata M, Walsh K, Sohrabji F, Miranda RC (1999) Fas/Apo [apoptosis]-1 and associated proteins in the differentiating cerebral cortex: induction of caspase-dependent cell death and activation of NF-kappaB. *J Neurosci* 19:1754-1770.
- Cherezov V, Rosenbaum DM, Hanson MA, Rasmussen SG, Thian FS, Kobilka TS, Choi HJ, Kuhn P, Weis WI, Kobilka BK, Stevens RC (2007) High-resolution crystal structure of an engineered human beta2-adrenergic G protein-coupled receptor. *Science* 318:1258-1265.
- Chinnaiyan AM, O'Rourke K, Tewari M, Dixit VM (1995) FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. *Cell* 81:505-512.
- Christie MJ (2008) Cellular neuroadaptations to chronic opioids: tolerance, withdrawal and addiction. *Br J Pharmacol* 154:384-396.
- Clark MJ, Traynor JR (2006) Mediation of adenylyl cyclase sensitization by PTX-insensitive GalphaoA, Galphai1, Galphai2 or Galphai3. *J Neurochem* 99:1494-1504.
- Corominas M, Roncero C, Ribases M, Castells X, Casas M (2007) Brain-derived neurotrophic factor and its intracellular signaling pathways in cocaine addiction. *Neuropsychobiology* 55:2-13.
- Cox BM, Goldstein A, Hi CH (1976) Opioid activity of a peptide, beta-lipotropin-(61-91), derived from beta-lipotropin. *Proc Natl Acad Sci USA* 73:1821-1523.
- Crow TJ, Deakin JFW (1978) Brain reinforcement centers and psychoactive drugs. *Res Adv Alcohol Drug Probl* 4:25-76.
- Cui Y, Chen Y, Zhi JL, Guo RX, Feng JQ, Chen PX. Activation of p38 mitogen-activated protein kinase in spinal microglia mediates morphine antinociceptive tolerance. *Brain Res* 1069:235-43.
- Cunha-Oliveira T, Rego AC, Garrido J, Borges F, Macedo T, Oliveira CR (2007) Street heroin induces mitochondrial dysfunction and apoptosis in rat cortical neurons. *J Neurochem* 101:543-554.
- Cunha-Oliveira T, Rego AC, Oliveira CR (2008) Cellular and molecular mechanisms involved in the neurotoxicity of opioid and psychostimulant drugs. *Brain Res Rev* 58:192-208.
- Daaka Y, Luttrell LM, Ahn S, Della Rocca GJ, Ferguson SS, Caron MG, Lefkowitz RJ (1998) Essential role for G protein-coupled receptor endocytosis in the activation of mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* 273:685-688.

- Dargusch R, Piasecki D, Tan S, Liu Y, Schubert D (2001) The role of Bax in glutamate-induced nerve cell death. *J Neurochem* 76:295-301.
- Daugas E, Susin SA, Zamzami N, Ferri KF, Irinopoulou T, Larochette N, Prévost MC, Leber B, Andrews D, Penninger J, Kroemer G (2000) Mitochondrio-nuclear translocation of AIF in apoptosis and necrosis. *FASEB J* 14:729-739.
- Derks NM, Müller M, Gaszner B, Tilburg-Ouwenes DTWM, Roubor EW, Kozicz LT (2008) Housekeeping genes revisited: Different expressions depending on gender, brain area and stressor. *Neuroscience* 156:305-309.
- Desbarats J, Birge RB, Minouni-Rongy M, Weistein DE, Palerme JS, Newell MK (2003) Fas engagement induces neurite growth through ERK activation and p35 upregulation. *Nature Cell Biol* 5:118-125.
- Dhawan BN, Cesselin F, Raghubir R, Reisine T, Bradley PB, Portoghese PS, Hamon M (1996) International Union of Pharmacology. XII. Classification of opioid receptors. *Pharmacol Rev* 48:567-592.
- Di Chiara G (1999) Drug addiction as dopamine-dependent associative learning disorder. *Eur J Pharmacol* 375:13-30.
- Di Paolo G, Lutjens R, Osen-Sand A, Sobel A, Catsicas S, Grenningloh G (1997) Differential distribution of stathmin and SCG10 in developing neurons in culture. *J Neurosci Res* 50:1000-1009.
- Drzyzga LR, Marcinowska A, Obuchowicz E (2009) Antiapoptotic and neurotrophic effects of antidepressants: a review of clinical and experimental studies. *Brain Res Bull* 79:248-257.
- Edwards S, Graham DL, Whisler KN, Self DW (2009) Phosphorylation of GluR1, ERK, and CREB during spontaneous withdrawal from chronic heroin self-administration. *Synapse* 63:224-235.
- Eisleb O y Schausmann O (1939) Dolantin, ein neuartiges Spasmolytikum und Analgetikum. *Deutsch Wschr* 65:967-968.
- Endigawork E, Gulesserian T, Yoo BC, Cairns N, Lubec G (2001) Alteration of caspases and apoptosis-related proteins in brains of patients with Alzheimer's disease. *Biochem Biophys Res Comm* 281:84-93.
- Escribá PV, Sastre M, García-Sevilla JA (1994) Increased density of guanine nucleotide-binding proteins in the postmortem brains of heroin addicts. *Arch Gen Psychiatry* 51:494-501.
- Evans CJ, Keith DE Jr, Morrison H, Magendzo K, Edwards RH (1992) Cloning of a delta opioid receptor by functional expression. *Science* 258:1952-1955.
- Everitt BJ, Robbins TW (2005) Neural systems of reinforcement for drug addiction: from actions to habits to compulsion. *Nat Neurosci* 8:1481-1489.

- Everitt BJ, Hutcheson DM, Ersche KD, Pelloux Y, Dalley JW, Robbins TW (2007) The orbital prefrontal cortex and drug addiction in laboratory animals and humans. *Ann NY Acad Sci* 1121:576-597.
- Fan GH, Wang LZ, Qiu HC, Ma L, Pei G (1999) Inhibition of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II in rat hippocampus attenuates morphine tolerance and dependence. *Mol Pharmacol* 56:39-45.
- Fan XL, Zhang JS, Zhang XQ, Ma L. (2003) Chronic morphine treatment and withdrawal induce up-regulation of c-Jun N-terminal kinase 3 gene expression in rat brain. *Neuroscience* 122:997-1002.
- Feig C, Tchikov V, Schütze S, Peter ME (2007) Palmitoylation of CD95 facilitates formation of SDS-stable receptor aggregates that initiate apoptosis signaling. *EMBO J* 26:221-231.
- Fellin T (2009) Communication between neurons and astrocytes: relevance to the modulation of synaptic and network activity. *J Neurochem* 108:533-544.
- Feltenstein MW, See RE (2008) The neurocircuitry of addiction: an overview. *Br J Pharmacol* 154:261-274.
- Ferguson SS, Downey WE 3rd, Colapietro AM, Barak LS, Ménard L, Caron MG (1996) Role of beta-arrestin in mediating agonist-promoted G protein-coupled receptor internalization. *Science* 271:363-366.
- Ferrer-Alcón M, García-Sevilla JA, Jaquet PE, La Harpe R, Riederer BM, Walzer C, Guimón J (2000) Regulation of nonphosphorylated and phosphorylated forms of neurofilament proteins in the prefrontal cortex of human opioid addicts. *J Neurosci Res* 61:338-349.
- Ferrer-Alcón M, La Harpe R, Guimón J, García-Sevilla JA (2003) Downregulation of neuronal cdk5/p35 in opioid addicts and opiate-treated rats: Relation to neurofilament phosphorylation. *Neuropsychopharmacology* 28:947-955.
- Ferrer-Alcón M, García-Fuster MJ, La Harpe R, García-Sevilla JA (2004) Long-term regulation of signalling components of adenylyl cyclase and mitogen-activated protein kinase in the pre-frontal cortex of human opiate addicts. *J Neurochem* 90:220-230.
- Formstecher E, Ramos JW, Fauquet M, Calderwood DA, Hsieh J-C, Canton B, Nguyen X-T, Barnier J-V, Camonis J, Ginsberg MH, Chneiweiss H (2001) PEA-15 mediates cytoplasmic sequestration of ERK MAP kinase. *Develop Cell* 1:239-250.
- Franklin TR, Acton PD, Maldjian JA, Gray JD, Croft JR, Dackis CA, O'Brien CP, Childress AR (2002) Decreased gray matter concentration in the insular, orbitofrontal, cingulate, and temporal cortices of cocaine patients. *Biol Psychiatry* 51:134-142.
- Fugelstad A, Ahlner J, Bryt L, Ceder G, Eksborg S, Rajs J, Beck O (2003) Use of morphine and 6-monoacetylmorphine in blood for the evaluation of possible risk factors for sudden death in 192 heroin users. *Addiction* 98:463-470.

- Fuster JM (2001) The prefrontal cortex—An update: Time is of the essence. *Neuron* 30:319-333.
- Gabilondo AM, Meana JJ, Barturen F, Sastre M, García-Sevilla JA (1994) μ -Opioid receptor and alpha 2-adrenoceptor agonist binding sites in the postmortem brain of heroin addicts. *Psychopharmacology (Berl)* 115:135-140.
- Gabilondo AM, García-Sevilla JA (1995) Spontaneous withdrawal from long-term treatment with morphine accelerates the turnover of alpha 2-adrenoceptors in the rat brain: up-regulation of receptors associated with increased receptor appearance. *J Neurochem* 64:2590-2597.
- Gabra BH, Bailey CP, Kelly E, Smith FL, Henderson G, Dewey WL (2008) Pre-treatment with a PKC or PKA inhibitor prevents the development of morphine tolerance but not physical dependence in mice. *Brain Res* 1217:70-77.
- Galluzzi L, Aaronson SA, Abrams J, Alnemri ES, Andrews DW, Baehrecke EH, et al. (2009) Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring cell death in higher eukaryotes. *Cell Death Differ* 16:1093-1107.
- García-Fuster MJ, Ferrer-Alcón M, Miralles A, García-Sevilla JA (2003) Modulation of Fas receptor proteins and dynamin during opiate addiction and induction of opiate withdrawal in rat brain. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 368:421-431.
- García-Fuster MJ, Ferrer-Alcón M, Miralles A, García-Sevilla JA (2004) Deglycosylation of Fas receptor and chronic morphine treatment up-regulate high molecular mass Fas aggregates in the rat brain. *Eur J Pharmacol* 496:63-69.
- García-Fuster MJ, Miralles A, García-Sevilla JA (2007a) Effects of opiate drugs on Fas-associated protein with death domain (FADD) and effector caspases in the rat brain: Regulation by the ERK1/2 MAP kinase pathway. *Neuropsychopharmacology* 32:399-441.
- García-Fuster MJ, Ferrer-Alcón M, Martín M, Kieffer BL, Maldonado R, García-Sevilla JA (2007b) Effects of constitutive deletion of opioid receptors on the basal densities of Fas and Fas-associated protein with death domain (FADD) in the mouse brain: a delta-opioid tone inhibits FADD. *Eur Neuropsychopharmacol* 17:366-374.
- García-Fuster MJ, Clinton SM, Watson SJ, Akil H (2009) Effect of cocaine on Fas-associated protein with death domain (FADD) in the rat brain: Individual differences in a model of differential vulnerability to drug abuse. *Neuropsychopharmacology* 134:1123-1134.
- García-Sevilla JA, Magnusson T, Carlsson A (1978) Effect of intracerebroventricularly administered somatostatin on brain monoamine turnover. *Brain Res* 155:159-164.

- García-Sevilla JA, Ventayol P, Busquets X, La Harpe R, Walzer C, Guimón J (1997) Regulation of immunolabelled μ -opioid receptors and protein kinase C- α and ζ isoforms in the frontal cortex of human opiate addicts. *Neurosci Lett* 226:29-32.
- García-Sevilla JA, García-Fuster MJ (2009) Acute and chronic antidepressants downregulate FADD in rat brain: involvement of monoamine receptors. *Eur Neuropsychopharmacol* 19(Suppl. 3):S431.
- Gardner EL (2005) Endocannabinoid signaling system and brain reward: emphasis on dopamine. *Pharmacol Biochem Behav* 81:263-284.
- Garnett TO, Filippova M, Duerksen-Hughes P J (2006) Accelerated degradation of FADD and procaspase 8 in cells expressing human papilloma virus 16 E6 impairs TRAIL-mediated apoptosis. *Cell Death Differ* 13:1915-1926.
- Garzón J, Rodríguez-Muñoz M, Sánchez-Blázquez P (2008) Do pharmacological approaches that prevent opioid tolerance target different elements in the same regulatory machinery? *Curr Drug Abuse Rev* 1:222-238.
- Gellert VF, Holtzman SG (1978) Development and maintenance of morphine tolerance and dependence in the rat by scheduled access to morphine drinking solutions. *J Pharmacol Exp Ther* 205:536-546.
- Gerfen CR, Engber TM, Mahan LC, Susel Z, Chase TN, Monsma FJ Jr, Sibley DR (1990) D1 and D2 dopamine receptor-regulated gene expression of striatonigral and striatopallidal neurons. *Science* 250:1429-1432.
- Gilman CP, Mattson MP (2002) Do apoptotic mechanisms regulate synaptic plasticity and growth-cone motility? *Neuromol Med* 2:197-213.
- Gintzler AR, Chakrabarti S (2006) Post-opioid receptor adaptations to chronic morphine; altered functionality and associations of signaling molecules. *Life Sci* 79:717-722.
- Girault JA, Valjent E, Caboche J, Hervé D (2007) ERK2: a logical AND gate critical for drug-induced plasticity? *Curr Opin Pharmacol* 7:77-85.
- Glick SD, Merski C, Steindorf S, Wang S, Keller RW, Carlson JN (1992) Neurochemical predisposition to self-administer morphine in rats. *Brain Res* 578:215-220.
- Goldberger BA, Cone EJ, Grant T, Caplan YH, Levine BS, Smialek JE (1994) Disposition of heroin and its metabolites in heroin-related deaths. *J Anal Toxicol* 18:22-28.
- Goldstein A, Lowney LI, Pal BK (1971) Stereospecific and nonspecific interactions of the morphine congener levorphanol in subcellular fractions of mouse brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 68:1742-1747.
- Goldstein A, Fischli W, Lowney LI, Hunkapiller M, Hood L (1981) Porcine pituitary dynorphin: complete amino acid sequence of the biologically active heptadecapeptide. *Proc Natl Acad Sci USA* 78:7219-7223.

- Goldstein RZ, Volkow ND (2002) Drug addiction and its underlying neurobiological basis: neuroimaging evidence for the involvement of the frontal cortex. *Am J Psychiatry* 159:1642-1652.
- Gómez-Angelats M, Cidlowski JA (2003) Molecular evidence for the nuclear localization of FADD. *Cell Death Differ* 10:791-797.
- González-Maeso J, Torre I, Rodríguez-Puertas R, García-Sevilla JA, Guimón J, Meana JJ (2002) Effects of age, postmortem delay and storage time on receptor-mediated activation of G-proteins in human brain. *Neuropsychopharmacology* 26:468-478.
- Grange-Midroit M, García-Sevilla JA, Ferrer-Alcón M, La Harpe R, Walzer C, Guimón J (2002) G protein-coupled receptor kinases, β -arrestin-2 and associated regulatory proteins in the human brain: postmortem changes, effect of age and subcellular distribution. *Mol Brain Res* 101:39-51.
- Green DR, Reed JC (1998) Mitochondria and apoptosis. *Science* 281:1309-1312.
- Gross A, McDonnell JM, Korsmeyer SJ (1999) BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev* 13:1899-1911.
- Gruber SA, Silveri MM, Yurgelun-Todd DA (2007) Neuropsychological consequences of opiate use. *Neuropsychol Rev* 17:299-315.
- 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 coeruleus. *J Neurochem* 58:1168-1171.
- Gupta S (2001a) Molecular steps of tumor necrosis factor receptor-mediated apoptosis. *Curr Mol Med* 1:317-324.
- Gupta S (2001b) Molecular steps of death receptor and mitochondrial pathways of apoptosis. *Life Sci* 69:2957-2964.
- Hardy JA, Wester P, Winblad B, Gezelius C, Bring G, Eriksson A (1985) The patients dying after long terminal phase have acidotic brains: Implications for biochemical measurements on autopsy tissue. *J Neural Transm* 61:253-264.
- Hering H, Sheng M (2001) Dendritic spines: Structure, dynamics and regulation. *Nature Rev Neurosci* 2:880-888.
- Hiller JM, Pearson J, Simon EJ (1973) Distribution of stereospecific binding of the potent narcotic analgesic etorphine in the human brain: predominance in the limbic system. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 6:1052-1062.

- Hughes J, Smith T, Morgan B, Fothergill L (1975) Purification and properties of enkephalin - the possible endogenous ligand for the morphine receptor. *Life Sci* 16:1753-1758.
- Hyman SE (2005) Addiction: A disease of learning and memory. *Am J Psychiatry* 162:1414-1422.
- Hyman SE, Malenka RC (2001) Addiction and the brain: the neurobiology of compulsion and its persistence. *Nat Rev Neurosci* 2:695-703.
- Hyman SE, Malenka RC, Nestler EJ (2006) Neural mechanisms of addiction: the role of reward-related learning and memory. *Annu Rev Neurosci* 29:565-598.
- Itoh N, Yonehara S, Ishii A, Yonehara M, Mizushima S, Sameshima M, Hase A, Seto Y, Nagata S (1991) The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis. *Cell* 66:233-43.
- Izzo E, Martin-Fardon R, Koob GF, Weiss F, Sanna PP (2002) Neural plasticity and addiction: PI3-kinase and cocaine behavioral sensitization. *Nat Neurosci* 5:1263-1264.
- Jaffe JH (1990) Drug addiction and drug abuse. In Goodman & Gilman's the Pharmacological Basis of Therapeutics, Eighth edition (eds. Gilman AG, Rall TW, Nies AS, Taylor P) 522-573. Pergamon Press, New York.
- Jentsch JD, Taylor JR (1999) Impulsivity resulting from frontostriatal dysfunction in drug abuse: implications for the control of behavior by reward-related stimuli. *Psychopharmacology (Berl)* 146:373-390.
- Johnson SW, North RA (1992) Opioids excite dopamine neurons by hyperpolarization of local interneurons. *J Neurosci* 12:483-488.
- Johnston LD, O'Malley PM, Bachman JG, Schulenberg JE (2008) Monitoring the future national survey results on drug use, 1975–2007. College students and adults ages 19–45 (NIH Publication No. 08-6418B), Vol. II., Bethesda, MD: National Institute on Drug Abuse.
- Jonas E (2006) BCL-xL regulates synaptic plasticity. *Mol Interv* 6:208-222.
- Kakidani H, Furutani Y, Takahashi H, Noda M, Morimoto Y, Hirose T, Asai M, Inayama S, Nakanishi S, Numa S (1982) Cloning and sequence analysis of cDNA for porcine beta-neo-endorphin/dynorphin precursor. *Nature* 298:245-249.
- Kalivas PW, Stewart J (1991) Dopamine transmission in the initiation and expression of drug- and stress-induced sensitization of motor activity. *Brain Res Rev* 16:223-244.
- Kalivas PW, O'Brien C (2008) Drug addiction as a pathology of staged neuroplasticity. *Neuropsychopharmacol Rev* 33:166-180.

- Kang J, Shi Y, Xiang B, Qu B, Su W, Zhu M, Zhang M, Bao G, Wang F, Zhang X, Yang R, Fan F, Chen X, Pei G, Ma L (2005) A nuclear function of beta-arrestin1 in GPCR signaling: regulation of histone acetylation and gene transcription. *Cell* 123:833-847.
- Kataoka T (2005) The caspase-8 modulator c-FLIP. *Crit Rev Immunol* 25:31-58.
- Keith DE, Murray SR, Zaki PA, Chu PC, Lissin DV, Kang L, Evans CJ, von Zastrow M (1996) Morphine activates opioid receptors without causing their rapid internalization. *J Biol Chem* 271:19021-19024.
- Kelley AE (2004) Ventral striatal control of appetitive motivation: role in ingestive behavior and reward-related learning. *Neurosci Biobehav Rev* 27:765-776.
- Kelly E, Bailey CP, Henderson G (2008) Agonist-selective mechanisms of GPCR desensitization. *Br J Pharmacol* 153(Suppl 1):S379-S388.
- Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26:239-257.
- Kieffer BL, Befort K, Gavériaux-Ruff C, Hirth CG (1992) The delta-opioid receptor: isolation of a cDNA by expression cloning and pharmacological characterization. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:12048-12052.
- Kieffer BL, Evans CJ (2009) Opioid receptors: from binding sites to visible molecules in vivo. *Neuropharmacology* 56 Suppl 1:205-212.
- Kinloch RA, Treherne JM, Furness LM, Hajimohamadreza I (1999) The pharmacology of apoptosis. *Trends Pharmacol Sci* 20:35-42.
- Kischkel FC, Hellbardt S, Behrmann I, Germer M, Pawlita M, Krammer PH, Peter ME (1995) Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO J* 14:5579-5588.
- Kitsberg D, Formstecher E, Fauquet M, Kubes M, Cordier J, Canton B, Pan G-H, Rolli M, Glowinski J, Chneiweiss H (1999) Knock-out of the neural death effector domain protein PEA-15 demonstrates that its expression protects astrocytes from TNF-a-induced apoptosis. *J Neurosci* 19:8244-8251.
- Knapp RJ, Santoro G, De Leon IA, Lee KB, Edsall SA, Waite S, Malatynska E, Varga E, Calderon SN, Rice KC, Rothman RB, Porreca F, Roeske WR, Yamamura HI (1996) Structure-activity relationships for SNC80 and related compounds at cloned human delta and mu opioid receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 277:1284-1291.
- Koch T, Kroslak T, Mayer P, Raulf E, Höllt V (1997) Site mutation in the rat mu-opioid receptor demonstrates the involvement of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II in agonist-mediated desensitization. *J Neurochem* 69:1767-1770..

- Koh DW, Dawson TM, Dawson VL (2005) Poly(ADP-ribosyl)ation regulation of life and death in the nervous system. *Cell Mol Life Sci* 62:760-768.
- Korsmeyer SJ, Shutter JR, Veis DJ, Merry DE, Oltvai ZN (1993) Bcl-2/Bax: a rheostat that regulates an anti-oxidant pathway and cell death. *Semin Cancer Biol* 4:327-332.
- Krantic S, Mechawar N, Reix S, Quirino R (2007) Apoptosis-inducing factor: A matter of neuron life and death. *Progr Neurobiol* 81:179-196.
- Kreek MJ, Raganath J, Plevy S, Hamer D, Schneider B, Hartman N (1984) ACTH, cortisol and beta-endorphin response to metyrapone testing during chronic methadone maintenance treatment in humans. *Neuropeptides* 5:277-278.
- Krueger A, Schmitz I, Baumann S, Krammer PH, Kirchhoff S (2001) Cellular FLICE-inhibitory protein splice variants inhibit different steps of caspase-8 activation at the CD95 death-inducing signaling complex. *J Biol Chem* 276:20633-20640.
- Kuan C-Y, Yang DD, Samanta Roy DR, Davis RJ, Rakic P, Flavell RA (1999) The Jnk1 and Jnk2 protein kinases are required for regional specific apoptosis during early brain development. *Neuron* 22:667-676.
- Kuan C-Y, Whitmarsh AJ, Yang DD, Liao G, Schloemer AJ, Dong C, Bao J, Banasiak KJ, Haddad GG, Flavell RA, Davis RJ, Rakic P (2003) A critical role of neural-specific JNK3 for ischemic apoptosis. *Proc Nat Acad Sci USA* 100:15184-15189.
- Kuhar MJ, Pert CB, Snyder SH (1973) Regional distribution of opiate receptor binding in monkey and human brain. *Nature* 245:447-450.
- Kuida K, Zheng TS, Na S, Kuan C, Yang D, Karasuyama H, Rakic P, Flavell RA (1996) Decreased apoptosis in the brain and premature lethality in CPP32-deficient mice. *Nature* 384:368-372.
- Kumar S (2007) Caspase function in programmed cell death. *Cell Death Differ* 14:32-43.
- Kyosseva SV (2004) The role of the extracellular signal-regulated kinase pathway in cerebellar abnormalities in schizophrenia. *Cerebellum* 3:94-99.
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
- Lambert C, Landau AM, Desbarats J (2003) Fas-beyond death: a regenerative role for Fas in the nervous system. *Apoptosis* 8:551-62.
- Law PY, Hom DS, Loh HH (1982) Loss of opiate receptor activity in neuroblastoma X glioma NG108-15 hybrid cells after chronic opiate treatment. A multiple-step process. *Mol Pharmacol* 22:1-4.

- Lazebnik YA, Kaufmann SH, Desnoyers S, Poirier GG, Earnshaw WC (1994) Cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase by a proteinase with properties like ICE. *Nature* 371:346-347.
- Le Novère N, Li L, Girault JA. DARPP-32: molecular integration of phosphorylation potential (2008) *Cell Mol Life Sci* 65:2125-2127.
- Lee KH, Feig C, Tchikov V, Schickel R, Hallas C, Schütze S, Peter ME, Chan AC (2006) The role of receptor internalization in CD95 signaling. *EMBO J* 25:1009-1023.
- Levac BA, O'Dowd BF, George SR (2002) Oligomerization of opioid receptors: generation of novel signaling units. *Curr Opin Pharmacol* 2:76-81.
- Li CH, Chung D (1976) Isolation and structure of an untrikontapeptide with opiate activity from camel pituitary glands. *Proc Natl Acad Sci USA* 73:1145-1148.
- Li JZ, Vawter MP, Walsh DM, Tomita H, Evans SJ, Choudary PV, Lopez JF, Avelar A, Shokoohi V, Chung T, Mesarwi O, Jones EG, Watson SJ, Akil H, Bunney Jr WE, Myers RM (2004) Systematic changes in gene expression in postmortem human brains associated with tissue pH and terminal medical conditions. *Human Mol Gen* 13:609-616.
- Liao D, Lin H, Law PY, Loh HH (2005) Mu-opioid receptors modulate the stability of dendritic spines. *Proc Nat Acad Sci USA* 102:1725-1730.
- Liao D, Grigoriants OO, Wang W, Wiens K, Loh HH, Law PY (2007) Distinct effects of individual opioids on the morphology of spines depend upon the internalization of mu opioid receptors. *Mol Cell Neurosci* 35:456-469.
- Licata SC, Renshaw PF (2010) Neurochemistry of drug action: insights from proton magnetic resonance spectroscopic imaging and their relevance to addiction. *Ann NY Acad Sci* 1187:148-171.
- Linder MC, Goode CA (1991). *Biochemistry of Copper*. Plenum Press, New York.
- Lingford-Hughes AR, Welch S, Nutt DJ (2004) Evidence-based guidelines for the pharmacological management of substance misuse, addiction and comorbidity: recommendations from the British Association for Psychopharmacology. *J Psychopharmacol* 18:293-335.
- Liu X, Kim CN, Yang J, Jemmerson R, Wang X (1996) Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell* 86:147-157.
- Lord JA, Waterfield AA, Hughes J, Kosterlitz HW (1977) Endogenous opioid peptides: multiple agonists and receptors. *Nature* 267:495-499.

- Lou L, Zhou T, Wang P, Pei G (1999) Modulation of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II activity by acute and chronic morphine administration in rat hippocampus: differential regulation of alpha and beta isoforms. *Mol Pharmacol* 55:557-563.
- Lu L, Koya E, Zhai H, Hope BT, Shaham Y (2006) Role of ERK in cocaine addiction. *Trends Neurosci* 29:695-703.
- Lyoo IK, Pollack MH, Silveri MM, Ahn KH, Diaz CI, Hwang J, Kim SJ, Yurgelun-Todd DA, Kaufman MJ, Renshaw PF (2006) Prefrontal and temporal gray matter density decreases in opiate dependence. *Psychopharmacology* 184:139-144.
- Macey TA, Lowe JD, Chavkin C (2006) Mu opioid receptor activation of ERK1/2 is GRK3 and arrestin dependent in striatal neurons. *J Biol Chem* 281:34515-34524.
- Maldonado R, Valverde O, Garbay C, Roques BP (1995) Protein kinases in the locus coeruleus and periaqueductal gray matter are involved in the expression of opiate withdrawal. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 352:565-575.
- Maldonado R (1997) Participation of noradrenergic pathways in the expression of opiate withdrawal: biochemical and pharmacological evidence. *Neurosci Biobehav Rev* 21:91-104.
- Mansour A, Khachaturian H, Lewis ME, Akil H, Watson SJ (1987) Autoradiographic differentiation of mu, delta, and kappa opioid receptors in the rat forebrain and midbrain. *J Neurosci* 7:2445-2464.
- Mao J, Sung B, Ji RR, Lim G (2002) Neuronal apoptosis associated with morphine tolerance: Evidence for an opioid-induced neurotoxic mechanism. *J Neurosci* 22:7650-7661.
- Marie-Claire C, Courtin C, Roques BP, Noble F (2004) Cytoskeletal genes regulation by chronic morphine treatment in rat striatum. *Neuropsychopharmacology* 29:2208-2215.
- Martin WR, Eades CG, Thompson JA, Huppler RE, Gilbert PE (1976) The effects of morphine- and nalorphine-like drugs in the nondependent and morphine-dependent chronic spinal dog. *J Pharmacol Exp Ther* 197:517-532.
- Mathew SJ, Manji HK, Charney DS (2008) Novel drugs and therapeutic targets for severe mood disorders. *Neuropsychopharmacology* 33:2080-2092.
- Mathews JL, Smrcka AV, Bidlack JM (2008) A novel Gbetagamma-subunit inhibitor selectively modulates mu-opioid-dependent antinociception and attenuates acute morphine-induced antinociceptive tolerance and dependence. *J Neurosci* 28:12183-1219.
- Matsumoto N, Imamura R, Suda T (2007) Caspase-8- and JNK-dependent AP-1 activation is required for Fas ligand-induced IL-8 production. *FEBS J* 274:2376-2384.

- Mattson MP (2007) Mitochondrial regulation of neuronal plasticity. *Neurochem Res* 32:707-715.
- Mattson MP, Gleichmann M (2005) The neuronal death protein Par-4 mediates dopaminergic synaptic plasticity. *Mol Interv* 5:278-281.
- Mazzucchelli C, Vantaggiato C, Ciamei A, Fasano S, Pakhotin P, Krezel W, Welzl H, et al. (2002) Knockout of ERK1 MAP kinase enhances synaptic plasticity in the striatum and facilitates striatal-mediated learning and memory. *Neuron* 34:807-820.
- McClung CA, Nestler EJ (2008) Neuroplasticity mediated by altered gene expression. *Neuropsychopharmacol Rev* 33:3-17.
- McDaid J, Dallimore JE, Mackie AR, Napier TC (2006) Changes in accumbal and pallidal pCREB and deltaFosB in morphine-sensitized rats: correlations with receptor-evoked electrophysiological measures in the ventral pallidum. *Neuropsychopharmacology* 31:1212-1226.
- Meana JJ, González-Maeso J, García-Sevilla JA, Guimón J (2000) μ -opioid receptor and α_2 -adrenoceptor agonist stimulation of [³⁵S]GTP γ S binding to G-proteins in postmortem brains of opioid addicts. *Mol Psychiatry* 5:308-315.
- Merrill J, Garvey T, Rosson C (1996) Methadone concentrations taken as indicating deaths due to overdose need to be reviewed. *Br Med J* 313:1481.
- Mestek A, Hurley JH, Bye LS, Campbell AD, Chen Y, Tian M, Liu J, Schulman H, Yu L (1995) The human mu opioid receptor: modulation of functional desensitization by calcium/calmodulin-dependent protein kinase and protein kinase C. *J Neurosci* 15:2396-2406.
- Meunier JC, Mollereau C, Toll L, Suaudeau C, Moisand C, Alvinerie P, Butour JL, Guillemot JC, Ferrara P, Monsarrat B, et al. (1995) Isolation and structure of the endogenous agonist of opioid receptor-like ORL1 receptor. *Nature* 377:532-535.
- Milanés MV, Laorden ML (1998) Effects of U-50,488H withdrawal on catecholaminergic neurones of the rat ventricle. *Br J Pharmacol* 124:1060-1064.
- Moghaddam B, Homayoun H (2008) Divergent plasticity of prefrontal cortex networks. *Neuropsychopharmacol Rev* 33:42-55.
- Moranta D, Esteban S, García-Sevilla JA (2009) Chronic treatment and withdrawal of the cannabinoid agonist WIN 55,212-2 modulate the sensitivity of presynaptic receptors involved in the regulation of monoamine syntheses in rat brain. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 379(1):61-72.
- Morón JA, Abul-Husn NS, Rozenfeld R, Dolios G, Wang R, Devi LA (2007) Morphine administration alters the profile of hippocampal postsynaptic density-associated proteins. *Mol Cell Proteom* 6:29-42.

- Motulsky H (1995) *Intuitive Biostatistics*. Oxford University Press, New York.
- Moulédous L, Díaz MF, Gutstein HB (2007) Extracellular signal-regulated kinase (ERK) inhibition does not prevent the development or expression of tolerance to and dependence on morphine in the mouse. *Pharmacol Biochem Behav* 88:39-46.
- Muller DL, Unterwald EM (2004) In vivo regulation of extracellular signal-regulated protein kinase (ERK) and protein kinase B (Akt) phosphorylation by acute and chronic morphine. *J Pharmacol Exp Ther* 310:774-782.
- Muppidi JR, Lobito AA, Ramaswamy M, Yang JK, Wang L, Wu H, Siegel RM (2006) Homotypic FADD interactions through a conserved RXDLL motif are required for death receptor-induced apoptosis. *Cell Death Differ* 13:1641-1650.
- Nader K, van der Kooy D (1997) Deprivation state switches the neurobiological substrates mediating opiate reward in the ventral tegmental area. *J Neurosci* 17:383-390.
- Nairn AC, Svenningsson P, Nishi A, Fisone G, Girault JA, Greengard P (2004) The role of DARPP-32 in the actions of drugs of abuse. *Neuropharmacology* 47(Suppl 1):14-23.
- Nakanishi S, Inoue A, Kita T, Nakamura M, Chang AC, Cohen SN, Numa S (1979) Nucleotide sequence of cloned cDNA for bovine corticotropin-beta-lipotropin precursor. *Nature* 278:423-427.
- Narita M, Makimura M, Feng Y, Hoskins B, Ho IK (1994a) 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, Feng Y, Makimura M, Hoskins B, Ho IK (1994b) A protein kinase inhibitor, H-7, inhibits the development of tolerance to opioid antinociception. *Eur J Pharmacol* 271:543-545.
- Narita M, Aoki T, Ozaki S, Yajima Y, Suzuki T (2001) Involvement of protein kinase Cgamma isoform in morphine-induced reinforcing effects. *Neuroscience* 103:309-314.
- Narita M, Miyatake M, Narita M, Shibasaki M, Shindo K, Nakamura A, Kuzumaki N, Nagumo Y, Suzuki T (2006) Direct evidence of astrocytic modulation in the development of rewarding effects induced by drugs of abuse. *Neuropsychopharmacology* 31:2476-2488.
- Nestler EJ (1992) Molecular mechanisms of drug addiction. *J Neurosci* 12:2439-2450.
- Nestler EJ (2001) Molecular basis of long-term plasticity underlying addiction. *Nat Rev Neurosci* 2:119-128.
- Nestler EJ (2004) Historical review: Molecular and cellular mechanisms of opiate and cocaine addiction. *Trends Pharmacol Sci* 25:210-218.
- Nestler EJ (2008) Review. Transcriptional mechanisms of addiction: role of DeltaFosB. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 363:3245-3255.

- Nestler EJ, Aghajanian GK (1997) Molecular and cellular basis of addiction. *Science* 278:58-63.
- Nijhawan D, Honarpour N, Wang X (2000) Apoptosis in neural development and disease. *Annu Rev Neurosci* 23:73-87.
- Noda M, Furutani Y, Takahashi H, Toyosato M, Hirose T, Inayama S, Nakanishi S, Numa S. (1982) Cloning and sequence analysis of cDNA for bovine adrenal preproenkephalin. *Nature* 295:202-206.
- Nutt D, King LA, Saulsbury W, Blakemore C (2007) Development of a rational scale to assess the harm of drugs of potential misuse. *Lancet* 369:1047-1053.
- O'Brien (2006) Drug addiction and drug abuse. En: Brunton LL (Ed.), Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, Undécima Edición. McGraw-Hill, New York, pp. 607-627
- O'Reilly LA, Divisekera U, Newton K, Scalzo K, Kataoka T, Puthalakath H, Ito M, Huang DC, Strasser A. (2004) Modifications and intracellular trafficking of FADD/MORT1 and caspase-8 after stimulation of T lymphocytes. *Cell Death Differ* 11:724-736.
- Olds J, Milner PM (1954) Positive reinforcement produced by electrical stimulation of septal area and other regions of rat brain. *J Comp Physiol Psychol* 47:419-427.
- Olds J, Killam KF, Bach-y-Rita P (1956) Self-stimulation of the brain used as a screening method for tranquillizing drugs. *Science* 124:265.
- Oltvai ZN, Milliman CL, Korsmeyer SJ (1993) Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* 74:609-619.
- Oppenheim RW (1991) Cell death during development of the nervous system. *Annu Rev Neurosci* 14:453-501.
- Ortiz J, Harris HW, Guitart X, Terwilliger RZ, Haycock JW, Nestler EJ (1995) Extracellular signal-regulated protein kinases (ERKs) and ERK kinase (MEK) in brain: regional distribution and regulation by chronic morphine. *J Neurosci* 15:1285-1297.
- Ouimet CC, Langley-Gullion KC, Greengard P (1998) Quantitative immunocytochemistry of DARPP-32-expressing neurons in the rat caudatoputamen. *Brain Res* 808:8-12.
- Ozaita A, Escribá PV, Ventayol P, Murga C, Mayor Jr F, García-Sevilla JA (1998) Regulation of G protein-coupled receptor kinase 2 in brains of opiate-treated rats and human opiate addicts. *J Neurochem* 70:1249-1257.
- Palczewski K, Kumasaka T, Hori T, Behnke CA, Motoshima H, Fox BA, Le Trong I, Teller DC, Okada T, Stenkamp RE, Yamamoto M, Miyano M (2000) Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. *Science* 289:739-745.

- Park SM, Schickel R, Peter ME (2005) Nonapoptotic functions of FADD-binding death receptors and their signaling molecules. *Curr Op Cell Biol* 17:610-616.
- Pasternak GW, Simantov R, Snyder SH (1976) Characterization of an endogenous morphine-like factor(enkephalin) in mammalian brain. *Mol Pharmacol* 12:504-513.
- Pérez-San Emeterio E, Tramullas M, Hurlé MA (2006) Modulation of apoptosis in the mouse brain after morphine treatments and morphine withdrawal. *J Neurosci Res* 83:1352-1361.
- Perret G, Déglon JJ, Kreek MJ, Ho A, La Harpe R (2000) Lethal methadone intoxications in Geneva, Switzerland, from 1994 to 1998. *Addiction* 95:1647-1653.
- Pert CB, Snyder SH (1973) Opiate receptor: demonstration in nervous tissue. *Science* 179:1011-1014.
- Peter ME, Krammer PH (2003) The CD95 (APO-1/Fas) DISC and beyond. *Cell Death Differ* 10:26-35.
- Pezawas LM, Fischer G, Diamant K, Schneider C, Schindler SD, Thurnher M, Ploechl W, Eder H, Kasper S (1998) Cerebral CT findings in male opioid-dependent patients: stereological, planimetric and linear measurements. *Psychiatry Res* 83:139-147.
- Pierce RC, Bari AA (2001) The role of neurotrophic factors in psychostimulant-induced behavioral and neuronal plasticity. *Rev Neurosci* 12:95-110.
- Polakiewicz RD, Schieferl SM, Gingras A-C, Sonenberg N, Comb MJ (1998) m-Opioid receptor activates signaling pathways implicated in cell survival and translational control. *J Biol Chem* 273:23534-23541.
- Portoghese PS (1965) A new concept on the mode of interaction of narcotic analgesics with receptors. *J Med Chem* 8:609-616.
- Provasi D, Bortolato A, Filizola M (2009) Exploring molecular mechanisms of ligand recognition by opioid receptors with metadynamics. *Biochemistry* 48:10020-10029.
- Pujol ML, Cirimele V, Tritsch PJ, Villain M, Kintz P (2007) Evaluation of the IDS One-Step™ ELISA kits for the detection of illicit drugs in hair. *Foren Sci Intern* 170:189-192.
- Putt KS, Beilman GJ, Hergenrother PJ (2005) Direct quantitation of poly(ADP-ribose) polymrase (PARP) activity as a means to distinguish necrotic and apoptotic death in cell and tissues samples. *ChemBioChem* 6:53-55.
- Rajagopal S, Rajagopal K, Lefkowitz RJ (2010) Teaching old receptors new tricks: biasing seven-transmembrane receptors. *Nat Rev Drug Discov* 9:373-386.
- Ramos RW (2008) Pea15. *UCSD-Nature Mol Page*, doi:10.1038/mp.a002536.01

- Rasmussen K, Beitner-Johnson DB, Krystal JH, Aghajanian GK, Nestler EJ (1990) Opiate withdrawal and the rat locus coeruleus: behavioral, electrophysiological, and biochemical correlates. *J Neurosci* 10:2308-2317.
- Raynor K, Kong H, Chen Y, Yasuda K, Yu L, Bell GI, Reisine T (1993) Pharmacological characterization of the cloned kappa-, delta-, and mu-opioid receptors. *Mol Pharmacol* 45:330-334.
- Reed JC (1997) Cytochrome c: Can't live with it—Can't live without it. *Cell* 91:559-562.
- Rehm J, Frick U, Hartwig C, Gutzwiller F, Gschwend P, Uchtenhagen A (2005) Mortality in heroin-assisted treatment in Switzerland 1994-2000. *Drug Alcohol Depend* 79:137-143.
- Reich A, Spering C, Schulz JB (2008) Death receptor Fas (CD95) signaling in the central nervous system: tuning neuroplasticity? *Trends Neurosci* 31:478-486.
- Renganathan H, Vaidyanathan H, Knapinska A, Ramos JW (2005) Phosphorylation of PEA-15 switches its binding specificity from ERK/MAPK to FADD. *Biochem J* 390:729-735.
- Repetto MR, Repetto M (1997) Habitual, toxic, and lethal concentrations of 103 drugs of abuse in humans. *Clin Toxicol* 35:1-9.
- Robinson TE, Kolb B (1999) Morphine alters the structure of neurons in the nucleus accumbens and neocortex of rats. *Synapse* 33:160-162.
- Robinson TE, Kolb B (2004) Structural plasticity associated with exposure to drugs of abuse. *Neuropharmacology* 47(Suppl 1):33-46.
- Robinson TE, Gorny G, Savage VR, Kolb B (2002) Widespread but regionally specific effects of experimenter- versus self-administered morphine on dendritic spines in the nucleus accumbens, hippocampus, and neocortex of adult rats. *Synapse* 46:271-279.
- Rochat-Steiner V, Becker K, Micheau O, Schneider P, Burns K, Tschopp J (2000) FIST/HIPK3: a Fas/FADD-interacting serine/threonine kinase that induces FADD phosphorylation and inhibits fas-mediated Jun NH(2)-terminal kinase activation. *J Exp Med* 192:1165-1174.
- Rogers NF, el-Fakahany E (1986) Morphine-induced opioid receptor down-regulation detected in intact adult rat brain cells. *Eur J Pharmacol* 124:221-230.
- Rosenbaum DM, Cherezov V, Hanson MA, Rasmussen SG, Thian FS, Kobilka TS, Choi HJ, Yao XJ, Weis WI, Stevens RC, Kobilka BK (2007) GPCR engineering yields high-resolution structural insights into beta2-adrenergic receptor function. *Science* 318:1266-1273.
- Rothman RB, Bykov V, Cadet JL, Kleinman JE (1987) A postmortem study of the effect of chronic opiate abuse on psychotomimetic binding sites of human frontal cortex. *Neuropeptides* 10:261-264

- Russo SJ, Bolanos CA, Theobald DE, DeCarolis NA, Renthal W, Kumar A, Winstanley CA, Renthal NE, Wiley MD, Self DW, Russell DS, Neve RL, Eisch AJ, Nestler EJ (2007) IRS2-Akt pathway in midbrain dopamine neurons regulates behavioral and cellular responses to opiates. *Nature Neurosci* 10:93-99.
- Russo SJ, Mazei-Robison MS, Ables JL, Nestler EJ (2009) Neurotrophic factors and structural plasticity in addiction. *Neuropharmacology* 56(Suppl 1):73-82.
- Sandu C, Morisawa G, Wegorzewska I, Huang T, Arechiga AF, Hill JM, Kim T, Walsh CM, Werner MH (2006) FADD self-association is required for stable interaction with an activated death receptor. *Cell Death Differ* 13:2052-2061.
- Saper CB, Sawchenko PE (2003) Magic peptides, magic antibodies: guidelines for appropriate controls for immunohistochemistry. *J Comp Neurol* 465:161-163.
- Sastry PS, Rao KS (2000) Apoptosis and the nervous system. *J Neurochem* 74:1-20.
- Savage S, Covington EC, Heit HA, Hunt J, Joranson D, Schnoll SH (2001) Definitions related to the use of opioids for the treatment of pain: A consensus document from the AAPM, APS, and ASAM. <http://www.ampainsoc.org/advocacy/opioids2.htm>
- Scaffidi C, Volkland J, Blomberg I, Hoffmann I, Krammer PH, Peter ME (2000) Phosphorylation of FADD/MORT1 at serine 194 and association with a 70-kDa cell cycle-regulated protein kinase. *J Immunol* 164:1236-1242.
- Schofield PR, McFarland KC, Hayflick JS, Wilcox JN, Cho TM, Roy S, Lee NM, Loh HH, Seeburg PH (1989) Molecular characterization of a new immunoglobulin superfamily protein with potential roles in opioid binding and cell contact. *EMBO J* 8:489-495.
- Schoenbaum G, Shaham Y (2008) The role of orbitofrontal cortex in drug addiction: A review of preclinical studies. *Biol Psychiatry* 63:256-262.
- Schultz W (1998) Predictive reward signal of dopamine neurons. *J Neurophysiol* 80:1-27.
- Schultz W (2004) Neural coding of basic reward terms of animal learning theory, game theory, microeconomics and behavioural ecology. *Curr Opin Neurobiol* 14:139-147.
- Schultz W (2005) Behavioral theories and the neurophysiology of reward. *Annu Rev Psychol* 57:87-115.
- Schultz W, Dayan P, Montague PR (1997) A neural substrate of prediction and reward. *Science* 275:1593-1599.
- Scott CC and Chen KK (1946). The action of 1,1-Diphenyl-1-(Dim ethylaminoisopropyl)-Butanone- 2, a potent analgesic agent. *J Pharmacol Exp Ther* 87:63-71.

- Scott FL, Stec B, Pop C, Dobaczewska MK, Lee JJ, Monosov E, Robinson H, Salvesen GS, Schwarzenbacher R, Riedl SJ (2009) The Fas-FADD death domain complex structure unravels signalling by receptor clustering. *Nature* 457:1019-1022.
- Screaton RA, Kiessling S, Sanson OJ, Millar CB, Maddison K, Bird A, Clarke AR, Frisch SM (2003) Fas-associated death domain protein interacts with methyl-CpG binding domain protein 4: A potential link between genome surveillance and apoptosis. *Proc Nat Acad Sci USA* 100:5211-5216.
- Selcher JC, Atkins CM, Trzaskos JM, Paylor R, Sweatt JD (1999) A necessity for MAP kinase activation in mammalian spatial learning. *Learn Mem* 6:478-490.
- Sharif A, Renault F, Beuvon F, Castellanos R, Canton B, Barbeito L, Junier MP, Chneiweiss H (2004) The expression of PEA-15 (phosphoprotein enriched in astrocytes of 15 kDa) defines subpopulations of astrocytes and neurons throughout the adult mouse brain. *Neuroscience* 126:263-275.
- Sharma K, Wang RX, Zhang LY, Yin DL, Luo XY, Solomon JC, Jiang RF, Markos K, Davidson W, Scott DW, Shi YF (2000) Death the Fas way: regulation and pathophysiology of CD95 and its ligand. *Pharmacol Ther* 88:333-347.
- Simon EJ, Hiller JM, Edelman I (1973) Stereospecific binding of the potent narcotic analgesic (3H) Etorphine to rat-brain homogenate. *Proc Natl Acad Sci USA* 70:1947-1949.
- Sklair-Tavron L, Shi W-X, Lane SB, Harris HW, Bunney BS, Nestler EJ (1996) Chronic morphine induces visible changes in the morphology of mesolimbic dopamine neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:11202-11207.
- Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 150:76-85.
- Song G, Ouyang G, Bao S (2005) The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival. *J Cell Mol Med* 9:59-71.
- Spiga S, Serra GP, Puddu MC, Foddai M, Diana M (2003) Morphine withdrawal-induced abnormalities in the VTA: confocal laser scanning microscopy. *Eur J Neurosci* 17:605-612.
- Stan AD, Ghose S, Gao XM, Roberts RC, Lewis-Amezcuca K, Hatanpaa KJ, Tamminga CA (2006) Human postmortem tissue: What quality markers matter? *Brain Res* 1123:1-11.
- Stein L (1964) Self-stimulation of the brain and the central stimulant action of amphetamine. *Fed Proc* 23:836-850.
- Sternini C, Spann M, Anton B, Keith DE Jr, Bunnett NW, von Zastrow M, Evans C, Brecha NC (1996) Agonist-selective endocytosis of mu opioid receptor by neurons in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:9241-9416.

- Surmeier DJ, Ding J, Day M, Wang Z, Shen W (2007) D1 and D2 dopamine-receptor modulation of striatal glutamatergic signaling in striatal medium spiny neurons. *Trends Neurosci* 30:228-235.
- Susin SA, Zamzami N, Castedo M, Hirsch T, Marchetti P, Macho A, Daugas E, Geuskens M, Kroemer G (1996) Bcl-2 inhibits the mitochondrial release of an apoptogenic protease. *J Exp Med* 184:1331-1341.
- Svenningsson P, Nairn AC, Greengard P (2005) DARPP-32 mediates the actions of multiple drugs of abuse. *AAPS J* 7:E353-E360.
- Takagi Y, Kikuta K, Nozaki K, Fujimoto M, Hayashi J, Hashimoto N (2007) Neuronal expression of Fas-associated death domain protein and caspase-8 in the perinidal parenchyma of cerebral arteriovenous malformations. *J Neurosurg* 106:275-282.
- Taoufik E, Valable S, Müller GJ, Roberts ML, Divoux D, Tinel A, Voulgari-Kokota A, Tseveleki V, Altruda F, Lassmann H, Petit E, Probert L (2007) FLIPL protects neurons against in vivo ischemia and in vitro glucose deprivation-induced cell death. *J Neurosci.* 27:6633-6646.
- Tegeder I, Geisslinger G (2004) Opioids as modulators of cell death and survival—unraveling mechanisms and revealing new indications. *Pharmacol Rev* 56:351-369.
- Terenius L (1973) Characteristics of the "receptor" for narcotic analgesics in synaptic plasma membrane fraction from rat brain. *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh)* 33:377-384.
- Thomas GM, Huganir RL (2004) MAPK cascade signalling and synaptic plasticity. *Nature Rev Neurosci* 5:173-183.
- Thomas MJ, Kalivas PW, Shaham Y (2008) Neuroplasticity in the mesolimbic dopamine system and cocaine addiction. *Br J Pharmacol* 154:327-342.
- Tourneur L, Buzyn A, Chiocchia G (2005) FADD adaptor in cancer. *Med Immunol* 4:1.
- Tourneur L, Chiocchia G (2010) FADD: a regulator of life and death. *Trends Immunol* 31:260-269.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 76:4350-4354.
- Tramullas M, Martínez-Cué C, Hurlé MA (2007) Chronic methadone treatment and repeated withdrawal impair cognition and increase the expression of apoptosis-related proteins in mouse brain. *Psychopharmacology* 193:107-120.
- Tramullas M, Martínez-Cué C, Hurlé MA (2008) Chronic administration of heroin to mice produces up-regulation of brain apoptosis-related proteins and impairs spatial learning and memory. *Neuropharmacology* 54:640-652.

- Trencia A, Perfetti A, Cassese A, Vigliotta G, Miele C, Oriente F, Santopietro S, Giacco F, Condorelli G, Formisano P, Beguinot F (2003) Protein kinase B/Akt binds and phosphorylates PED/PEA-15, stabilizing its antiapoptotic action. *Mol Cell Biol* 23:4511-4521.
- Tschopp J, Irmeler M, Thome M (1998) Inhibition of Fas death signals by FLIPs. *Curr Op Immunol* 10:552-558.
- Ulibarri I, García-Sevilla JA, Ugedo L (1987) Modulation of brain alpha 2-adrenoceptor and mu-opioid receptor densities during morphine dependence and spontaneous withdrawal in rats. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 336:530-537.
- Unger VM, Hargrave PA, Baldwin JM, Schertler GF (1997) Arrangement of rhodopsin transmembrane alpha-helices. *Nature* 389:203-206.
- United Nations Office on Drugs and Crime (2008). 2008 world drug report. Vienna (AUT): United Nations Publications.
- Valjent E, Pagès C, Hervé D, Girault JA, Caboche J (2004) Addictive and non-addictive drugs induce distinct and specific patterns of ERK activation in mouse brain. *Eur J Neurosci* 19:1826-1836.
- Valjent E, Pascoli V, Svenningsson P, Paul S, Enslen H, Corvol JC, Stipanovich A, Caboche J, Lombroso PJ, Nairn AC, Greengard P, Hervé D, Girault JA (2005) Regulation of a protein phosphatase cascade allows convergent dopamine and glutamate signals to activate ERK in the striatum. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:49149-49146.
- Valjent E, Corvol JC, Trzaskos JM, Girault JA, Hervé D (2006a) Role of the ERK pathway in psychostimulant-induced locomotor sensitization. *BMC Neurosci* 7:20.
- Valjent E, Corbillé A-G, Bertran-Gonzalez J, Hervé D, Girault J-A (2006b) Inhibition of ERK pathway or protein synthesis during reexposure to drugs of abuse erases previously learned place preference. *Proc Nat Acad Sci USA* 103:2932-2937.
- Valmiki MG, Ramos JW (2009) Death effector domain-containing proteins. *Cell Mol Life Sci* 66:814-830.
- Vanderschuren LJ, Kalivas PW (2000) Alterations in dopaminergic and glutamatergic transmission in the induction and expression of behavioral sensitization: a critical review of preclinical studies. *Psychopharmacology (Berl)* 151:99-120.
- Ventayol P, Busquets X, García-Sevilla JA (1997) Modulation of immunoreactive protein kinase C-a and b isoforms and G proteins by acute and chronic treatments with morphine and other opiate drugs in rat brain. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 355:491-500.
- Ventura R, Alcaro A, Puglisi-Allegra S (2005) Prefrontal cortical norepinephrine release is critical for morphine-induced reward, reinstatement and dopamine release in the nucleus accumbens. *Cereb Cortex* 15:1877-1886.

- Volkow ND, Fowler JS, Wang GJ (2003) The addicted human brain: insights from imaging studies. *J Clin Invest* 111:1444-1451.
- Volkow ND, Wang GJ, Telang F, Fowler JS, Logan J, Childress AR, Jayne M, Ma Y, Wong C (2006) Cocaine cues and dopamine in dorsal striatum: mechanism of craving in cocaine addiction. *J Neurosci* 26:6583-6588.
- Walensky LD (2006) BCL-2 in the crosshairs: tipping the balance of life and death. *Cell Death Differ* 13:1339-1350.
- Wang G, Silva J, Krishnamurthy K, Bieberich E (2006) A novel isoform of prostate apoptosis response 4 (PAR-4) that co-distributes with F-actin and prevents apoptosis in neural stem cells. *Apoptosis* 11:315-325.
- Wang ZJ, Wang LX (2006) Phosphorylation: a molecular switch in opioid tolerance. *Life Sci* 79:1681-1691.
- Walhovd KB, Moe V, Slinning K, Due-Tønnessen P, Bjørnerud A, Dale AM, van der Kouwe A, Quinn BT, Kosofsky B, Greve D, Fischl B (2007) Volumetric cerebral characteristics of children exposed to opiates and other substances in utero. *Neuroimage* 36:1331-1344.
- Walhovd KB, Westlye LT, Moe V, Slinning K, Due-Tønnessen P, Bjørnerud A, van der Kouwe A, Dale AM, Fjell AM (2010) White matter characteristics and cognition in prenatally opiate- and polysubstance-exposed children: a diffusion tensor imaging study. *AJNR Am J Neuroradiol* 31:894-900.
- Waser PG (1960) The cholinergic receptor. *J Pharm Pharmacol* 12:577-594.
- Wei LN, Law PY, Loh HH (2004) Post-transcriptional regulation of opioid receptors in the nervous system. *Front Biosci* 9:1665-1679.
- Weinshenker D, Schroeder JP (2007) There and back again: a tale of norepinephrine and drug addiction. *Neuropsychopharmacology* 32:1433-1451.
- Weng Z, Signore AP, Gao Y, Wang S, Zhang F, Hastings T, Yin X-M, Chen J (2007) Leptin protects against 6-hydroxydopamine-induced dopaminergic cell death via mitogen-activated protein kinase signaling. *J Biol Chem* 282:34479-34491.
- Werner MH, Wu C, Walsh CM (2006) Emerging roles for the death adaptor FADD in death receptor avidity and cell cycle regulation. *Cell Cycle* 5:2332-2338.
- Whiteside GT, Adedoyin A, Leventhal L (2008) Predictive validity of animal pain models? A comparison of the pharmacokinetic-pharmacodynamic relationship for pain drugs in rats and humans. *Neuropharmacology* 54:767-775.
- Wiejlard J y Erikson AE (1942) N-allylnormorphine. *J. Am Chem Soc* 64:869-870.
- Williams JT, Christie MJ, Manzoni O (2001) Cellular and synaptic adaptations mediating opioid dependence. *Physiol Rev* 81:299-343.

- Wise RA (1980) The role of reward pathways in the development of drug dependence. *Pharmacol Ther* 35:227-63.
- Wise RA (2002) Brain reward circuitry: insights from unsensed incentives. *Neuron* 36:229-240.
- Wong WW, Puthalakath H (2008) Bcl-2 family proteins: the sentinels of the mitochondrial apoptosis pathway. *IUBMB Life* 60:390-397.
- Xia Z, Dickens M, Raingeaud J, Davis RJ, Greenberg ME (1995) Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science* 270:1326-1331.
- Xie GX, Miyajima A, Goldstein A (1992) Expression cloning of cDNA encoding a seven-helix receptor from human placenta with affinity for opioid ligands. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:4124-4128.
- Xie W, Samoriski GM, McLaughlin JP, Romoser VA, Smrcka A, Hinkle PM, Bidlack JM, Gross RA, Jiang H, Wu D (1999) Genetic alteration of phospholipase C β 3 expression modulates behavioral and cellular responses to μ opioids. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:10385-10390.
- Xie WY, He Y, Yang YR, Li YF, Kang K, Xing BM, Wang Y (2009) Disruption of Cdk5-associated phosphorylation of residue threonine-161 of the delta-opioid receptor: impaired receptor function and attenuated morphine antinociceptive tolerance. *J Neurosci* 29:3551-3564.
- Yeh WC, Pompa JL, McCurrach ME, Shu HB, Elia AJ, Shahinian A, Ng M, Wakeham A, Khoo W, Mitchell K, El-Deiry WS, Lowe SW, Goeddel DV, Mak TW (1998) FADD: essential for embryo development and signaling from some, but not all, inducers of apoptosis. *Science* 279:1954-1958.
- Yuan J, Yankner BA (2000) Apoptosis in the nervous system. *Nature* 407:802-809.
- Yücel M, Lubman DI, Harrison BJ, Fornito A, Allen NB, Wellard RM, Roffel K, Clarke K, Wood SJ, Forman SD, Pantelis C (2007) A combined spectroscopic and functional MRI investigation of the dorsal anterior cingulate region in opiate addiction. *Mol Psychiatry* 12:691-702.
- Zachariou V, Benoit-Marand M, Allen PB, Ingrassia P, Fienberg AA, Gonon F, Greengard P, Picciotto MR (2002) Reduction of cocaine place preference in mice lacking the protein phosphatase 1 inhibitors DARPP32 or Inhibitor 1. *Biol Psychiatry* 51:612-620.
- Zachariou V, Sgambato-Faure V, Sasaki T, Svenningsson P, Berton O, Fienberg AA, Nairn AC, Greengard P, Nestler EJ (2006) Phosphorylation of DARPP-32 at Threonine-34 is required for cocaine action. *Neuropsychopharmacology* 31:555-562.
- Zhai H, Li Y, Wang X, Lu L (2008) Drug-induced alterations in the extracellular signal-regulated kinase (ERK) signalling pathway: implications for reinforcement and reinstatement. *Cell Mol Neurobiol* 28:157-72.

- Zhang J, Gross SD, Schroeder MD, Anderson RA (1996) Casein kinase I alpha and alpha L: alternative splicing-generated kinases exhibit different catalytic properties. *Biochemistry* 35:16319-16327.
- Zhang J, Zhang D, Hua Z (2004) FADD and its phosphorylation. *IUBMB Life* 56:395-401.
- Zhang Y, Xiong W, Lin X, Ma X, Yu LC (2009) Receptor trafficking induced by mu-opioid-receptor phosphorylation. *Neurosci Biobehav Rev* 33:1192-1197.
- Zheng H, Loh HH, Law PY (2008) Beta-arrestin-dependent mu-opioid receptor-activated extracellular signal-regulated kinases (ERKs) translocate to nucleus in contrast to G protein-dependent ERK activation. *Mol Pharmacol* 73:178-190.
- Zhu C, Qiu L, Wang X, Hallin U, Candé C, Kroemer G, Hagberg H, Blomgren K (2003) Involvement of apoptosis-inducing factor in neuronal death after hypoxia-ischemia in the neonatal rat brain. *J Neurochem* 86:306-317.
- Zuliani C, Kleber S, Klussmann S, Wenger T, Kenzelmann M, Schreglmann N, Martínez A, del Río JA, Soriano E, Vodrazka P, Kuner R, Groene HJ, Herr I, Krammer PH, Marín-Villalba A (2006) Control of neuronal branching by the death receptor CD95 (Fas/Apo-1). *Cell Death Differ* 13:31-40.

