



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Departamento de Biología Celular, Genética y Fisiología

Tesis Doctoral

Interacción de los receptores dopaminérgicos D₄
y opioides tipo μ en el estriado: implicación en la
fase inicial del consumo de morfina

Belén Gago Calderón

Directora: Dra. Alicia Rivera Ramírez

Málaga, 2007



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Doña Alicia Rivera Ramírez, Doctora en Ciencias Biológicas y Profesora Contratada Doctor del Departamento de Biología Celular, Genética y Fisiología de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Málaga

CERTIFICA

Que Doña Belén Gago Calderón, Licenciada en Biología por la Universidad de Málaga, ha realizado bajo mi dirección el trabajo recogido en la presente Memoria titulada “Interacción de los receptores dopaminérgicos D₄ y opioides tipo μ en el estriado de rata: implicación en la fase inicial del consumo de morfina” para la obtención del Título de Doctor en Biología.

Revisado el trabajo, considero que la presente memoria reúne todo los requisitos necesarios para ser sometida a juicio de la Comisión correspondiente.

Y para que así conste y surta los efectos oportunos, firmo la presente en Málaga a siete de mayo de dos mil siete.

Fdo. Alicia Rivera Ramírez



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Don José Becerra Ratia, Director del Departamento de Biología Celular, Genética y Fisiología de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Málaga

INFORMA

Que Doña Belén Gago Calderón ha realizado en los laboratorios de este departamento el trabajo experimental que ha permitido la elaboración de la presente Memoria de Tesis Doctoral.

Y para que así conste y surta los efectos oportunos, firmo la presente en Málaga a de de dos mil siete.

Fdo. José Becerra Ratia

Desde esta página quisiera expresar mi agradecimiento a todas las personas que han hecho posible que este trabajo haya llegado a su fin, por todo su apoyo, ayuda desinteresada y consejos:

A Alicia Rivera, por ser además de mi directora de tesis, mi amiga y un apoyo en todo momento. No encuentro palabras para agradecerle toda tu ayuda y paciencia.

A Adelaida de la Calle, por abrirme las puertas de su laboratorio y confiar en mí cuando todavía era una estudiante de biología.

A Kjell Fuxe, del Instituto Karolinska de Estocolmo, por acogerme tan amablemente en su laboratorio y darme la oportunidad de aprender tanto de él.

A Zaida Díaz, por su desinteresada e inestimable ayuda para resolver dudas o problemas de cualquier índole. Gracias por escucharme.

A Fernando Rodríguez de Fonseca, por introducirme en el complejo mundo del estudio del comportamiento.

A Manuela Vega y Salvador Salas, del Servicio de Análisis de Imagen de la Universidad de Málaga, por ayudarme y aconsejarme en todo momento y por amenizar las horas de trabajo delante del microscopio y el ordenador.

A Sergio Cañete y Sofía Escalera, del Servicio de Radioisótopos de la Universidad de Málaga, por su desinteresada ayuda, por resolver mis dudas y pequeños problemas a la hora de llevar a cabo los experimentos y por todas las risas y charlas compartidas.

A José Becerra, director del Departamento de Biología Celular, Genética y Fisiología, por brindarme toda su ayuda para realizar este trabajo.

De entre las demás personas que me han rodeado durante estos años, quiero destacar mi especial agradecimiento a varias de ellas:

mis niñas, Sandra, Paula, Susi, Julia, Mj, Ana, Mariajo; “el Clan Carrata” formado por Mónica, Patricia, Javi, Elena, Prude, y las 2 pequeñas incorporaciones, Noah y Aleksander; “el Grupillo”, César, Lillo, María José, Ana, Antonio, Rafa; “las niñas del equipo”, Anita, Pivot, Berta, Lourdes, Raquel, Silvia, Marian, Rosita y Eli; Antoñipi, Begoña y el pequeñajo Moisés; mis valencianos, Natalia, Alicia, Diego y Mayka; Carlitos y Sole; Ana; Ruth Martín; María del Mar; Nacho y “mi sobrinilla” Laura; Patricia, Guillermo y la pequeña Lucia; Ruth y Paco; Luis; José Esteban; Silvia y Luis; Arquero y Eva, David; Inés; Raquel; Mariló; Antonio Peñafiel; Pepi; José Manuel; Ángel; Antonia; Jesús Santamaría; Ana; José Ángel Narváez; Carmen Pedraza; Eva Lindqvist, Stefan Brené, Lars Olson; y de la pequeña colonia española en Estocolmo, Rebeca, Maribel, Sonia y Edgar

A mi familia

A Carlos

Una droga es una sustancia que,
cuando se inyecta en una rata,
produce un artículo científico.

High Times Encyclopaedia of Recreational Drugs,
Egderton Y. Davis

ABREVIATURAS

6-OHDA	6-hidroxidopamina
AC	adenilato ciclasa
Acb	núcleo accumbens
ADHD	<i>attention-deficit/hyperactivity disorder</i> ; trastorno por déficit de atención e hiperactividad
AP-1	<i>activator protein-1</i> ; proteína activadora-1
AMP	<i>adenosine 5'-monophosphate</i> ; adenosina 5'-monofosfato
AMPc	<i>cyclic AMP</i> ; AMP cíclico
ARN	ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
ATF	<i>activating transcription factor</i> ; factor activador de la transcripción
ATP	adenosina 5'-trifosfato
B_{max}	número de sitios de unión
CaMK	<i>Ca²⁺-Calmodulin-dependent protein kinase</i> ; proteína quinasa dependiente de Ca ²⁺ -Calmodulina
CBP	<i>CREB-binding protein</i> ; proteína de unión a CREB
CCK	<i>colecistokinin</i> ; colecistoquinina
cdk	<i>cyclin-dependent kinase</i> ; quinasa dependiente de ciclina
CPu	caudado putamen
CRE	<i>cAMP response element</i> ; elemento de respuesta a AMPc
CREB	<i>cAMP response element binding protein</i> ; proteína de unión al elemento de respuesta a AMPc
CREM	<i>cAMP response element modulator</i> ; modulador del elemento de respuesta a AMPc
DAB	3-3' diaminobencidina
DAG	1,2 diacilglicerol
DARPP-32	<i>dopamine- and cAMP-regulated phosphoprotein of 32kDa</i> ; fosfoproteína de 32 kDa regulada por dopamina y AMPc
DL	dorso-lateral
DM	dorso-medial
DOR	<i>δ opioid receptor</i> , receptor opioide δ
ERK	extracellular signal-regulated kinase; quinasa regulada por señales extracelulares
Fra	<i>Fos-related antigen</i>
GABA	<i>gamma-aminobutyric acid</i> ; ácido gamma-aminobutírico
GFAP	<i>glial fibrillary acidic protein</i> ; proteína ácida fibrilar de la glía
GP	Globo pálido
GRK	<i>G protein-couple receptor kinase</i> ; quinasa de receptores acoplados a proteínas G
HPC	hipocampo
IP3	Inositol 1,4,5-trifosfato
IR	inmunoreactivo
JNK	<i>c-Jun N-terminal kinase</i> ; proteína c-Jun N-terminal
K_D	Constante de disociación
K_i	Constante de afinidad
KOR	<i>κ opioid receptor</i> ; receptor opioide κ
LC	locus coeruleus

LGP	<i>lateral globus pallidus</i> ; globo pálido lateral
LHb	<i>lateral habenular nucleus</i> ; habénula lateral
MAPK	<i>mitogen activated protein kinase</i> ; proteína quinasa activada por mitógenos
MIF	<i>melanocyte inhibiting factor</i> ; factor inhibidor de melanocitos
MGP	<i>medial globus pallidus</i> ; globo pálido medial
MOR	μ <i>opioid receptor</i> ; receptor opioide μ
NPFF	neuropeptide FF; neuropéptido FF
ORL1	<i>orphan opioid-like receptor</i>
PAG	<i>periaqueductal gray</i> ; área gris periacueductal
PDYN	<i>prodynorphin</i> ; prodinorfina
PENK	<i>proenkephalin</i> ; proencefalina
PIP2	fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato
PKA	<i>protein kinase A</i> ; proteína quinasa A
PKC	<i>protein kinase C</i> ; proteína quinasa C
PLC	<i>phospholipase C</i> ; fosfolipasa C
POMC	<i>proopiomelanocortin</i> ; proopiomelancortina
PP-1	<i>protein phosphatase 1</i> ; proteína fosfatasa-1
RSK	<i>MAPK-activated ribosomal S6 kinase</i> ; quinasa S6 ribosomal activada por MAPK
SAPK	<i>stress-activated protein kinase</i> ; proteínas quinasas activadas por estrés
Ser	serina
SN	sustancia negra
SNC	sustancia negra compacta
SNR	sustancia negra reticular
STh	núcleo subtalámico
Tdt	<i>terminal deoxynucleotidyl transferase</i>
TH	tirosina hidroxilasa
Thr	<i>threonine</i> ; treonina
Tu	tubérculo olfatorio
VL	ventro-lateral
VM	ventro-medial
VP	<i>ventral pallidum</i> ; pálido ventral
VTA	<i>ventral tegmental area</i> ; área tegmental ventral

INTRODUCCIÓN	1
1. Morfina: Fármaco para el Tratamiento Paliativo del Dolor y Droga de Abuso	2
2. Estríado: Organización Estructural y Proyecciones Aferentes y Eferentes	3
3. Sistema Opiode Endógeno	6
3.1. <i>Opioides endógenos</i>	6
3.2. <i>Receptores opioides</i>	7
4. Sistema Dopaminérgico	10
4.1. <i>Receptores dopaminérgicos</i>	11
5. Mecanismos Celulares y Moleculares de la Adicción a Opiáceos	15
5.1. <i>Consumo agudo</i>	15
5.2. <i>Consumo crónico y consolidación de la adicción</i>	24
5.3. <i>Abstinencia</i>	27
6. Hipótesis de Trabajo y Objetivos	29
MATERIAL Y MÉTODOS	30
1. Animales de Experimentación	31
2. Tratamientos Farmacológicos y Grupos de Experimentación	31
2.1. <i>Estudio del patrón de expresión de c-Fos, Fos B-ΔFos B y p-CREB después del tratamiento agudo con morfina y/o un agonista de los receptores dopaminérgicos D₄</i>	31
2.1.1. <i>Estudio temporal</i>	32
2.1.2. <i>Especificidad del efecto mediado por el agonista PD168,077</i>	33
2.2. <i>Estudio de los niveles de expresión de encefalina y dinorfina después del tratamiento agudo con morfina y/o un agonista de los receptores dopaminérgicos D₄</i>	34
2.2.1. <i>Estudio temporal del efecto de la administración del agonista PD168,077</i>	34
2.2.2. <i>Estudio temporal del efecto de la administración de la morfina sola o junto con el agonista PD168,077</i>	34
2.3. <i>Estudio de la interacción de los receptores dopaminérgicos D₄ y opioide tipo μ mediante experimentos de unión a ligandos</i>	36
2.3.1. <i>Estudio temporal</i>	36
2.3.2. <i>Estudio de dosis-respuesta</i>	36
2.4. <i>Estudio de la implicación de los receptores dopaminérgicos D₄ en la actividad locomotora inducida por morfina</i>	36
3. Inmunohistoquímica	36
3.1. <i>Procesamiento del tejido</i>	36
3.1.1. <i>Fijación del tejido</i>	36
3.1.2. <i>Crioprotección</i>	38
3.1.3. <i>Congelación de los cerebros y obtención de las secciones</i>	38
3.2. <i>Anticuerpos primarios</i>	38
3.3. <i>Protocolo de la técnica inmunohistoquímica para microscopía óptica</i>	39
3.4. <i>Cuantificación del marcaje inmunohistoquímico</i>	39
4. Hibridación In Situ	40
4.1. <i>Procesamiento del tejido</i>	40
4.2. <i>Marcaje de las sondas</i>	40
4.3. <i>Protocolo de hibridación</i>	41
4.4. <i>Exposición de los films</i>	41

4.5. Cuantificación del marcaje	41
5. Ensayos de Unión a Ligandos	41
5.1. Procesamiento del tejido	41
5.2. Preparación de las membranas celulares	42
5.3. Protocolo de ensayos de unión a ligandos	42
5.4. Filtrado y lectura de la radioactividad	42
5.5. Análisis de datos	42
6. Actividad Locomotora	42
6.1. Campo abierto	42
6.2. Test de actividad locomotora	42
7. Análisis Estadístico	43

RESULTADOS 44

1. Estudio del Patrón de Expresión de c-Fos, Fos B- Δ Fos B y p-CREB en el Caudado Putamen de Rata después del Tratamiento Agudo con Morfina y/o un Agonista de los Receptores Dopaminérgicos D ₄	45
1.1. c-Fos	45
1.2. Fos B- Δ Fos B	65
1.3. p-CREB	74
2. Estudio de los Niveles de Expresión de Encefalina y Dinorfina en el Caudado Putamen de Rata después del Tratamiento Agudo con Morfina y/o un Agonista de los Receptores Dopaminérgicos D ₄	88
2.1. Encefalina	88
2.2. Dinorfina	96
3. Influencia de los Receptores Dopaminérgicos D ₄ en las Características Farmacológicas de los Receptores Opioides tipo μ en el Caudado Putamen de Rata	102
4. Estudio de la Implicación de los Receptores Dopaminérgicos D ₄ en la Hiperactividad Locomotora Inducida por Morfina	105

DISCUSIÓN 108

1. Consideraciones Metodológicas	109
2. Implicación del Caudado Putamen en el Proceso de Drogadicción	111
3. Interacción de los Receptores Opioides tipo μ y los Receptores Dopaminérgicos D ₄ en el Caudado Putamen	112
3.1. Efectos de la activación de los receptores opioides tipo μ	115
3.2. Efectos de la activación de los receptores dopaminérgicos D ₄	119
3.3. Efectos de la activación conjunta de los receptores dopaminérgicos D ₄ y opiodes tipo μ	121
4. Complejidad Estructural del Caudado Putamen	123
5. Interacción de los Receptores Dopaminérgicos D ₄ y Opioides tipo μ en otros Núcleos Cerebrales e Implicación de otros Sistemas de Neurotransmisión	125

6. Actividad Locomotora	131
7. Papel de los Receptores Dopaminérgicos D ₄ en el Desarrollo de la Drogadicción	133
CONCLUSIONES	134
BIBLIOGRAFÍA	136
APÉNDICE	166
MANUSCRITO EN INGLÉS	172
ABBREVIATIONS	174
INTRODUCTION	176
1. Morphine: Analgesic and Drug of Abuse	176
2. Striatum	176
3. Dopaminergic System	177
4. Endogenous Opioid System	178
5. Interaction of Dopaminergic and Opioid Systems	179
AIM OF THIS THESIS	183
MATERIAL AND METHODS	184
1. Animals	184
2. Drugs	184
3. Treatment Groups and Experimental Design	184
3.1. Experiment 1. Effects of PD168,077 and/or morphine on transcription factors expression in rat caudate putamen	184
3.2. Experiment 2. Effects of PD168,077 and/or morphine on dynorphin and enkephalin mRNA levels in rat caudate putamen	185
3.3. Experiment 3. Effects of PD168,077 on the number of binding sites and affinity of MOR in rat caudate putamen	185

3.4. <i>Experiment 4. Dose-dependent effects of PD168,077 on morphine-induced locomotor activity in mice</i>	185
4. Immunohistochemistry	185
4.1. <i>Quantitative analysis</i>	186
5. <i>In Situ Hybridization</i>	186
5.1. <i>Imagen analysis</i>	186
6. Radioligand Binding Experiments	186
6.1. <i>Membrane preparation</i>	187
6.2. <i>Saturation experiments</i>	187
7. Behavioural Studies	187
7.1. <i>Open field apparatus</i>	187
7.2. <i>Locomotor activity assay</i>	187
8. Statistics	187
RESULTS	188
1. Study of c-Fos, Fos B- Δ Fos B and p-CREB Expression Patterns in the Rat Caudate Putamen after Morphine and/or a D ₄ R Agonist Acute Treatment	188
1.1. <i>c-Fos</i>	188
1.2. <i>Fos B-Δfos B</i>	190
1.3. <i>p-CREB</i>	192
2. Study of Dynorphin and Enkephalin mRNA Expression in the Rat Caudate Putamen after Morphine and/or a D ₄ R Agonist Acute Treatment	193
2.1. <i>Enkephalin</i>	193
2.2. <i>Dynorphin</i>	194
3. Effects of PD168,077 in the Number of Binding Sites and Affinity of μ Opioid Receptors in Rat Caudate Putamen	195
4. Dose-dependent Effects of PD168,077 on Morphine-induced Locomotor Activity in Mice	196
DISCUSSION	198
1. Methodological Considerations	198
2. Role of the Caudate Putamen in Drug Addiction	199
3. Interacction of D ₄ and μ Opioid Receptors in the Caudate Putamen	200
3.1. <i>Effects of μ opioid receptors activation</i>	202
3.2. <i>Effects of D₄ receptors activation</i>	204
3.3. <i>Effects of both D₄ and μ opioid receptors activation</i>	205
4. Structural Complexity of the Caudate Putamen	207

5. Dopaminergic D₄ and μ Opioid Receptors Interaction in other Brain Nuclei and the Role of other Neurotransmission Systems	208
6. Locomotor Activity	214
7. Role of D₄ Receptor in Drug Addiction Development	215
CONCLUSIONS	216
REFERENCES	217

Introducción

1. Morfina: Fármaco para el Tratamiento Paliativo del Dolor y Droga de Abuso

La morfina es el principal alcaloide del opio, jugo que se obtiene de las cápsulas de la amapola (*Papaver somniferum*) (Fig. 1). Fue aislada en 1806 por Frederick Sertürner, quien en un primer momento la denominó *principium somniferum opio* por sus virtudes narcóticas. Posteriormente le dio el nombre de *morphium* en honor al mítico dios griego del sueño, Morfeo.



Figura 1. Fotografías de la flor (A) y la cápsula de *Papaver somniferum* (B).

La morfina y otras sustancias opiáceas (codeína, fentanilo, tramadol) se utilizan en el ámbito médico por sus propiedades analgésicas para aliviar dolores de intensidad moderada-alta (Bloodworth, 2005). En concreto se administran a pacientes que sufren cáncer o traumatismos, así como a pacientes terminales. La acción de estas sustancias sobre el sistema nociceptivo es consecuencia de su unión a receptores opioides, principalmente a los receptores tipo μ , distribuidos por el sistema nervioso central y periférico (Vaught *et al.*, 1982).

La administración de morfina produce en el individuo una sensación de bienestar y placidez por la reducción de la sensación de dolor. A pesar de estos efectos positivos, el paciente puede manifestar diversos efectos secundarios, como son náuseas y vómitos, somnolencia, sedación, delirio, prurito, depresión respiratoria, miosis, bradicardia, hipotensión, hipotermia y estreñimiento (Furlan *et al.*, 2006). Debido a estos efectos

negativos y al rápido desarrollo de tolerancia, el uso de estas sustancias opiáceas debe estar bajo un estricto control médico.

Fuera del ámbito sanitario, el consumo de sustancias opiáceas de forma prolongada en el tiempo puede provocar adicción a las mismas, hecho que se refleja en la aparición de cambios biológicos estables en el cerebro (Di Chiara y North, 1992).

Hasta que el individuo desarrolla una dependencia física y/o psíquica a la sustancia opiácea (u otra droga) y se convierte en adicto, se suceden una serie de procesos adaptativos. Actualmente existen tres teorías que tratan de explicar de qué manera y a través de qué mecanismos se consolida el proceso de drogadicción. Estas teorías no son excluyentes entre ellas, ya que se solapan en algunos puntos, y ninguna puede explicar por sí sola todos los aspectos del proceso de la adicción.

Robinson y Berridge (1993, 2000), establecieron la teoría de la sensibilización de los incentivos (*incentive-sensitization*), en la que diferencian dos componentes en las propiedades de recompensa de las drogas: “el disfrute” (*drug liking*), constituido por los efectos placenteros o eufóricos de la droga; y “el deseo” (*drug wanting*), que implica una magnificación de estos efectos. Según esta teoría, el consumo de drogas de abuso provoca cambios a largo plazo en regiones del cerebro involucradas en los procesos de recompensa y motivación. La hipersensibilización a las drogas y a los estímulos asociados al consumo de éstas genera en el individuo un deseo patológico o ansia por la droga, independiente a la presencia de los síntomas adversos que se producen en ausencia de la droga. Por lo tanto, a medida que se va consolidando la adicción, “el disfrute” disminuye progresivamente, pero aumenta “el deseo” por conseguir la droga.

La teoría del desajuste de la homeostasis hedónica (*hedonic homeostatic dysregulation*) expuesta por Koob y Le Moal (Koob, 1992a; Koob *et al.*, 1997; Koob y Le

Moal, 1997, 2001; Piazza *et al.*, 1996) describe el proceso de drogadicción como ciclos de consumo de la droga encadenados formando una espiral (Fig. 2). El consumo de la droga progresa desde un comportamiento impulsivo inicial, en el que el individuo consume la sustancia adictiva por el placer y el bienestar que obtiene (refuerzo positivo), a un comportamiento compulsivo, en el que toma la droga para evitar los efectos adversos que aparecen en su ausencia (refuerzo negativo). La transición entre estos dos estados se refleja en el aumento de amplitud de la espiral, que tiene como consecuencia la desregulación del sistema y la reiteración de los componentes principales de la adicción: la preocupación por conseguir la droga y/o la anticipación de los efectos negativos por ausencia de la sustancia, la intoxicación tras el consumo y la aparición de los síntomas de la abstinencia (Fig. 2).

El desarrollo de la espiral se produce como consecuencia de un proceso de inadaptación en el que se desregulan los sistemas biológicos responsables de la motivación y la recompensa, por lo que el sistema es incapaz de volver al estado emocional de equilibrio original (Fig. 3). Por tanto, el individuo obtiene menos placer y los efectos negativos en ausencia de la droga son mayores.

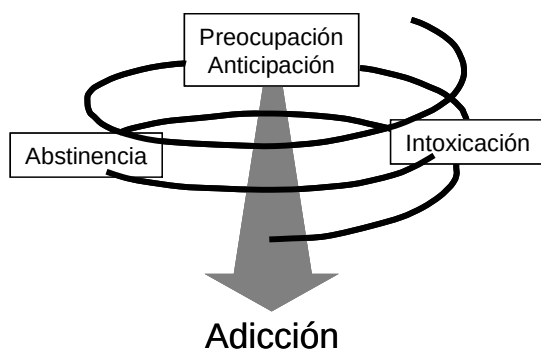


Figura 2. Diagrama en el que se muestra el proceso de drogadicción como una espiral que aumenta de amplitud al repetirse el consumo de la droga y que refleja los componentes principales del ciclo de la adicción: la preocupación por conseguir la droga junto a la anticipación a los efectos negativos, la intoxicación y la abstinencia (modificado de Koob y Le Moal, 1997).

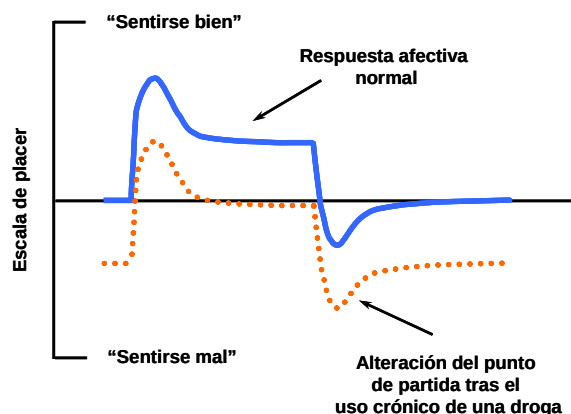


Figura 3. Diagrama representativo de la teoría del desajuste de la homeostasis hedónica (Modificado de Koob y Le Moal, 1997).

Por último, Robbins y Everitt (Everitt y Robbins, 2005; Robbins y Everitt, 2002) proponen que la consolidación de la drogadicción se debe a una transición desde un consumo voluntario hasta un consumo descontrolado que puede llegar a ser compulsivo por un proceso de aprendizaje, generándose cambios neuronales estables en regiones límbicas y regiones relacionadas con la memoria y el comportamiento.

2. Estriado: Organización Estructural y Proyecciones Aferentes y Eferentes

El estriado se considera uno de los principales componentes de los ganglios basales y su interacción con otras regiones cerebrales influye en funciones motoras, cognitivas y emocionales. La organización estructural y funcional de este núcleo es muy compleja, como se describirá a continuación.

En el estriado se puede diferenciar una región dorsal y una región ventral. El estriado dorsal está constituido por el núcleo caudado putamen (CPu) y está implicado principalmente en la regulación de la actividad motora. El estriado ventral está compuesto por el núcleo accumbens (Acb), pálido ventral (VP) y tubérculo olfatorio (Tu) e interviene en el control de funciones límbicas (Gerfen y Wilson, 1996).

El CPu recibe aferencias glutamatérgicas de la corteza, y proyecta eferencias de tipo GABAérgico hacia la sustancia negra reticular (SNR) y el globo pálido medial (MGP). Estas proyecciones de salida siguen dos caminos distintos, constituyendo las vías directa e indirecta. En el caso de la vía directa, las neuronas estriatales inervan directamente a las neuronas de SNR y MGP. Las neuronas de la vía indirecta también proyectan hacia estos dos núcleos pero a través del globo pálido lateral (LGP) y el núcleo subtalámico (STh) (Gerfen y Wilson, 1996) (**Fig. 4**).

El CPu también recibe una innervación dopaminérgica a través de la vía nigroestriatal, en la cual las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra compacta (SNC) principalmente, o del área tegmental ventral (VTA) de forma secundaria, proyectan hacia el estriado dorsal (Fuxe *et al.*, 1985; Gerfen y Wilson, 1996) (**Fig. 4**).

En el estriado existen dos tipos de neuronas que se encuentran distribuidas homogéneamente: las neuronas de proyección y las interneuronas. Las neuronas de proyección son células GABAérgicas segregadas en dos poblaciones en función de sus proyecciones y su contenido en neuropéptidos. Una primera población está formada por las neuronas estriatonigrales, que contienen sustancia P y dinorfina y que originan la vía directa. La segunda población está constituida por las neuronas estriatopálidas, que contienen encefalina y dan lugar a la vía indirecta (Beckstead y Kersey, 1985; Brownstein *et al.*, 1977; Curran y Watson, 1995; Gerfen y Wilson, 1996; Gerfen y Young, 1988; Reiner y Anderson 1990; Vincent *et al.*, 1982).

Las interneuronas coordinan el funcionamiento de las neuronas de proyección. Se han descrito cuatro poblaciones diferentes de interneuronas que

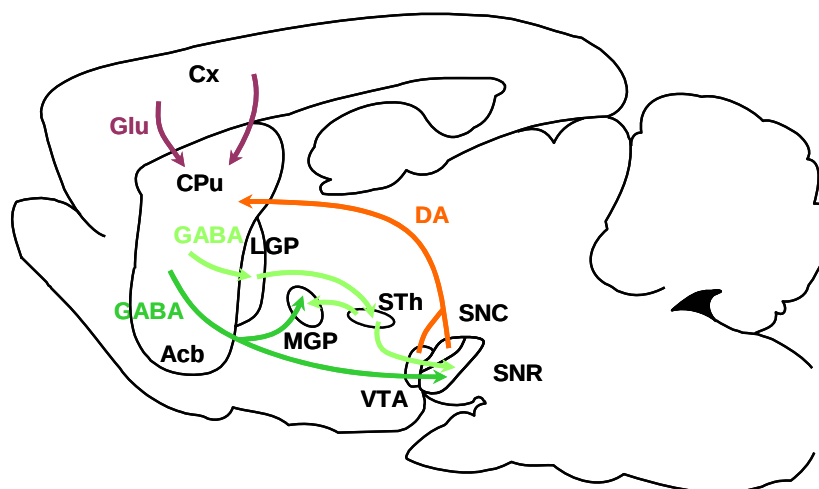


Figura 4. Proyecciones aferentes y eferentes del caudado putamen. Las principales proyecciones aferentes del caudado putamen provienen de la corteza (proyecciones glutamatérgicas; flechas moradas) y de la sustancia negra compacta (proyecciones dopaminérgicas; flecha naranja), formando la vía dopaminérgica nigroestriatal. Las proyecciones eferentes del estriado se dividen en dos vías: las neuronas estriatopálidas proyectan hacia neuronas del globo pálido lateral, y éstas a su vez hacia el globo pálido medial y sustancia negra reticular a través del núcleo subtalámico (vía indirecta; flechas verde claro), mientras que las neuronas estriatonigrales envían sus axones directamente hacia la sustancia negra compacta y el globo pálido medial (vía directa; flechas verde oscuro).

Abreviaturas: Acb, núcleo accumbens; CPu, caudado putamen; DA, dopamina; GABA, ácido γ -aminobutírico; Glu, glutamato; LGP, globo pálido lateral; MGP, globo pálido medial; SNC, sustancia negra compacta; SNR, sustancia negra reticular; STh, núcleo subtalámico; VTA, área tegmental ventral

se diferencian por sus características neuroquímicas. Tres de estas poblaciones neuronales expresan el neurotransmisor GABA, diferenciándose por la expresión de otros marcadores. Así, se ha identificado un grupo de interneuronas GABAérgicas que expresa la proteína ligadora de calcio parvalbúmina, un segundo grupo que expresa los neuropéptidos somatostatina y neuropéptido Y, y finalmente otro grupo que expresa calretinina. La cuarta población de interneuronas está constituida por células colinérgicas (Kawaguchi *et al.*, 1995).

A pesar de existir una homogeneidad en la distribución de las neuronas estriatales se ha establecido una organización de éstas en dos compartimentos, la matriz y los estriosomas, definidos por sus conexiones aferentes y eferentes y por la expresión de determinados marcadores neuroquímicos.

Los estriosomas, que ocupan aproximadamente un 20% del volumen total del estriado, se distribuyen dentro de la matriz formando una estructura laberíntica tridimensional en forma de enrejado de manera que están interconectados entre ellos (Breuer *et al.*, 2005; Desban *et al.*, 1993). Este patrón se ha descrito en roedores (Breuer *et al.*, 2005; Desban *et al.*, 1993), gatos (Desban *et al.*, 1989; Graybiel y Ragsdale, 1978; Groves *et al.*, 1988) monos y humanos (Graybiel y Ragsdale, 1978).

Esta división en dos compartimentos funcionales se debe a la compleja organización de las aferencias corticales hacia el estriado (Brown *et al.*, 1998). Así, existe una organización laminar (Bayer, 1990; Gerfen, 1989, 1992; Kincaid y Wilson, 1996) puesto que las neuronas localizadas en las capas corticales superficiales envían sus axones hacia la matriz, mientras que los estriosomas reciben conexiones de neuronas localizadas en las capas V y VI. Como excepción, las neuronas de la corteza primaria somatosensorial proyectan exclusivamente hacia la matriz (Kincaid y Wilson, 1996). Otro nivel de organización de las proyecciones corticoestriatales está relacionado con la distribución topográfica

de las neuronas de proyección corticales (**Fig. 5**). Así, neuronas de las áreas corticales motoras y somatosensoriales y de la corteza cingular posterior envían sus proyecciones hacia la matriz, mientras que proyecciones que llegan a los estriosomas provienen de las cortezas prelímbica, infralímbica, orbital y cingular anterior (Bayer, 1990; Donoghue y Herkenham, 1986; Wang y Pickel, 1998). Las conexiones corticales también poseen una organización topográfica, ya que las cortezas límbicas y prelímbicas proyectan principalmente hacia la región medial del CPU y las cortezas motoras y sensoriales hacia la región lateral (Cromwell y Berridge, 1996; Divac *et al.*, 1978; Hauber *et al.*, 1994; McGeorge y Faull, 1989). Debido a esto, se ha vinculado a los estriosomas con el sistema límbico y a la matriz con el sistema motor (Gerfen y Wilson, 1996; Prensa *et al.*, 1999), por lo que el estriado constituye una interfase entre los sistemas límbico y motor donde se establecen asociaciones estímulo-respuesta implicadas en el aprendizaje mediante refuerzos. Concretamente, los estriosomas constituirían el punto de integración entre los sistemas de aprendizaje y memoria responsables de la consolidación de hábitos que conllevan al uso compulsivo de drogas (Canales, 2005).

Las proyecciones eferentes del estriado también se organizan siguiendo la organización matriz-estriosomas, ya que las neuronas de la matriz envían sus axones hacia las neuronas GABAérgicas de la SNR mientras que las de los estriosomas proyectan hacia las neuronas dopaminérgicas de la SNC y pequeños grupos de neuronas en la SNR (Gerfen y Wilson, 1996). Complementariamente, las neuronas dopaminérgicas de VTA y SNC también se encuentran segregadas en estos núcleos en función de si proyectan hacia la matriz o hacia los estriosomas (Gerfen *et al.*, 1987; Gerfen y Wilson, 1996). Así, las neuronas localizadas en la región dorso-lateral de la SNC proyectan hacia la matriz del estriado, mientras que las neuronas que se encuentran en la región ventro-medial

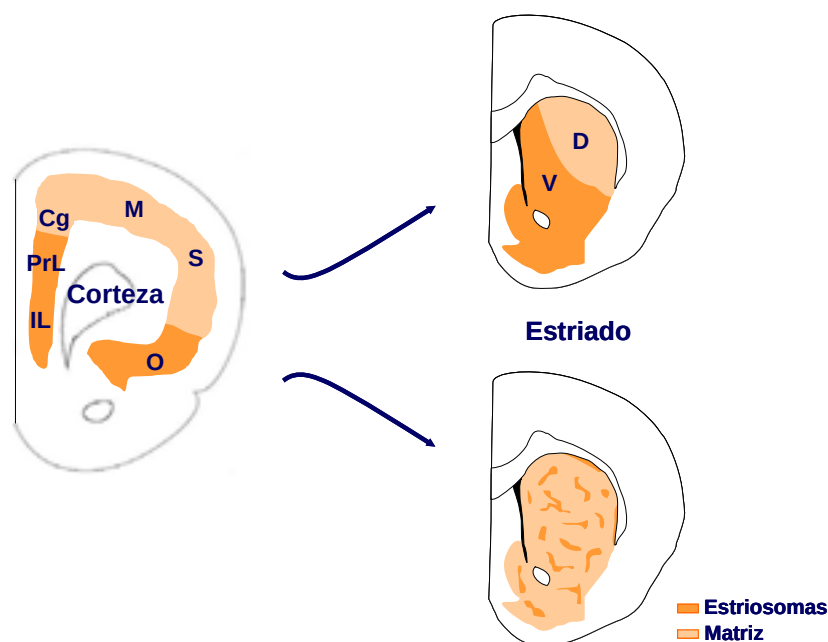


Figura 5. Esquema representativo de la organización topográfica de las conexiones corticoestriatales en el estriado.

Abreviaturas: Cg, corteza cingular; D, dorsal; IL, corteza infralímbica; M, corteza motora; O, corteza orbital; PrL, corteza prefrontal; S, corteza somatosensorial; V, ventral

envían sus axones hacia los estriosomas (Jimenez-Castellanos y Graybiel, 1989). Por tanto, los estriosomas influyen de forma decisiva en la manera en que la dopamina, y por tanto las drogas que modifican la transmisión dopaminérgica, regula las conexiones del estriado.

Mediante técnicas autorradiográficas e inmunohistoquímicas se han diferenciado ambos compartimentos poniendo de manifiesto la expresión diferencial de determinados marcadores neuroquímicos. La expresión de receptores opioides tipo μ es muy abundante en los estriosomas y pobre o nula en la matriz (Arvidsson *et al.*, 1995; Herkenham y Pert, 1981; Pert *et al.*, 1976), mientras que la expresión de la proteína ligadora de calcio calbindina es mayor en la matriz (Kaneko *et al.*, 1995).

3. Sistema Opiode Endógeno

El sistema opioide endógeno está constituido por péptidos y sus receptores que están ampliamente distribuidos por el

sistema nervioso central y periférico de mamíferos. Además de su función antinociceptiva (inhibición de la respuesta ante un estímulo doloroso), participa en la regulación de funciones fisiológicas como la respiración o el estado de vigilia, funciones cardiovasculares y endocrinas, así como la capacidad de afrontar situaciones de estrés (Bodnar y Klein, 2005).

3.1. Opioides endógenos

Los péptidos opioides endógenos se originan a partir de precursores proteicos tras un proceso de maduración enzimática (Rossier, 1988). Así, la proopiomelancortina (POMC) da lugar a las α - y β -endorfinas (Nakanishi *et al.*, 1979); la proencefalina (PENK) es el precursor de las [Met] y [Leu]-encefalinas (Noda *et al.*, 1982); la prodinorfina (PDYN) es fuente de las dinorfinas A y B (Kakidani *et al.*, 1982); y la pronociceptina deriva en nociceptina u orfanina FQ (Meunier, 1997; Reinscheid *et al.*, 1995). Recientemente se han descrito

otros péptidos opioides endógenos, las endomorfina 1 y 2, cuyo precursor no ha sido determinado todavía (Monory *et al.*, 2000; Zadina *et al.*, 1997; Zadina *et al.*, 1999).

El marcaje inmunohistoquímico para dinorfina se localiza principalmente en la corteza, CPu, Acb, hipocampo (HPC), hipotálamo y SN (Weber *et al.*, 1982), mientras que en el caso de encefalina, ésta se expresa en corteza, CPu, Acb, hipotálamo, HPC, amígdala, SN y locus coeruleus (LC) (Finley *et al.*, 1981; McGinty, *et al.*, 1982; Miller y Pickel, 1980; Nylander y Terenius, 1987; Stengaard-Pedersen y Larsson, 1981). Las endorfinas se localizan en áreas cerebrales como son tálamo, hipotálamo, HPC, CPu, Acb y SN (Stengaard-Pedersen y Larsson, 1981). Las endomorfina se han detectado en corteza, CPu, Acb, VP, amígdala, tálamo, VTA y SN (Martin-Schild *et al.*, 1999). Por último, la nociceptina se localiza en corteza, HPC, amígdala, tálamo, VTA, SN y LC (Neal *et al.*, 1999; Nothacker *et al.*, 1996; Schulz *et al.*, 1996).

3.2. Receptores opioides

Existen tres familias principales de receptores opioides: receptores μ (MOR) (Chen *et al.*, 1993; Thompson *et al.*, 1993, Wang *et al.*, 1993), receptores κ (KOR) (Li

et al., 1993; Yasuda *et al.*, 1993) y receptores δ (DOR) (Evans *et al.*, 1992; Kieffer *et al.*, 1992; Yasuda *et al.*, 1993). En la década pasada, se describió una cuarta familia de receptores opioides, los denominados receptores ORL1 (*orphan opioid-like receptors*) (Fukuda *et al.*, 1994; Mollereau *et al.*, 1994; Wick *et al.*, 1994).

Los péptidos opioides endógenos no se unen de forma exclusiva a un solo tipo de receptor, sino que se unen a varios de ellos con distinta afinidad. Como se muestra en la **tabla 1**, la β -endorfina y las endomorfina 1 y 2 son los ligandos principales de los receptores MOR, a los que también se unen con menos afinidad las encefalinas. [Leu]- y [Met]- encefalinas son los ligandos por excelencia de los receptores DOR, aunque éstos también pueden unir β -endorfina. Los receptores KOR unen principalmente dinorfina (Gerrits *et al.*, 2003; Monory *et al.*, 2000; Raynor *et al.*, 1994). La nociceptina es el ligando específico de los receptores ORL1 (Fukuda *et al.*, 1994; Lachowicz *et al.*, 1995; Mollereau *et al.*, 1994; 1995; Reinscheid *et al.*, 1995).

Los receptores opioides pertenecen a la familia de receptores transmembrana acoplados a proteínas G, por lo que presentan 7 dominios transmembrana unidos entre sí mediante lazos proteicos extra e intracelulares (Chen *et al.*, 1993; Kieffer *et al.*, 1992; Li *et al.*, 1993) (**Fig. 6**).

Tabla 1. Ligandos endógenos de los receptores opioides

Tipo de receptor	Ligando endógeno Principal	Ligando endógeno secundario
MOR	β -endorfina endomorfina-1 y-2	[Leu]- y [Met]-encefalina
DOR	[Leu]- y [Met]-encefalina	β -endorfina
KOR	dinorfina	
ORL-1	nociceptina	

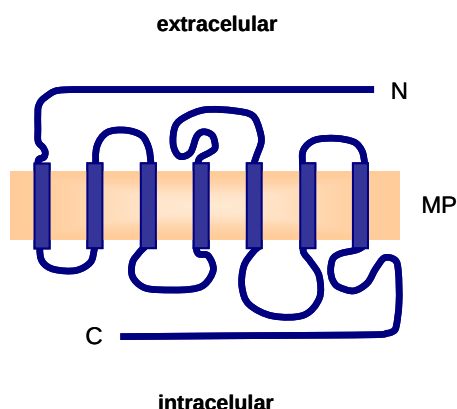


Figura 6. Estructura general de los receptores opioides.

Abreviaturas: C, extremo carboxi-terminal; MP, membrana plasmática; N, extremo amino-terminal

Todos los receptores clonados hasta ahora están acoplados a proteínas $G_{i/o}$ (Aghajanian y Wang, 1986; Kurose *et al.*, 1983), por lo que funcionalmente inhiben la actividad del enzima adenilato ciclasa (AC) y disminuyen así los niveles celulares de AMPc.

La distribución de los distintos tipos de receptores opioides en el sistema nervioso central ha sido descrita mediante técnicas autorradiográficas, inmunohistoquímicas e hibridación *in situ*. Así, los receptores MOR se localizan principalmente en corteza, CPu, Acb, HPC, tálamo, amígdala, VTA, SN, área gris periacueductal (PAG) y LC (**Fig. 7**). La expresión de los receptores DOR se localiza en corteza, Tu, CPu, Acb, HPC y amígdala (**Fig. 7**). Los receptores KOR se expresan con mayor abundancia en Tu, CPu, Acb, tálamo, hipotálamo, amígdala, PAG y LC (**Fig. 7**). Finalmente, el receptor ORL-1 se expresa principalmente en corteza, amígdala, HPC, hipotálamo y LC (Anton *et al.*, 1996; Bunzow *et al.*, 1994; Fukuda *et al.*, 1994; Lachowicz *et al.*, 1995; Meunier, 1997; Mollereau *et al.*, 1994).

Como se puede apreciar, los receptores opioides se distribuyen ampliamente en el sistema nervioso central y se coexpresan en varios núcleos cerebrales (Elde *et al.*, 1995; George *et al.*, 1994; Mansour *et al.*, 1987, 1994a; Tempel *et al.*, 1987).

Receptor opioide μ

Como se ha mencionado anteriormente, los receptores MOR se localizan, entre otras zonas, en regiones relacionadas con las vías dopaminérgicas nigroestriatal y mesolímbica.

Este tipo de receptor opioide presenta, tanto en roedores (Arvidsson *et al.*, 1995; Kaneko *et al.*, 1995; Mansour *et al.*, 1995; Svingos *et al.*, 1996), como en monos (Daunais *et al.*, 2001) y en humanos (Peckys y Landwehrmeyer, 1999), un patrón de distribución en mosaico en el CPu, localizándose principalmente en los estriosomas y en los márgenes dorso-laterales bajo el cuerpo calloso (**Fig. 8**). A lo largo de los eje rostro-caudal y dorso-ventral del CPu se distinguen gradientes de expresión. Tanto en roedores como en primates, los estriosomas que expresan mayores niveles de receptor MOR están localizados en las regiones más rostrales del núcleo. Sin embargo, en roedores MOR se expresa con mayor abundancia en la región dorsal, mientras que en primates esto ocurre en la región ventral.

En cuanto a la localización celular, tanto en el CPu como en el Acb, este receptor se expresa en los dos tipos de neuronas de proyección (Wang *et al.*, 1996), aunque preferentemente en las neuronas estriatonigrales (Guttenberg *et al.*, 1996). Recientemente Jabourian y colaboradores (2005) han demostrado su presencia en interneuronas colinérgicas en los estriosomas.

A nivel subcelular, MOR se localiza fundamentalmente en la membrana plasmática de perfiles dendríticos y espinas dendríticas de neuronas estriatales, aunque también se ha descrito su expresión en axones y en somas en el Acb (Arvidsson *et al.*, 1995; Moriwaki *et al.*, 1996). Las dendritas reciben proyecciones glutamatérgicas de la corteza prefrontal y dopaminérgicas de la sustancia negra (SN), lo que sugiere que los receptores MOR están involucrados en la modulación

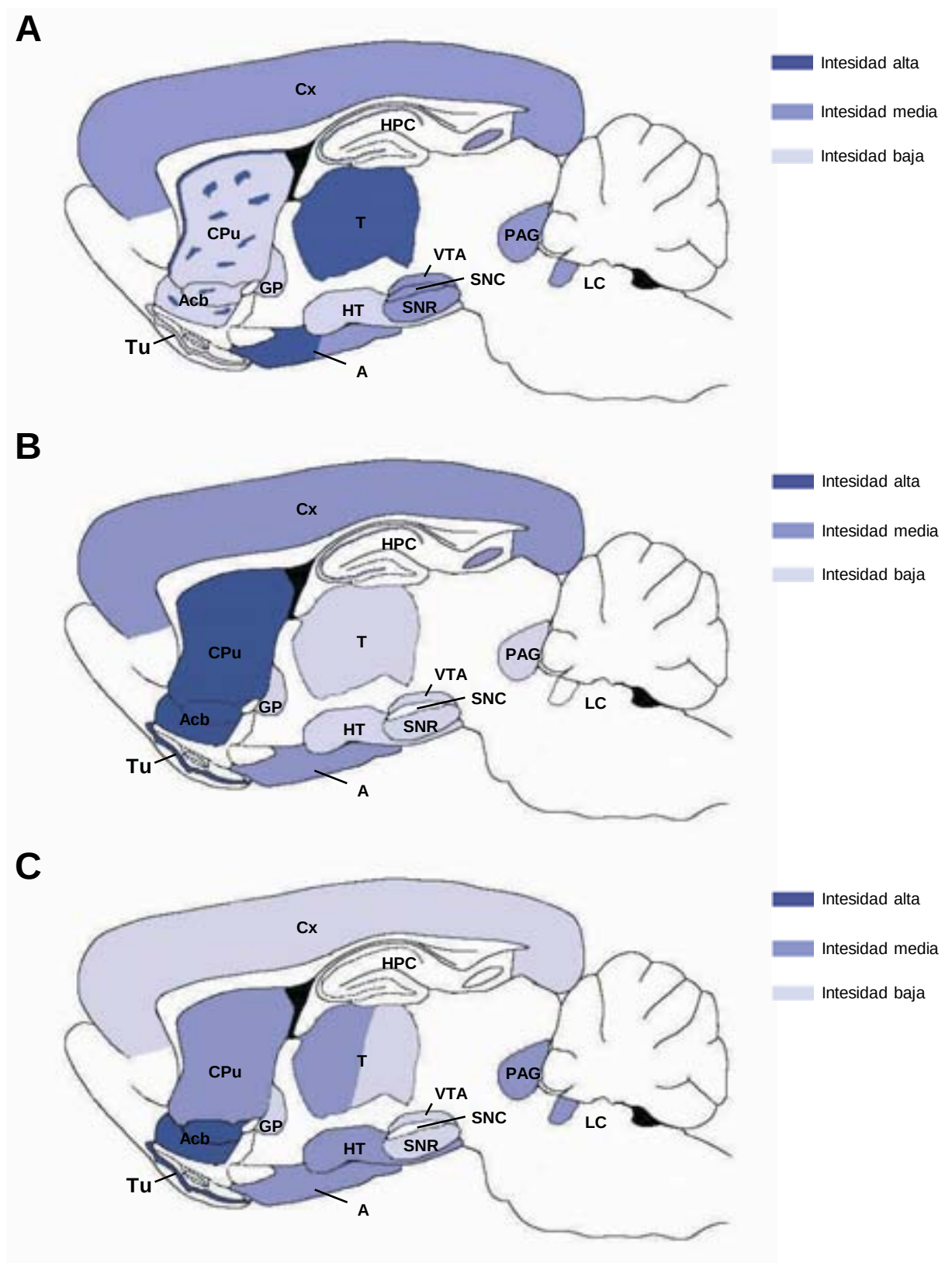


Figura 7. Representación esquemática de la expresión de los receptores opioide μ (A), δ (B) y κ (C) en el sistema nervioso central de rata (modificado de Mansour *et al.*, 1995).

Abreviaturas: A, amígdala; Acb, núcleo accumbens; CPu, caudado putamen; Cx, corteza; GP, globo pálido; HPC, hipocampo; HT, hipotálamo; LC, locus coeruleus; PAG, área gris periacueductal; SNC, sustancia negra compacta; SNR, sustancia negra reticular; T, tálamo; Tu, tubérculo olfatorio; VTA, área tegmental ventral

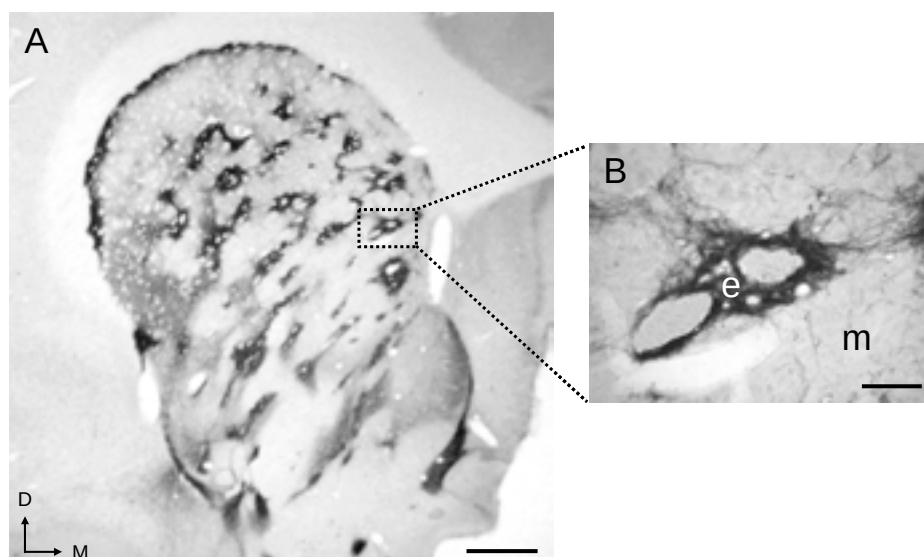


Figura 8. Distribución del receptor opioide tipo μ en el estriado de rata.

A Microfotografía panorámica de una sección coronal de cerebro de rata inmunoteñida con anti-MOR1.

B Detalle de una región correspondiente a un estrioso (e) y la región adyacente de matriz (m).

Barra: A, 1 mm; B, 100 μ m

Abreviaturas: Acb, núcleo accumbens; CPu, caudado putamen; D, dorsal; M, medial

postsináptica de la neurotransmisión corticoestriatal y nigroestriatal y la regulación de la respuesta de las neuronas estriatales ante estos estímulos (Wang y Pickel, 1998).

En la SN, tanto en roedores como en humanos, se ha descrito la localización de este receptor tanto en la región compacta como en la reticular (Mansour *et al.*, 1987, 1995; Peckys y Landwehrmeyer, 1999; Sharif y Hughes, 1989; Tempel y Zukin, 1987), principalmente en varicosidades axónicas y en dendritas. El marcaje inmunohistoquímico es más denso en la SNC que en la SNR (Mansour *et al.*, 1995; Peckys y Landwehrmeyer, 1999).

A los receptores MOR se les ha asignado un papel fundamental en la regulación de la analgesia, en la toma de alimentos y en respuestas a situaciones de estrés emocional (Akil *et al.*, 1984; Han *et al.*, 2006; Matthes *et al.*, 1996; Ribeiro *et al.*, 2005; Vaught *et al.*, 1982; Ward y Simansky, 2006), así como en la aparición de los fenómenos de recompensa por el consumo de morfina y de los síntomas asociados al síndrome de abstinencia a opiáceos (Matthes *et al.*, 1996).

4. Sistema Dopaminérgico

La dopamina es un neurotransmisor que pertenece a la familia de las catecolaminas y está implicada en el control de una gran variedad de funciones, como son la actividad motora, las emociones y motivaciones, la toma de alimentos y la regulación endocrina (Meck, 2006).

En la región mesencefálica del sistema nervioso central se localizan las áreas que sintetizan y liberan dopamina: SN y VTA. Las proyecciones neuronales ascendentes que parten de estas áreas dan lugar a cuatro vías dopaminérgicas principales: vía nigroestriatal, vía mesolímbica, vía mesocortical y vía mesotalámica. Las dos primeras son las de mayor importancia e interés en nuestro estudio (**Fig. 9**).

Las neuronas que constituyen el origen de la vía nigroestriatal envían sus proyecciones desde SNC hacia CPu, Acb y LGP. En la vía mesolímbica, las neuronas dopaminérgicas de VTA proyectan sus axones hacia Acb y Tu. Las neuronas del VTA también envían sus axones hacia corteza, amígdala e HPC formando la vía

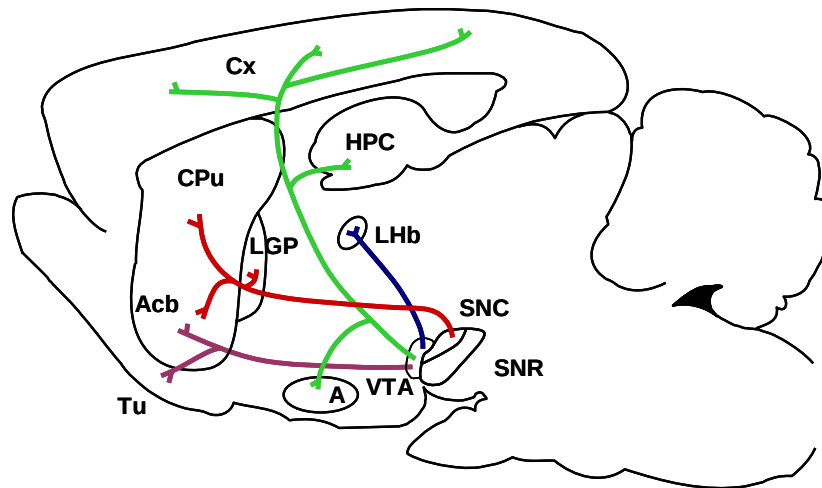


Figura 9. Esquema de una sección sagital de cerebro de rata que muestra las principales vías dopaminérgicas ascendentes: vía nigroestriatal (→), vía mesolímbica (→), vía mesocortical (→), vía mesotalámica (→).

Abreviaturas: A, amígdala; Acb, núcleo accumbens; CPu, caudado putamen; Cx, corteza; HPC, hipocampo; LGP, globo pálido lateral; LHb, habénula lateral; SNC, sustancia negra compacta; SNR, sustancia negra reticular; Tu, tubérculo olfatorio; VTA, área tegmental ventral

mesocortical. La vía mesotalámica está constituida por las proyecciones de neuronas del VTA que llegan a la habénula lateral (LHb), núcleo localizado en el tálamo dorsal (Fuxe *et al.*, 1985) (**Fig. 9**).

4.1. Receptores dopaminérgicos

La dopamina ejerce su acción a través de cinco subtipos de receptores que se clasifican en dos familias atendiendo a sus

características farmacológicas, estructurales y mecanismos de transducción de la señal. La familia de receptores dopaminérgicos D1 incluye a los subtipos D₁ y D₅, y la familia D2 está formada por los subtipos D₂, D₃ y D₄ (Missale *et al.*, 1998; Seeman y Van Tol, 1994).

Todos los receptores dopaminérgicos son receptores acoplados a proteína G (**Fig. 10**) que presentan 7 dominios transmembrana unidos mediante lazos

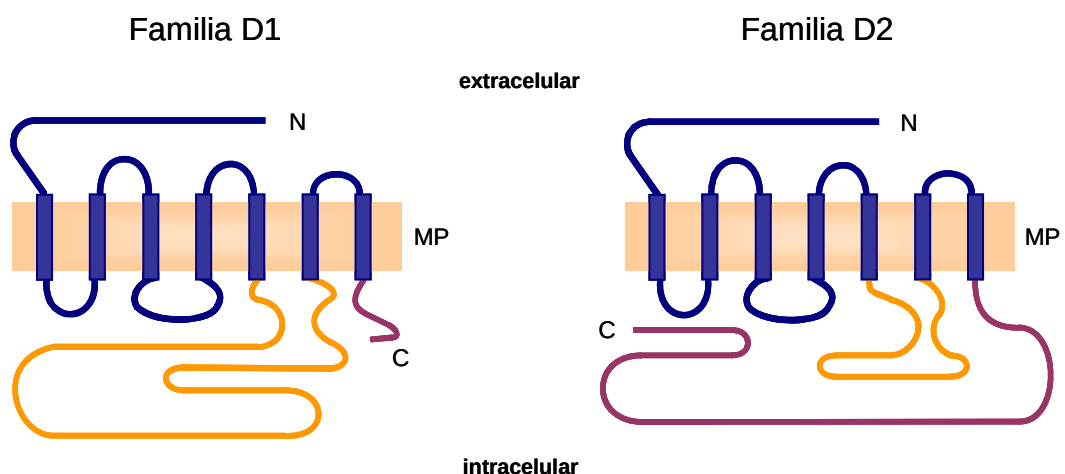


Figura 10. Esquema de la estructura de los receptores dopaminérgicos de las familias D1 y D2. Existen diferencias significativas en el tamaño del extremo C-terminal (color morado) y en el tercer lazo proteico intracelular (color naranja).

Abreviaturas: C, extremo carboxi-terminal; N, extremo amino-terminal; MP, membrana plasmática

Tabla 2. Valores de afinidad de ligandos de los receptores dopaminérgicos

	Valores de K_i (nM)				
	D ₁	D ₅	D ₂	D ₃	D ₄
Antagonistas					
Clozapina	+	+	+	+	++
Haloperidol	+	+	+++	++	+++
L745,870	+/-	+/-	+/-	+/-	++++
Raclopride	-	ND	+++	+++	+/-
SCH23390	++++	++++	+/-	+/-	+/-
Agonistas					
(-)Apomorfina	+	+	+++	++	+++
Dopamina	+++	+++	++	+++	++
PD168,077	ND	ND	+	+	++
Quinpirol	+/-	ND	+++	++	++
SKF38393	+++	+++	+	+/-	+/-

Abreviaturas: K_i , constante de afinidad

Nota: +++++, $K_i < 0.5$ nM; +++, 0.5 nM $< K_i < 5$ nM; ++, 5 nM $< K_i < 50$ nM; +, 50 nM $< K_i < 500$ nM; +/-, 500 nM $< K_i < 5$ μ M; -, $K_i > 5$ μ M; ND, no determinado

Modificado de Missale *et al.*, 1998 y Seeman y Van Tol, 1994

proteicos extra e intracelulares. Entre ambas familias de receptores existen diferencias estructurales que determinan su unión a las proteínas G_s o $G_{i/o}$, entre las que destacan la longitud del tercer lazo proteico intracelular, que es mayor en los receptores de la familia D₁, y la longitud del extremo carboxi-terminal, que es mayor en los subtipos de la familia D₂.

Los distintos subtipos presentan diferencias en su perfil farmacológico ya que tienen distinta afinidad por la dopamina y por diversas sustancias agonistas y antagonistas (**tabla 2**). Los subtipos D₃ y D₄ presentan la afinidad más alta por la dopamina y el receptor D₁ la menor (Missale *et al.*, 1998).

Respecto a los mecanismos de transducción de señales que poseen, los receptores de la familia D₁ son capaces de activar la proteína AC mediante la acción de la proteína G_s , mientras que los receptores de la familia D₂ la inhiben o no tienen ninguna acción sobre ella por su unión a la proteína $G_{i/o}$ (Kebabian y Calne, 1979; Missale *et al.*, 1998).

Los estudios realizados sobre la localización de estos receptores en el sistema nervioso central reflejan una distribución diferencial de cada uno de los subtipos, lo cual sugiere que cada receptor podría estar involucrado en la modulación de distintas funciones (**tabla 3**).

Los subtipos D₁ y D₂ son los receptores que se expresan con mayor abundancia en el estriado, pero también se han detectado en corteza, Tu, HPC, SN y VTA (Aiso *et al.*, 1987; Charuchinda *et al.*, 1987; Dubois *et al.*, 1986; Levey *et al.*, 1993; Weiner *et al.*, 1991; Yung *et al.*, 1995). En el estriado presentan una distribución diferencial, ya que las neuronas de proyección estriatonigrales expresan mayoritariamente el subtipo D₁ y las estriatopallidales el receptor D₂ (Gerfen *et al.*, 1990; Harrison *et al.*, 1990; Meador-Woodruff *et al.*, 1991).

El receptor D₃ se localiza principalmente en áreas mesolímbicas como son Acb, Tu, islas de Calleja, cerebelo e hipotálamo (Bouthenet *et al.*, 1991; Diaz *et al.*, 1995; Khan *et al.*, 1998).

Tabla 3. Distribución de los receptores dopaminérgicos en el sistema nervioso central de rata

	Receptores dopaminérgicos				
	D ₁	D ₂	D ₃	D ₄	D ₅
Corteza	++	+	+/-	+++	+++
Caudado putamen	+++	+++	+/-	++	+
Núcleo accumbens	++	+++	+++	+/-	+
Tubérculo olfatorio	+++	++	+++	+/-	+
Islas de Calleja	+	++	+++	-	+
Globo pálido	+	+	+/-	+	+
Tálamo	+	+	+/-	+/-	++
Hipotálamo	+	+	++	+/-	+
Hipocampo	++	+	+	+++	+++
Amígdala	+	+	+/-	++	+
Sustancia negra	+++	++	+	+	+
Área tegemental ventral	++	+	+	-	+/-
Cerebelo	+	+	++	+/-	+

Nota: +++, densidad alta; ++, densidad moderada; +, densidad baja; +/-, densidad muy baja

El receptor dopaminérgico D₄ se expresa con abundancia en la corteza, HPC y amígdala (Ariano *et al.*, 1997a; Berger *et al.*, 2001; Defagot *et al.*, 1997a,b, 2000; Wedzony *et al.*, 2000), y también en el estriado (Khan *et al.*, 1998; Rivera *et al.*, 2002a).

El subtipo D₅ se localiza principalmente en corteza, tálamo e HPC (Ariano *et al.*, 1997b; Ciliax *et al.*, 2000; Khan *et al.*, 2000; Rivera *et al.*, 2002b).

Receptor dopaminérgico D₄

La expresión del receptor D₄ en el estriado ha sido motivo de controversia en la última década debido a la falta de coincidencia en la detección de su ARN mensajero (ARNm) y de la proteína, ya que

los niveles de expresión del ARNm son muy bajos (Matsumoto *et al.*, 1995, 1996; Meador-Woodruff *et al.*, 1997; Suzuki *et al.*, 1995) mientras que la proteína es abundante (Ariano *et al.*, 1997a; Berger *et al.*, 2001; Defagot *et al.*, 1997a,b, 2000; Lanau *et al.*, 1997; Mauger *et al.*, 1998; Tarazi *et al.*, 1997, 1998). El desarrollo de un anticuerpo específico para este receptor en nuestro laboratorio (Khan *et al.*, 1998) ha permitido demostrar que el receptor D₄ presenta en el estriado una distribución heterogénea, en oposición a la distribución homogénea descrita por otros autores (Ariano *et al.*, 1997a; Defagot *et al.*, 1997b), siendo su expresión más abundante en el compartimento estriosomal que en la matriz y en los niveles caudales del núcleo que en los rostrales (Rivera *et al.*, 2002a) (**Fig. 11**).

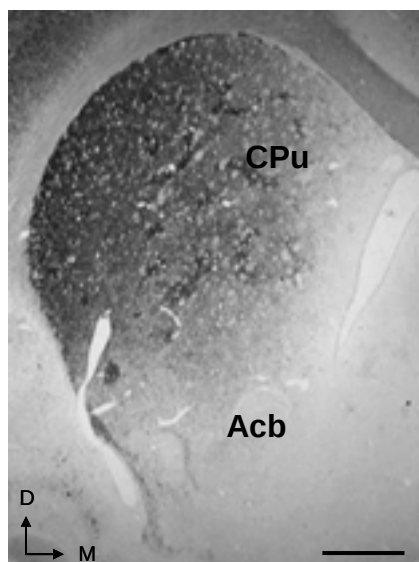


Figura 11. Microfotografía panorámica de una sección coronal de cerebro de rata inmunoteñida con anti-D₄ que muestra la distribución de este receptor dopaminérgico en el estriado (modificado de Rivera *et al.*, 2002a).

Barra: 1 mm

Abreviaturas: Acb, núcleo accumbens; CPu, caudado putamen; D, dorsal; M, medial

En el CPu, este receptor se localiza principalmente en somas, dendritas y espinas dendríticas de neuronas de proyección estriatopalidales y estriatonigrales, pero no en interneuronas, aunque también se localizó en axones y terminales axónicos (Rivera *et al.*, 2003). Svingos y colaboradores (2000) describieron que en la región del *shell* del Acb el receptor D₄ se expresa principalmente en axones y terminales axónicos, aunque también, pero en menor medida, en dendritas y espinas dendríticas. Se ha sugerido que estos axones y terminales axónicos D₄ positivos pertenecen a terminales aferentes excitatorios de neuronas glutamatérgicas corticales (Berger *et al.*, 2001; Tarazi *et al.*, 1998).

En la SN, se ha descrito que este subtipo de receptor dopaminérgico se expresa tanto en la SNC como en la SNR (Defagot *et al.*, 1997a,b; Rivera *et al.*, 2003, Mrzljak *et al.*, 1996). En la SNR los receptores D₄ se localizan en terminales axónicos de neuronas GABAérgicas que provienen del CPu (Rivera *et al.*, 2003, Mrzljak *et al.*, 1996), mientras que en la SNC se expresan en somas, aunque aún no se ha

determinado a qué tipo neuronal pertenecen (Defagot *et al.*, 1997b).

Aunque en los últimos años han aparecido nuevos agonistas y antagonistas específicos para el receptor D₄, las funciones neuronales mediadas por estos receptores permanecen aún sin determinar. A pesar de esto, diversos trabajos han implicado a estos receptores dopaminérgicos en la generación de diversos desórdenes y enfermedades como el trastorno por déficit de atención e hiperactividad (ADHD; *attention-deficit/hyperactivity disorder*) (Avale *et al.*, 2004; Biederman y Spencer, 1999; Tarazi *et al.*, 2004), así como en el desarrollo de la adicción a distintas sustancias de abuso (Rubinstein *et al.*, 1997), entre ellas los opiáceos (Kotler *et al.*, 1997).

También se ha sugerido que este receptor juega un papel importante en la aparición de comportamientos exploratorios en situaciones de novedad (*novelty seeking*) y en procesos cognitivos como la memoria a muy corto plazo (*working memory*) (Dulawa *et al.*, 1999; Ebstein *et al.*, 1996, 2000; Falzone *et al.*, 2002; Oak *et al.*, 2000; Powell *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2004).

5. Mecanismos Celulares y Moleculares de la Adicción a Opiáceos

Las drogas de abuso presentan una gran diversidad química y ejercen su acción sobre dianas distintas, ya sean receptores o transportadores de neurotransmisores, causando variadas combinaciones de efectos fisiológicos y comportamentales que contribuyen al desarrollo de la dependencia. Las sustancias opiáceas (morfina, heroína y codeína entre otras) tienen como diana los receptores opioides. En concreto, se ha descrito que los receptores MOR median los efectos analgésicos y de sedación de la morfina, además de estar involucrados en los efectos de refuerzo de esta droga (Matthes *et al.*, 1996; Negus *et al.*, 1993).

El tiempo de exposición a estas sustancias es un factor que también influye en la magnitud de los efectos que se producen en el individuo. Así, el consumo agudo o puntual genera cambios celulares y moleculares distintos a los que se observan tras un consumo prolongado.

5.1. Consumo agudo

A pesar de que las dianas sobre las que actúan las drogas de abuso son diferentes, todas ellas convergen en un mecanismo de acción común, la activación de la vía dopaminérgica mesolímbica que implica un aumento en la liberación de dopamina en el Acb (Pierce y Kumaresan, 2006).

La vía mesolímbica ha sido denominada circuito de recompensa del sistema límbico, y actúa como centro cerebral del placer y de la gratificación. Acciones vitales como comer, beber y la actividad sexual actúan como estímulos naturales capaces de activar este circuito. El placer que se obtiene al llevarlas a cabo actúa como refuerzo positivo que incita a repetirlas y determina que estas acciones se consoliden como hábitos.

Los distintos tipos de drogas no activan la vía mesolímbica a través del mismo mecanismo (Pierce y Kumaresan, 2006). En el caso de la morfina (**Fig. 12**), el circuito de recompensa se activa por la unión de esta droga a los receptores MOR localizados en

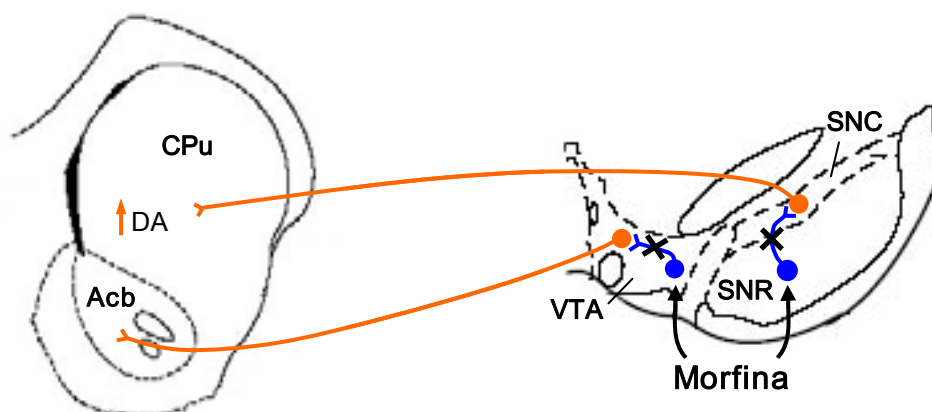


Figura 12. Mecanismo de acción de la morfina. La unión de morfina a los receptores opioides tipo μ localizados en neuronas GABAérgicas (●) de sustancia negra reticular y área tegmental ventral desinhiban a las neuronas dopaminérgicas (●) que se encuentran en la sustancia negra compacta y en el área tegmental ventral respectivamente. Como consecuencia, se activan las vías nigroestriatal y mesolímbica y aumenta la liberación de dopamina en el caudado putamen y núcleo accumbens. Abreviaturas: Acb, núcleo accumbens; CPu, caudado putamen; DA, dopamina; SNC, sustancia negra compacta; SNR, sustancia negra reticular; VTA, área tegmental ventral

interneuronas GABAérgicas del VTA. Esto provoca la inhibición del bloqueo que ejercen estas neuronas sobre las células dopaminérgicas adyacentes, y como consecuencia aumenta su tasa de disparo y la liberación de dopamina en el Acb (Bontempi y Sharp, 1997; Devine *et al.*, 1993; Di Chiara e Imperato, 1988a,b; Di Chiara y North, 1992; Johnson y North, 1992; Leone *et al.*, 1991; Matthews y German, 1984; Pothos *et al.*, 1991; Rada *et al.*, 1991; Spanagel *et al.*, 1992). Por un mecanismo similar, la unión de morfina a los receptores MOR localizados en neuronas GABAérgicas en la SNR provoca la inhibición de éstas neuronas, por lo que las neuronas dopaminérgicas en la SNC quedan desinhibidas. Como consecuencia, la vía nigroestriatal es activada y aumenta la liberación de dopamina en el CPU (Bontempi y Sharp, 1997; Di Chiara e Imperato, 1988a; Lacey *et al.*, 1989) (**Fig. 12**). El aumento de la tasa de disparo de las neuronas dopaminérgicas es mayor en la vía mesolímbica que en la vía nigroestriatal (Airavaara *et al.*, 2006; Matthews y German, 1984), por lo que la liberación de dopamina también es mayor en el Acb que en el CPU (Di chiara e Imperato, 1986, 1988b; Leone *et al.*, 1991).

Estudios recientes han demostrado que, además de los núcleos involucrados en estas dos vías dopaminérgicas, existen otras áreas cerebrales (amígdala, HPC, hipotálamo y regiones corticales) implicadas en los efectos de recompensa agudos. Algunas de estas áreas pertenecen a los sistemas de memoria, lo que sugiere que en el desarrollo de la adicción están involucrados procesos de memoria emocional y asociativa (Cardinal *et al.*, 2004; Cardinal y Everitt, 2004; Everitt *et al.*, 1999).

El consumo agudo de una sustancia adictiva produce efectos a nivel celular y molecular en el estriado y en otras regiones cerebrales implicadas como veremos a continuación.

Factores de transcripción

La unión de las sustancias opiáceas a los receptores opioides provoca la activación de mecanismos de transducción de señales a través de complejos sistemas de mensajeros intracelulares, provocando finalmente cambios en los niveles de expresión de multitud de genes. Los mecanismos moleculares precisos que se producen no se conocen pero se ha demostrado que la expresión de genes que codifican para factores de transcripción se ve alterada por acción de éstas sustancias. La activación de estos genes ocurre muy rápidamente, minutos-horas después del consumo, y regularán la expresión de los genes de expresión tardía, cuya expresión se ve inducida o bloqueada tras varias horas. Los cambios en la expresión de estos genes es distinta en el consumo agudo inicial que tras un consumo prolongado y crónico, lo que sugiere que en cada caso predominarán diferentes mecanismos de regulación.

Se han identificado dos familias de factores de transcripción que ejercen un papel importante en el proceso de consolidación de la drogadicción: la familia Fos y la familia CREB.

La familia Fos

La familia Fos está constituida por las proteínas c-Fos, Fos B, Δ Fos B, Fra-1 y -2 (*Fos-related antigen*) (Cohen y Curran, 1988; Greenberg y Ziff, 1984; Mumberg *et al.*, 1991; Nishina *et al.*, 1990; Zerial *et al.*, 1989)

El gen fosB codifica para la proteína Fos B y su isoforma Δ Fos B, producto de un proceso de maduración por corte y empalme (*splicing*). Δ Fos B a su vez da lugar a 3 proteínas de distinto peso molecular. Así, la expresión de la proteína de 33 kDa se induce en el estriado tras estímulos agudos, mientras que los niveles de expresión en las neuronas de las proteínas de 35 y 37 kDa

(denominadas Fra-1 y Fra-2 respectivamente) aumentan tras estímulos crónicos (Chen *et al.*, 1997; Hiroi *et al.*, 1997).

La unión de las proteínas de la familia Fos con las de la familia Jun (c-Jun, Jun B y Jun D) (Ryder *et al.*, 1988) da lugar a heterodímeros denominados complejos AP-1 (*activator protein-1*) (Busch y Sassone-Corsi, 1990). Estos complejos actúan por sí mismos como factores de transcripción (Morgan y Curran, 1991; Sheng y Greenberg, 1990) al unirse a los sitios AP-1 localizados en la secuencia promotor de multitud de genes. Dependiendo de los elementos que formen el complejo, éste tendrá distinta afinidad por la secuencia AP-1 (Hai y Curran, 1991; Kovary y Bravo, 1991; Ryseck y Bravo, 1991) y además actuará como regulador positivo o negativo (Bohmann *et al.*, 1987; Chiu *et al.*, 1988; Nakabeppu y Nathans, 1991; Schonthal *et al.*, 1989; Schutte *et al.*, 1989), lo que indica que la regulación que ejercen sobre la expresión de otros genes es un proceso de gran complejidad. Además, estos complejos pueden ser modificados post-transduccionalmente mediante un proceso de fosforilación, lo que puede alterar la funcionalidad del complejo (Barber y Verma, 1987; Binetruy *et al.*, 1991; Boyle *et al.*, 1991; Lamph *et al.*, 1990).

Hope y colaboradores (1994) establecieron un esquema general del patrón de expresión de estos genes en el estriado a lo largo del tiempo tras la exposición aguda a drogas de abuso. Como se puede observar en la **figura 13**, la administración aguda de una droga produce una inducción de c-Fos rápida y transitoria, cuya expresión máxima ocurre a las dos horas. Entre las 4 y 6 horas se observa un incremento de la expresión de los denominados factores FRA agudos (Fos B y Δ Fos B (33kD)) que también poseen una vida-media corta. Su expresión vuelve al estado basal tras 12 horas del estímulo.

La inducción de la expresión de Fra-1 y Fra-2 tras un estímulo agudo es muy baja

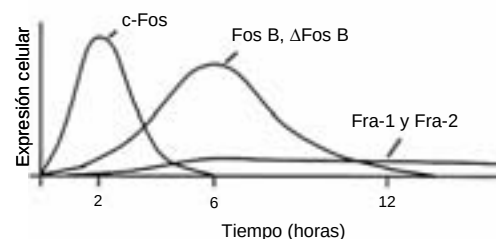


Figura 13. Esquema del patrón de inducción de factores de transcripción por estímulos agudos en el estriado (modificado de Hope *et al.*, 1994).

por lo que los complejos AP-1 que forman en la célula no contribuirán a la regulación transcripcional en este caso.

Está ampliamente descrito en la literatura que la administración aguda de morfina induce la expresión de c-Fos en el CPu, principalmente en la región dorso-medial aunque también, pero en menor medida, en la región ventro-lateral (Chang *et al.*, 1988; Curran *et al.*, 1996; Garcia *et al.*, 1995; Gutstein *et al.*, 1998; Liu *et al.*, 1994; Sharp *et al.*, 1995). Esta inducción se produce en las neuronas de proyección y sólo en escasas interneuronas (Garcia *et al.*, 2003). Existen evidencias que indican que este aumento de expresión ocurre en concreto en las neuronas estriatonigrales del CPu y Acb, aunque es necesario ampliar la experimentación para determinar este hecho con exactitud (Liu *et al.*, 1994; Ferguson *et al.*, 2004).

Respecto a Fos B y Δ Fos B, existen numerosos trabajos sobre el efecto de la administración aguda de cocaína en su expresión, pero no de los cambios que puedan causar los opiáceos. Recientemente Muller y Untewarld (2005) han descrito que tras una única inyección de morfina no se observan cambios en la expresión de estos factores de transcripción en el estriado.

La familia CREB

La familia CREB está constituida por las proteínas CREBs (*cAMP response element binding proteins*), ATFs (*activating transcription factors*) y CREMs (*cAMP-*

response element modulators) (Lonze y Ginty, 2002).

Estas proteínas pueden unirse entre ellas para formar homo- y heterodímeros, actuando como un único factor de transcripción al unirse a la secuencia CRE (*cAMP response element*) presente en el promotor de gran variedad de genes (De Cesare *et al.*, 1999; Montminy, 1997; Shaywitz y Greenberg, 1999).

La expresión celular de CREB es inducida en respuesta a multitud de estímulos fisiológicos, ya que actúa como punto convergente de varias vías de señalización intracelular (Bilecki, 2000).

Para que CREB obtenga una conformación activa, y así regular la transcripción de los genes diana, es necesaria su fosforilación mediante quinasas. La proteína CREB presenta varios sitios de fosforilación que regulan su actividad de manera diferencial (**Fig. 14**). Así, la quinasa dependiente de Ca^{2+} /Calmodulina II (CaMKII; *Ca²⁺-Calmodulin-dependent protein kinase*) fosforila a la proteína en el residuo serina 142 (Ser-142), promoviendo la disociación del dímero de CREB y reduciendo así la transcripción de genes mediada por este factor de transcripción (Matthews *et al.*, 1994; Wu y McMurray, 2001). Sin embargo, la proteína quinasa A (PKA), la CaMKIV y las RSKs (quinasas S6 ribosomal activadas por MAPK, *MAPK-activated ribosomal S6 kinases*; MAPK, quinasa activada por mitógenos, *mitogen activated protein kinases*), fosforilan CREB en el residuo Ser-133, lo que estimula la atracción de CBP (*CREB-binding protein*), proteína necesaria para formar el complejo que ayuda al inicio de la transcripción (Gonzalez y Montminy, 1989; Zanassi *et al.*, 2001).

Varios autores sugieren que los cambios en la expresión de genes dependientes de CREB podrían jugar un papel en la plasticidad sináptica asociada al aprendizaje y a la memoria a largo plazo relacionada con el proceso de drogadicción a opiáceos (Berke y Hyman, 2000; Lonze y Ginty, 2002;

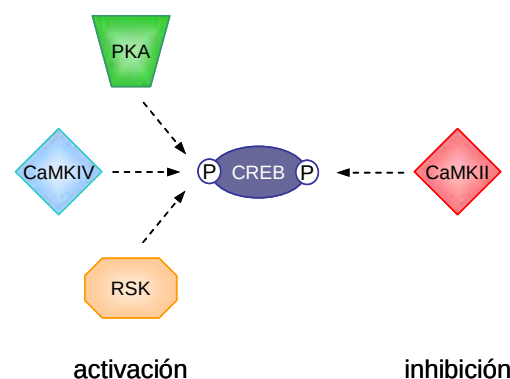


Figura 14. Proteínas quinasas responsables de la fosforilación de CREB.

Abreviaturas: P, molécula de fósforo

Martin y Kandel, 1996; Nestler *et al.*, 1993a; Yin y Tully, 1996).

Los estudios sobre el efecto de la exposición aguda a morfina sobre CREB se han centrado en el LC y el Acb (Blendy y Maldonado, 1998; Hyman y Malenka, 2001; Koob *et al.*, 1992; Nestler, 2004b). Así, Guitart y colaboradores (1992) describieron que en el LC se produce un descenso en los niveles de CREB fosforilado (p-CREB) y Widnell y colaboradores (1996) observaron que el tratamiento agudo con morfina no provocaba cambios en los niveles totales de CREB en el Acb.

Mecanismos de transducción de señal

La unión de ligandos a los receptores celulares implica la activación o la inhibición de diversas vías de transducción de señales hacia el interior celular, entre las que podemos destacar la vía AMPc/PKA (Childers, 1991; Loh y Smith, 1990), la cascada de señales que provoca la proteína quinasa C (PKC) (Harlan *et al.*, 2004) y la vía de las proteínas quinasas MAPKs (Fukuda *et al.*, 1996; Li y Chang, 1996).

La activación de los receptores MOR por morfina provoca una serie de cambios en estas vías de transducción como veremos a continuación.

Como ya mencionamos anteriormente, los receptores MOR, así como los KOR y DOR, están acoplados a la proteína $G_{i/o}$ por

lo que su activación provoca la inhibición de la AC (Beitner *et al.*, 1989; Childers, 1991; Duman *et al.*, 1988; Law *et al.*, 2000) y de la cascada de señalización del AMPc (Liu y Anand, 2001) (**Fig. 15**). Debido a la disminución de los niveles celulares de AMPc, las proteínas cuya actividad es dependiente de éste, como la PKA, ven disminuida su actividad. La consecuencia final es el descenso de la fosforilación de gran variedad de proteínas entre las que destaca CREB (Guitart y Nestler, 1989; Nestler, 1992).

La unión a la proteína $G_{i/o}$ también provoca un incremento de la conductancia de los canales del ión K^+ , mientras que la inhibe para el ión Na^+ . Estos cambios afectan a la capacidad de excitación de las neuronas donde se encuentran los receptores y provocan su hiperpolarización continua, alterando la respuesta neuronal (Childers, 1991; Nestler 2004a,b) (**Fig. 15**).

Por otro lado, la unión de morfina a los receptores opioides provoca un incremento de los niveles de iones Ca^{2+} intracelulares al aumentar su liberación desde los depósitos intracelulares (**Fig. 16**): las subunidades β/γ de la proteína G activan a la fosfolipasa C (PLC) que hidroliza el fosfolípido fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PIP2) para formar 1,2-diacylglicerol (DAG) e inositol-1,4,5-trisfosfato (IP3), el cual media la liberación de Ca^{2+} tras su unión a receptores IP3 localizados en la membrana de los reservorios intracelulares (Berridge, 1997; Connor y Henderson, 1996; Elliott, 2001; Jin *et al.*, 1994). Estos cambios traen consigo variaciones en la actividad de proteínas dependientes de calcio como las CaMKs.

Contrariamente al efecto sobre la PKA, la administración aguda de morfina provoca un aumento en la actividad de la PKC, que contribuirá a la fosforilación de las proteínas ERK1 y ERK2 entre otras (Bilecki *et al.*, 2005; Chen y Huang, 1991; Ueda *et al.*, 1995). Este incremento está mediado por DAG y el ión Ca^{2+} (Okajima *et al.*, 1993; Smart *et al.*, 1997) (**Fig. 16**).

Desde hace escasos años, la vía de las MAPKs ha sido involucrada en los efectos

mediados por las sustancias opiáceas (Law *et al.*, 2000; Liu y Anand, 2001; Williams *et al.*, 2001). La vía de las MAPKs constituye un mecanismo de señalización clave que regula varios aspectos de las funciones celulares como son el crecimiento celular, la diferenciación y la apoptosis (Cobb, 1999; Grewal *et al.*, 1999; Sweatt, 2001).

Existen tres subfamilias principales de quinasas MAPKs: ERKs (*extracellular signal-regulated kinases*); JNKs o SAPKs (JNK, *c-Jun N-terminal kinase*; SAPK, *stress-activated protein kinase*); y p-38 MAPKs (Chang y Karin, 2001; Johnson y Lapadat, 2002; Tibbles y Woodgett, 1999).

La vía de las ERKs es actualmente la vía mejor caracterizada (**Fig. 17**). El primer componente de esta vía de señalización es la proteína Raf-1 (una serina/treonina quinasa, MAPKKK), que integra la señal extracelular captada por el receptor Ras (una proteína G pequeña) hacia el interior celular. Raf-1 activa una cascada de quinasas citosólicas al fosforilar y activar a la quinasa MEK (MAPKK), que a su vez fosforila y activa a ERK1 y ERK2 (p44 y p42 MAPK). Estas últimas quinasas regulan la actividad de varias proteínas citoplasmáticas (cdk5, proteínas del citoesqueleto, etc) y nucleares (factores de transcripción), alterando finalmente la expresión génica (Pearson *et al.*, 2001; Pouyssegur y Lenormand, 2003).

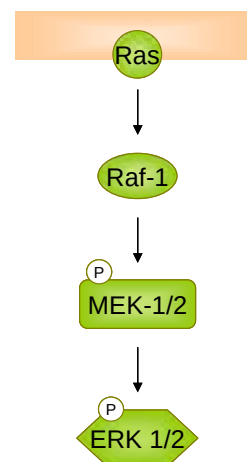


Figura 17. Elementos que forman la vía de las ERKs de señalización intracelular.

Abreviaturas: P, molécula de fósforo

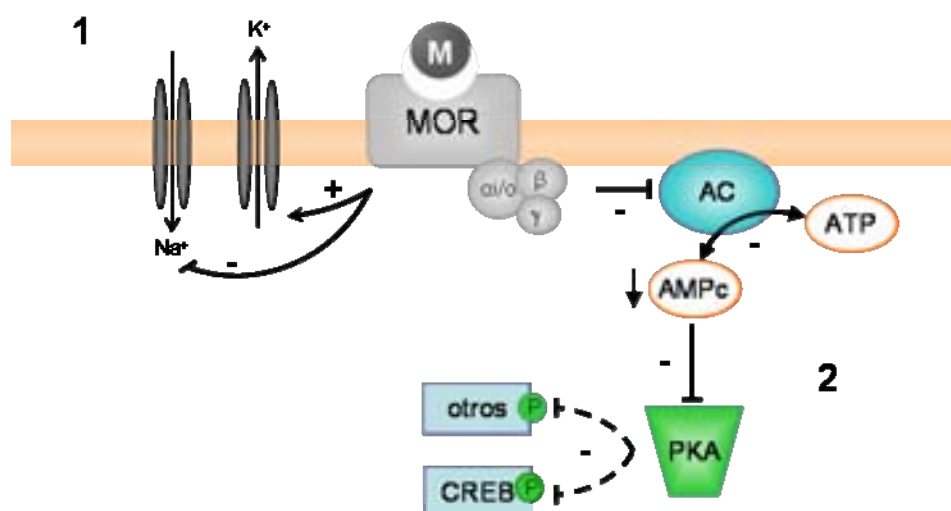


Figura 15. Efectos del tratamiento agudo con morfina en neuronas del locus coeruleus. La unión de morfina al receptor opioide tipo μ provoca (1) variaciones en la conductancia de iones, incrementando la del K^+ e inhibiendo la del Na^+ , e (2) inhibe la actividad de la adenilato ciclasa, por lo que se reducen los niveles de AMPc, alterando la actividad de enzimas como la PKA.

Abreviaturas y símbolos: -, bloqueo; +, activación; AC, adenilato ciclasa; ATP, adenosina 5'-trifosfato; AMPc, AMP cíclico; CREB, proteína de unión al elemento de respuesta a AMPc; M, morfina; MOR, receptor opioide tipo μ ; PKA, proteína quinasa A

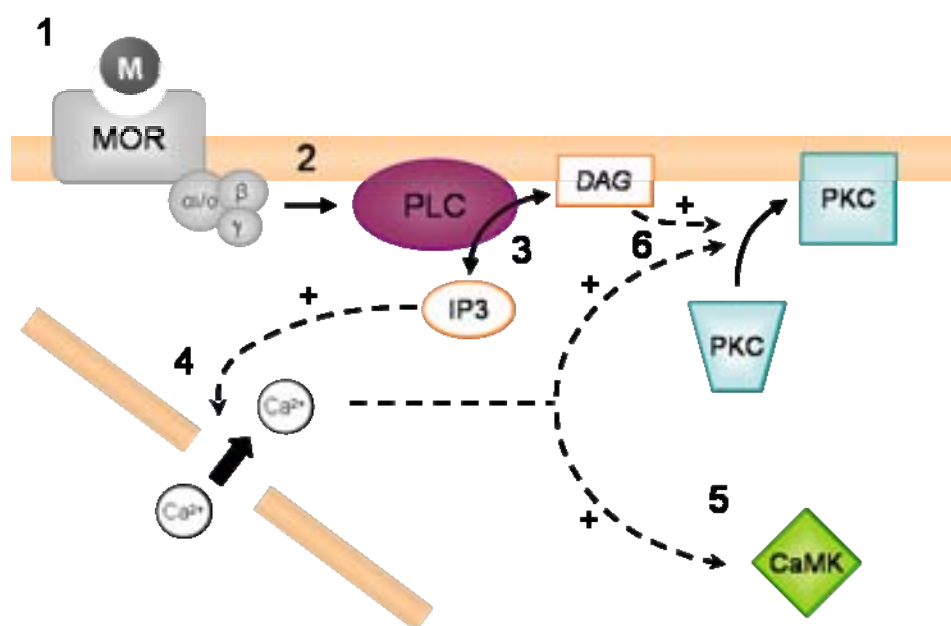


Figura 16. Efecto del tratamiento agudo con morfina sobre los niveles intracelulares de Ca^{2+} y sobre la actividad de la PKC. La unión de morfina a los receptores opioides tipo μ (1) provoca la activación de la fosfolipasa C (2) que hidroliza moléculas de IP_2 dando lugar a IP_3 y DAG (3). Moléculas de IP_3 median la liberación de Ca^{2+} de los depósitos intracelulares (4). Este calcio contribuye a la activación de las CaMKs (5) y de la PKC (junto al DAG) (6).

Abreviaturas y símbolos: +, activación; CaMK, proteína quinasa dependiente de Ca^{2+} y Calmodulina; DAG, 1,2-diacilglicerol; IP_3 , inositol-1,4,5-trisfosfato; M, morfina; MOR, receptor opioide tipo μ ; PKC, proteína quinasa C; PLC, fosfolipasa C

El estudio del efecto de las sustancias opioides sobre esta vía se ha centrado en las proteínas ERK1 y ERK2. El tratamiento con agonistas de los receptores MOR provoca un aumento de la expresión de estas proteínas tanto en cultivos celulares (Belcheva *et al.*, 1998; Gutstein *et al.*, 1997) como en el VTA de animales tratados crónicamente con morfina (Berhow *et al.*, 1996).

Tolerancia aguda

El fenómeno de tolerancia es un mecanismo de adaptación que se caracteriza por una disminución de la respuesta a la misma dosis de una droga, por lo que es necesaria una dosis mayor para obtener el mismo efecto farmacodinámico (Hyman y Malenka, 2001).

El fenómeno de tolerancia aguda tras la exposición puntual a opiáceos ocurre como consecuencia de una desensibilización de los receptores MOR mediante endocitosis, proceso que implica la fosforilación de los receptores y su secuestro en una vesícula y la internalización de ésta (Bilecki *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2003; Horner y Zadina, 2004; Narita *et al.*, 1995).

La fosforilación de receptores acoplados a proteína G, y por tanto de los receptores opioides, está regulada por varias quinasas, como son las quinasas de receptores acoplados a proteínas G (GRK; *G protein-couple receptor kinase*) y las quinasas dependientes de segundos mensajeros (PKA y PKC) (Claing *et al.*, 2002; Mason *et al.*, 2002).

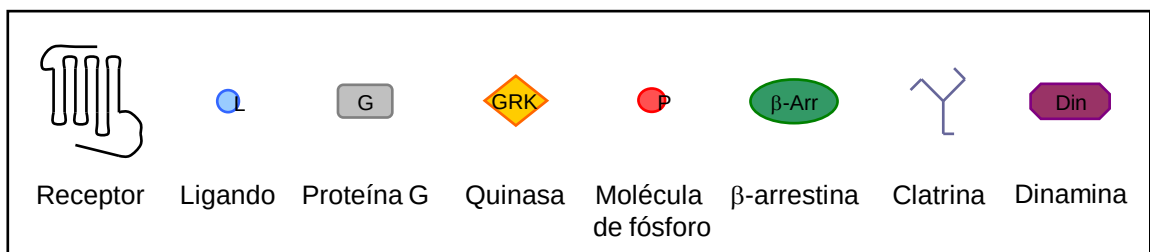
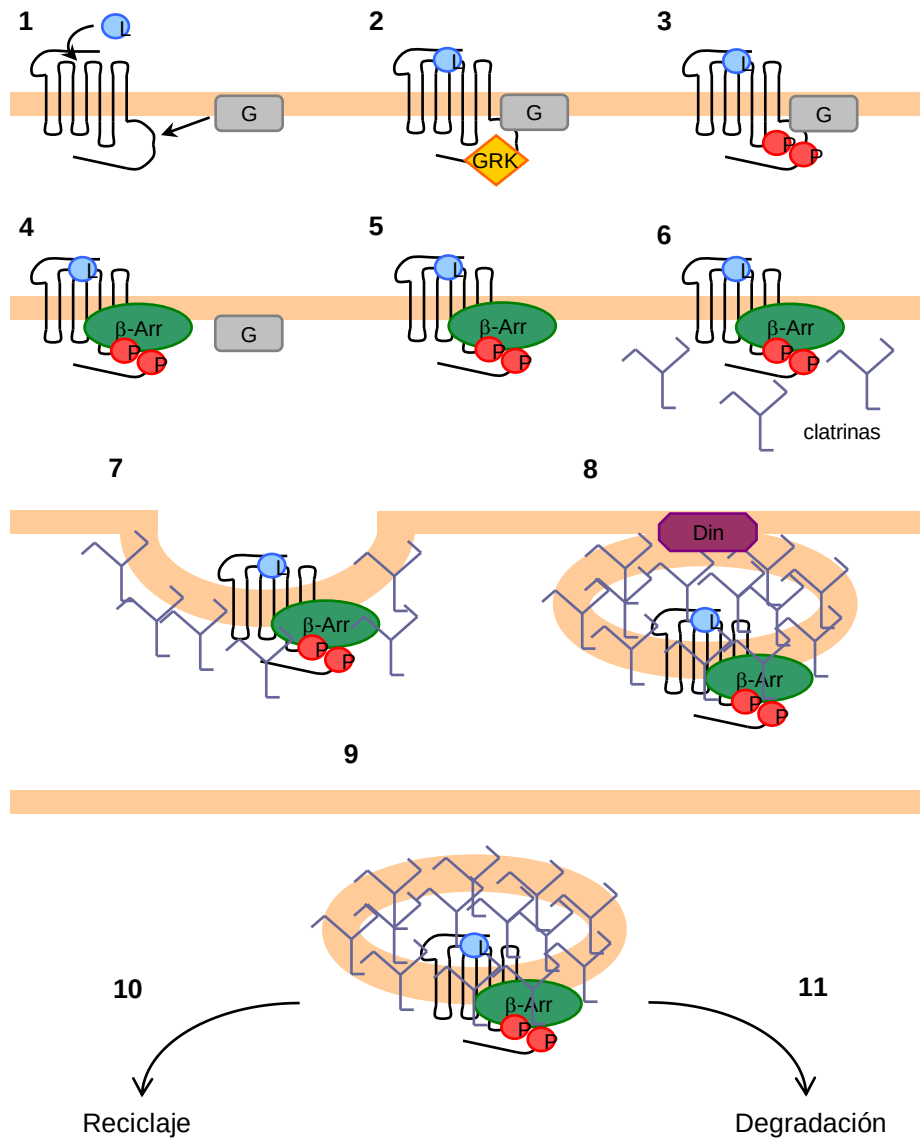
En la desensibilización homóloga, la unión del ligando al receptor provoca la fosforilación de éste mediante las GRKs (**Fig. 18**). El receptor fosforilado se desacopla de la proteína G por acción de las β -arrestinas, comenzando el proceso de internalización mediada por endocitosis: se genera una vesícula de endocitosis recubierta de clatrina, que se separa de la membrana citoplasmática por acción de la

dinamina. El receptor internalizado puede ser, o bien reciclado mediante desfosforilación y recirculación a la membrana plasmática, o bien puede ser degradado por la acción de proteasas. El sistema de internalización dependiente de GRKs-arrestinas, seguido del reciclaje de los receptores, se ha relacionado directamente con la aparición del fenómeno de tolerancia aguda a opiáceos (Chen *et al.*, 2003; Claing *et al.*, 2002; Ferguson *et al.*, 1996; Ferguson, 2001; Horner y Zadina, 2004; Narita *et al.*, 1995; Prossnitz, 2004; Sever, 2002; Zhang *et al.*, 1997a,b).

En la desensibilización heteróloga, la fosforilación de receptores no activados por la unión de ligando está mediada por varias proteínas quinasas dependientes de segundos mensajeros, como son PKA, PKC, CaMK-II, MAPK y proteínas tirosina quinasas (Pierce *et al.*, 2001; Tegeder y Geisslinger, 2004). La fosforilación de los receptores mediante PKC inhibe su endocitosis, por lo que no pueden ser reciclados, acentuándose la tolerancia a las sustancias opioides (Mestek *et al.*, 1995; Narita *et al.*, 1995; Ueda *et al.*, 2004).

Papel del sistema dopaminérgico

Existen multitud de evidencias que sugieren que los sistemas dopaminérgico y opioide interaccionan para modular conjuntamente emociones, motivaciones y comportamientos, así como la actividad locomotora (Fink y Smith, 1980; Maldonado *et al.*, 1997; Mazanedo *et al.*, 1999; Narita *et al.*, 2003). Como ya se mencionó anteriormente, la vía dopaminérgica mesolímbica está implicada en la aparición de los fenómenos de recompensa positivos (componente motivacional) en el proceso de dependencia y adicción a opiáceos (Di Chiara y North, 1992; Koob *et al.*, 1992a,b). Por el contrario, la vía nigroestriatal está involucrada en la aparición de estereotipias asociadas al consumo de drogas (componente motor) (Morelli *et al.*, 1989).



Las sustancias opiáceas regulan la actividad de las neuronas estriatales a través de su unión directa a los receptores opiáceos, pero también indirectamente mediante la liberación de dopamina en el estriado que se unirá a receptores dopaminérgicos.

Una proteína clave en la señalización celular modulada por dopamina es DARPP-32 (*dopamine- and cAMP-regulated phosphoprotein of 32kDa*). Esta proteína, presente en las neuronas estriatonigrales y estriatopallidales (Ouimet *et al.*, 1998), modula la actividad de la proteína fosfatasa 1 (PP-1) y de PKA en estas neuronas (Svenningsson *et al.*, 2004) (**Fig. 19**). La fosforilación de esta proteína en el residuo treonina-34 (Thr-34) mediada por PKA la convierte en un potente inhibidor de la PP-1 (Hemmings *et al.*, 1984), regulando el estado de fosforilación, y por tanto la actividad, de canales de Na⁺ y canales AMPA (Borgkvist y Fisone, 2007; Greengard *et al.*, 1998). Sin embargo, su fosforilación en el residuo Thr-35 mediante cdk5/p35 (*cdk5*, *cyclin-dependent kinase 5*;

p35, cofactor de cdk5) lo convierte en un inhibidor de la PKA, reduciendo la habilidad de ésta para fosforilar DARPP-32 y otros sustratos (Nairn *et al.*, 2004). El aumento de liberación de dopamina provocado por el consumo agudo de morfina puede inducir indirectamente la expresión de c-Fos mediante la activación de receptores dopaminérgicos. La unión de dopamina a receptores D₁ induce la expresión de factores de transcripción en el estriado a través de la activación de la cascada de señales AMPc/PKA (Cole *et al.*, 1994; Konradi *et al.*, 1994, 1996; Lovenberg *et al.*, 1991), por lo que se ha sugerido que este receptor participa en los mecanismos de refuerzo de diversas drogas de abuso (Gilliss *et al.*, 2002; Self y Stein, 1992; Shippenberg y Herz, 1987). La activación o el bloqueo de los receptores D₁ y D₂ también modifican el patrón de expresión del factor de transcripción c-fos inducido por la administración de morfina. El tratamiento con SCH23390 (antagonista de los receptores de la familia D₁) y con quinpirol (agonista de los receptores D₂/D₃) bloquea la expresión de c-Fos inducida por morfina en el estriado (Cook y Wirtshafter, 1998; Liu *et al.*, 1994).

Las aferencias dopaminérgicas provenientes de la SNC modulan la expresión de neuropéptidos en el estriado, entre los que se encuentran los péptidos opioides endógenos dinorfina y encefalina (Engber *et al.*, 1992; Gerfen *et al.*, 1990, 1991). Así, ratas tratadas con el neurotóxico 6-hidroxidopamina (6-OHDA) para lograr la denervación dopaminérgica del estriado, presentan un incremento de la inmunoreactividad para encefalina (Voorn *et al.*, 1987) y un descenso de los niveles de expresión del ARNm para dinorfina (Gerfen *et al.*, 1991) en el estriado lesionado, y además, el tratamiento de ratas normales con el antagonista de receptores dopaminérgicos D₂ eticlopride incrementa la expresión del ARNm preproencefalina (Sirinathsinghji *et al.*, 1994).

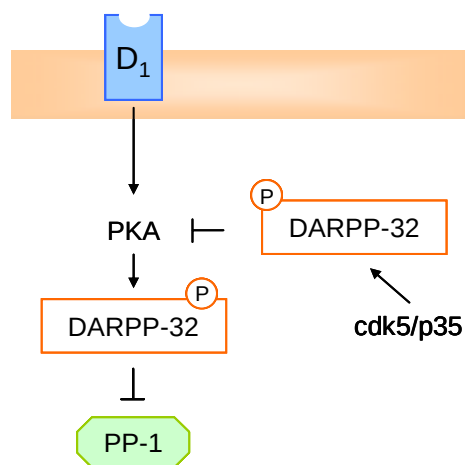


Figura 19. Esquema representativo del efecto de la activación de los receptores dopaminérgicos D₁ sobre la vía de señalización intracelular AMPc/PKA en neuronas estriatonigrales.

Abreviaturas: P, molécula de fósforo; PKA, proteína quinasa A; PP-1, proteína fosfatasa 1; cdk, kinasa dependiente de ciclina; p35, cofactor de cdk

5.2. Consumo crónico y consolidación de la adicción

La exposición repetitiva y prolongada en el tiempo a opiáceos genera dependencia a éstas sustancias, que una vez consolidada, hace que el individuo se convierta en adicto, desarrollando un hábito de autoadministración de la droga opiácea.

Como se verá a continuación, durante este proceso se generan adaptaciones funcionales y estructurales críticas a largo plazo en diversos núcleos que constituyen la base del proceso de adicción a drogas de abuso (Hiroi *et al.*, 1998; Hyman y Malenka, 2001).

Factores de transcripción

Según el modelo de Hope y colaboradores (1994), tras la administración crónica de diversos estímulos (cocaína, apomorfina, estimulación eléctrica) se produce una acumulación de las isoformas de Δ Fos B, Fra-1 y Fra-2, producto de la inducción de su expresión en las células en cada repetición puntual del estímulo durante el tratamiento crónico (**Fig. 20**). Debido a que estos factores de transcripción poseen una vida media larga, los complejos AP-1 que forman poseen también una vida media larga (Hope *et al.*, 1992; Nestler *et al.*, 2001) pudiendo modificar la expresión de genes durante un largo periodo de tiempo. Si el

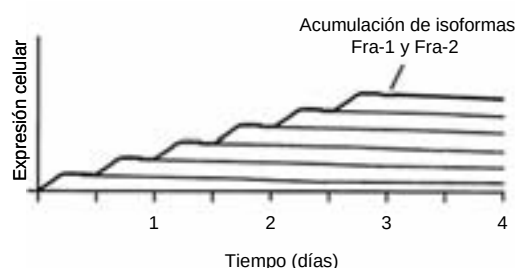


Figura 20. Expresión de factores de transcripción en el caudado putamen y núcleo accumbens tras el tratamiento crónico según el modelo de Hope y colaboradores (modificado de Hope *et al.*, 1994).

tratamiento se prolonga mucho en el tiempo, la expresión de c-Fos, Fos B y Δ Fos B (33 kD) se desensibiliza y comienzan a disminuir sus niveles en las células (Hope *et al.*, 1992; Nestler *et al.*, 2001).

En el caso del tratamiento crónico con morfina, se ha observado un incremento en la expresión de la proteína c-Fos en las neuronas estriatonigrales del CPu tal y como ocurre con el tratamiento agudo (Ferguson *et al.*, 2004). Sin embargo, existen estudios contradictorios sobre la inducción del ARNm para c-fos, ya que algunos autores han observado la inducción de la expresión de este gen (Erdtmann-Vourliotis *et al.*, 1998), mientras que otros no la han detectado (Georges *et al.*, 2000; Nye y Nestler, 1996).

Los niveles de expresión de las isoformas Fra-1 y Fra-2 también aumentan en el estriado. Como ya se ha dicho anteriormente, estos factores poseen una gran estabilidad (probablemente por un proceso de fosforilación) y se unen con alta afinidad a JunD y JunB formando complejos AP-1 de vida media larga, que estarían implicados en cambios a largo plazo y en la plasticidad neuronal asociados al consumo crónico de morfina (Kelz y Nestler, 2000; Nestler, 1999; Nye y Nestler, 1996).

Respecto a CREB, la exposición crónica a opiáceos altera sus niveles celulares y/o su actividad de manera diferente en varias áreas del cerebro (Impey *et al.*, 1998). La causa de este fenómeno podría estar en las diferencias regionales de los niveles basales de CREB (Walters *et al.*, 2003). Así, el tratamiento crónico con morfina incrementa la expresión de CREB y su afinidad por CRE en el LC (Widnell *et al.*, 1994), pero provoca una disminución de los niveles de CREB en el Acb (Widnell *et al.*, 1996). Los niveles de fosforilación de CREB en el LC no se ven alterados (Guitart *et al.*, 1992; Widnell *et al.*, 1994). Hasta la fecha, no hay descritas en la literatura alteraciones en los niveles de p-CREB en el Acb debidas a administración de morfina.

Mecanismos de transducción de señal

El tratamiento crónico con morfina también provoca cambios en la señalización sináptica. La estimulación continua y persistente de los receptores opioides, y por tanto de las vías de transducción asociadas a éstos, conduce a la alteración de la expresión génica que afecta a la actividad neuronal y a sus conexiones con otras neuronas, por lo que los circuitos neuronales donde operan también se ven afectados (Nestler, 2001).

Así, se producen cambios en la expresión y/o actividad de elementos de la vía de señalización AMPc/PKA como respuesta compensatoria ante el efecto inhibitorio de la exposición aguda (Nestler y Aghajanian, 1997), ya que se induce la recuperación de los niveles basales de AMPc y aumentan los niveles de expresión de otros elementos de la vía, como son la AC y la PKA (Chao y Nestler, 2004; Duman *et al.*, 1988; Nestler 2004a,b; Nestler y Aghajanian, 1997; Nestler y Tallman, 1988; Sharma *et al.*, 1975; Terwillinger *et al.*, 1991; Williams *et al.*, 2001).

Las quinasas ERK1 y ERK2 también juegan un papel relevante en procesos de plasticidad sináptica a largo plazo (Adams y Sweatt, 2002; Grewal *et al.*, 1999; Mazzucchelli *et al.*, 2002; Sweatt, 2001), ya que el tratamiento crónico con morfina incrementa los niveles de estas proteínas selectivamente en el LC y en el CPu, sin que se altere su expresión en otras regiones cerebrales (Ortiz *et al.*, 1995).

Tolerancia

Como ocurre durante la administración puntual con morfina, tras la exposición prolongada a esta droga se genera un proceso de tolerancia, aunque en este caso está relacionada con mecanismos implicados en la modulación plástica de los circuitos neuronales y con la alteración de la expresión de genes (Ueda *et al.*, 2004). El proceso de compensación que se produce

en la vía del AMPc descrito anteriormente podría constituir la base fisiológica de la tolerancia crónica a opiáceos (Nestler, 2004a,b).

Recientemente se han descrito péptidos con actividad “anti-opioide” que regulan la actividad de los opioides endógenos. Algunos de estos péptidos son la colecistoquinina (CCK, *colecistokinine*), el neuropéptido FF (NPFF) y el factor inhibidor de melonocitos (MIF, *melanocyte inhibiting factor*). Se ha sugerido que éstos péptidos, junto a la nociceptina, podrían contribuir al desarrollo de la tolerancia y dependencia a opioides (Cesselin, 1995; Ueda *et al.*, 2004). Ueda y colaboradores (2004) también han involucrado en la expresión de este fenómeno al receptor NMDA ya que han observado que los ratones deficientes para la subunidad epsilon1 del receptor NMDA y para el gen de la nociceptina muestran una atenuación de la tolerancia y la dependencia a morfina tras el tratamiento crónico con esta droga.

Cambios morfológicos

Multitud de trabajos han descrito que la administración crónica de morfina causa cambios estructurales permanentes en las neuronas.

Entre otros efectos, se reduce el tamaño del soma de las neuronas dopaminérgicas del VTA, descienden los niveles de proteínas que forman los neurofilamentos y aumenta la expresión de GFAP (*glial fibrillary acidic protein*) (Beitner-Johnson *et al.*, 1992; Nestler *et al.*, 1993a; Sklair-Tavron *et al.*, 1996).

La exposición crónica a morfina también provoca un descenso del número de espinas dendríticas en las neuronas de proyección de la región del shell del Acb y en las neuronas piramidales de la corteza prefrontal y parietal (Robinson y Kolb, 1999).

Todas estas modificaciones podrían reflejar un proceso de neurotoxicidad y/o cambios en la plasticidad neuronal (Boronat *et al.*, 1998; Ferrer-Alcon *et al.*, 2000, 2003).

Regulación de la vía mesolímbica por dinorfina

Se ha establecido que las neuronas dopaminérgicas del VTA inervan a las neuronas de proyección GABAérgicas del Acb que expresan dinorfina, y que a su vez estas neuronas envían sus axones a VTA y sus terminales conectan con las neuronas dopaminérgicas (Nestler *et al.*, 2001). La dinorfina constituye un mecanismo regulador de este circuito ya que al unirse a los receptores KOR localizados en el soma y terminales axónicos de las neuronas dopaminérgicas en VTA, inhibe a estas

células y disminuye la liberación de dopamina en el Acb. Δ Fos B regula la expresión de dinorfina (Bronstein *et al.*, 1994; Nestler *et al.*, 2001), de manera que el incremento de los niveles de expresión de este factor de transcripción en las células tras la administración crónica de morfina disminuye la expresión de dinorfina. Así, el mecanismo de regulación de la vía mesolímbica se silencia, contribuyendo al aumento de liberación de dopamina en el estriado, lo que potencia las propiedades de refuerzo de las drogas de abuso (Georges *et al.*, 1999; Nestler *et al.*, 2001; Newton *et al.*, 2002) (**Fig. 21**).

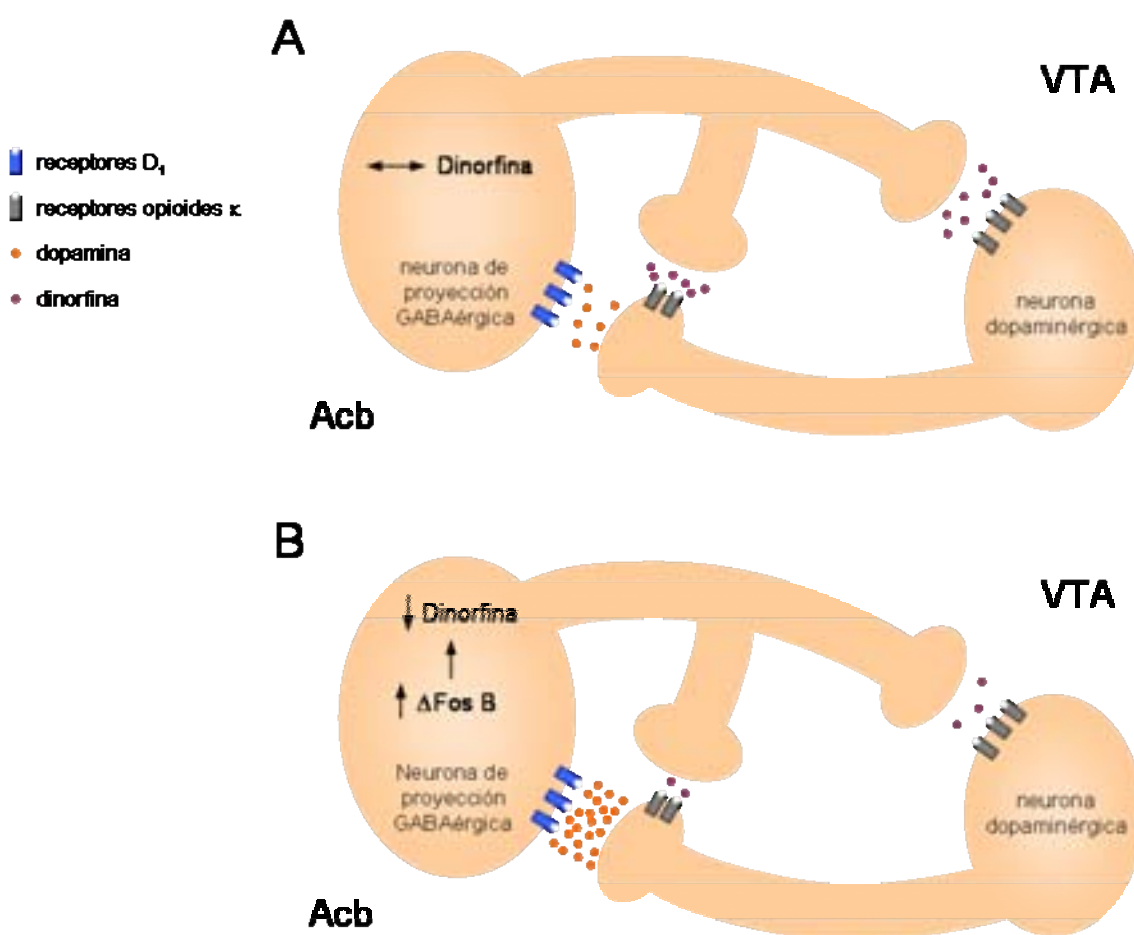


Figura 21. Papel de la dinorfina en la regulación de la vía mesolímbica. Esquema representativo del mecanismo de acción de la dinorfina en condiciones basales (A) y tras la exposición prolongada e intermitente de morfina (B) (modificado de Nestler *et al.*, 2001)

Abreviaturas: Acb, núcleo accumbens; VTA, área tegmental ventral

Sensibilización

El término sensibilización refleja un incremento de los efectos de una droga en los individuos tras una exposición repetida e intermitente respecto a lo que se observaban tras la exposición aguda.

La sensibilización que ocurre a nivel neuronal provoca variaciones en el comportamiento de los individuos. Así, la exposición prolongada a diversas drogas de abuso, y entre ellas la morfina, genera una sensibilización locomotora en roedores que consiste en un incremento progresivo y persistente en la respuesta psicomotora como consecuencia de la exposición a la droga. Aunque no se conoce con exactitud los cambios moleculares y celulares que dan lugar a este fenómeno, se piensa que está mediado por la activación de la vía mesolímbica y la inducción de la expresión de factores de transcripción en regiones mesocorticolímbicas, incluido el CPu (Vanderschuren y Kalivas, 2000; Nestler *et al.*, 1993b).

Como hemos mencionado anteriormente, el consumo agudo de opiáceos provoca un aumento de la liberación de dopamina en el Acb y CPu, regiones involucradas en procesos emocionales y en la regulación motora. Esta liberación se ve reforzada por el consumo crónico de opiáceos, denominándose este fenómeno como sensibilización dopaminérgica (Di Chiara *et al.*, 1999; Kalivas y Duffy, 1990; Leshner, 1997; Shippenberg y Elmer 1998).

5.3. Abstinencia

Periodos prolongados de ausencia de la sustancia opiácea en el organismo provoca una sintomatología somática y emocional, denominada síndrome de abstinencia. En el ser humano se caracteriza por náuseas, problemas gastrointestinales, escalofríos (Alvarez y Farre, 2005) y un estado de disforia y depresión, por lo que los síntomas se asemejan a los de un proceso gripal (De Vries y Shippenberg, 2002; Koob y Le Moal, 1997). En ratas, los síntomas son castaño

de dientes, sacudidas, diarrea, saltos y pérdida de peso (Way *et al.*, 1969). Los sustratos neuronales involucrados en la abstinencia física son el LC y el PAG, mientras que el Acb ha sido relacionado con los aspectos emocionales aversivos de la ausencia de la droga (Koob *et al.*, 1992c).

Los cambios estables que se generan durante el proceso de consolidación de la adicción son críticos en la aparición de los síntomas (tanto fisiológicos como emocionales) del síndrome de abstinencia (Nestler *et al.*, 1996), pero también se han observado variaciones en los niveles de expresión de genes durante la abstinencia que también contribuyen a la aparición de los efectos.

La expresión de los factores de transcripción c-Fos, Fos B- Δ Fos B y CREB se ve modificada durante la abstinencia. Así, se ha descrito un incremento de los niveles de ARNm de c-fos en el CPu y en el Acb tras la inducción de la abstinencia con la administración de naloxona (antagonista general de los receptores opioides) (Georges *et al.*, 2000) en ambas poblaciones de neuronas de proyección, aunque en el Acb la inducción es mayor en las neuronas estriatonigrales, mientras que en el CPu es mayor en las neuronas estriatopalidales. En consonancia con estos resultados, están los de Nye y Nestler (1996), que describieron un incremento de la proteína c-Fos en ambos núcleos.

Al inducir la abstinencia con naltrexona (antagonista general de los receptores opioides), los niveles de expresión de p-CREB se ven incrementados en el LC (Guitart *et al.*, 1992; Shaw-Lutchman *et al.*, 2002) y los de Fos B y Δ Fos B aumentan en el CPu y Acb, mientras que Fra-1 y Fra-2 comienzan a expresarse tras un periodo prolongado de abstinencia (Nye y Nestler, 1996).

La vía de señalización intracelular del AMPc/PKA también se ve modificada. Se ha descrito que se produce un incremento por encima de los niveles basales de la expresión de AMPc y un aumento de la fosforilación de proteínas mediante PKA en

neuronas GABAérgicas y serotoninérgicas en el VTA y el PAG respectivamente (Maldonado *et al.*, 1995; Punch *et al.*, 1997). Debido a esto, se produce un aumento de la liberación de GABA que provoca la reducción de la tasa de disparo de las neuronas dopaminérgicas y serotoninérgicas (Ivanov y Aston-Jones, 2001; Nestler 2004b; Nestler y Aghajanian 1997). La depresión de la transmisión dopaminérgica mesolímbica implica una disminución de la liberación de dopamina en el Acb, provocando la expresión de diversos síntomas del síndrome de abstinencia (Acquas *et al.*, 1991; Acquas y Di Chiara, 1992; Crippens y Robinson, 1994; Rossetti *et al.*, 1992; Shaham *et al.*, 1996). Esta sintomatología es eliminada tras la administración de agonistas de los

receptores dopaminérgicos D2, por lo que estos receptores podrían estar implicados en el proceso (Harris y Aston-Jones, 1994).

Existen evidencias de que durante la abstinencia se produce un incremento de la actividad transcripcional mediada por CREB en el Acb que reduce las propiedades reforzantes de la morfina (Barrot *et al.*, 2000; Shaw-Lutchman *et al.*, 2002). Debido a esto, la expresión de dinorfina, que se había visto reducida en las neuronas del Acb por el tratamiento crónico de opioides, aumenta y alcanza los niveles basales. Por tanto, el mecanismo silenciador de la vía mesolímbica mediado por dicho péptido opioide endógeno se potencia y contribuye a la depresión de la vía mesolímbica (Fernandez-Espejo, 2002; Nestler *et al.*, 2001) (**Fig. 22**).

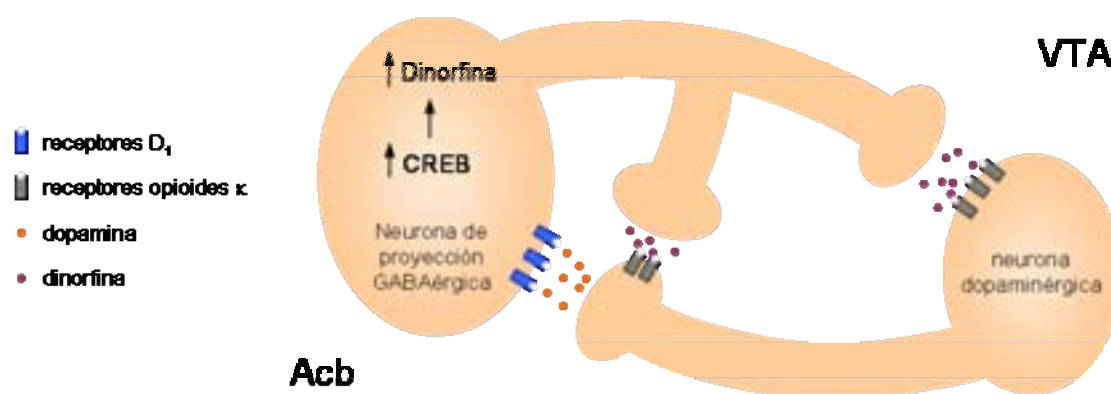


Figura 22. Papel de la dinorfina en la regulación de la vía mesolímbica. Esquema representativo del mecanismo de acción de la dinorfina tras la inducción de la abstinencia (Modificado de Fernández-Espejo, 2002).

Abreviaturas: Acb, núcleo accumbens; VTA, área tegmental ventral

6. Hipótesis de Trabajo y Objetivos

Como se ha descrito previamente, los sistemas dopaminérgico y opioide interaccionan en el sistema nervioso central regulando y controlando multitud de procesos tanto emocionales como conductuales. Además, juegan un papel predominante en los circuitos que median los efectos de la adicción a drogas, entre las que se encuentran las sustancias opiáceas como la morfina.

La mayoría de los estudios realizados hasta ahora se han llevado a cabo utilizando sustancias agonistas y antagonistas de los subtipos de receptores dopaminérgicos D₁ y D₂, debido a que éstos son los subtipos de receptores que se expresan de forma mayoritaria en el estriado y demás ganglios basales, por lo que las funciones mediadas por los receptores D₄ durante el desarrollo de la adicción no se conocen con exactitud.

El compartimento estriosomal, debido a las conexiones que recibe desde otros núcleos, forma parte del sistema límbico (Gerfen y Wilson, 1996), constituyendo un punto de integración en el CPu entre este sistema y el motor, ambos involucrados en procesos de aprendizaje mediante refuerzos y en la consolidación de hábitos relacionados con la adicción a sustancias de abuso (Canales, 2005). Estudios previos en nuestro laboratorio (Rivera *et al.*, 2002a)

han demostrado que existe una distribución solapada de los receptores D₄ y MOR en los estriosomas del CPu de rata (**Fig. 23**). Esta colocalización regional sugiere que ambos tipos de receptores podrían interaccionar.

Con el fin de aportar datos sobre la posible interacción entre los receptores D₄ y MOR, hemos establecido los siguientes objetivos:

1. Estudiar la influencia de los receptores dopaminérgicos D₄ en los efectos que el tratamiento agudo con morfina tiene sobre la expresión de los factores de transcripción c-Fos, Fos B-ΔFos B y p-CREB en el CPu de rata.
2. Determinar el papel de los receptores dopaminérgicos D₄ y opioides tipo μ en la regulación de la expresión de los opioides endógenos dinorfina y encefalina en las neuronas estriatales en el CPu en ratas tratadas de manera aguda con morfina.
3. Establecer si la estimulación aguda de los receptores dopaminérgicos D₄ modifica el número de receptores MOR en membrana y/o su afinidad en el CPu de rata.
4. Estudiar el efecto de la activación de los receptores dopaminérgicos D₄ sobre la sensibilización locomotora inducida por el tratamiento agudo con morfina en ratones.

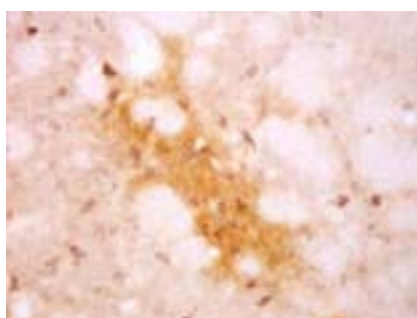


Figura 23. Colocalización regional del receptor dopaminérgico D₄ y del receptor opioide μ. Microfotografía de una sección rostral del caudado putamen de rata teñida con doble marcaje inmunocitoquímico que muestra en detalle la coexpresión de los receptores D₄ (somas marcados con gran intensidad de color azul oscuro) y los receptores opioides tipo μ (fibras marcadas de color marrón) en un estriosoma.

Material y Métodos

1. Animales de Experimentación

Se han utilizado ratas albinas de la cepa Sprague-Dawley de la casa comercial *Criffa*, cuyo peso corporal osciló entre 150 y 250 g, y ratones de la cepa C57BL/6J de la casa comercial *Charles River*, cuyo peso osciló entre 20 y 30 g. Para evitar que las variaciones hormonales asociadas al sexo del animal interfirieran en los resultados, se han usado exclusivamente individuos macho.

Los animales se mantuvieron estabulados bajo condiciones controladas en el Centro de Experimentación Animal de la Universidad de Málaga. La temperatura media de la habitación fue de $20 \pm 2^\circ\text{C}$ y el fotoperiodo de 12/12 horas luz/oscuridad. Los animales fueron alimentados con una dieta estándar de mantenimiento ratón/rata (*Criffa*), y tuvieron libre acceso a la comida y agua.

En todo momento los animales se manipularon siguiendo la directiva de la Comunidad Europea 86/609/EEC y el Real Decreto 1201/2005 del 21 de octubre de 2005 sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos.

Las ratas Sprague-Dawley se emplearon en los estudios de la expresión de factores de transcripción y de opioides endógenos, así como en los estudios de unión a ligandos. Los ratones C57BL/6J se utilizaron para el análisis de la actividad locomotora.

2. Tratamientos Farmacológicos y Grupos de Experimentación

Los animales se dividieron en diferentes grupos de experimentación y se trataron con las sustancias que se detallan en la **tabla 4**.

2.1. Estudio del patrón de expresión de c-Fos, Fos B-ΔFos B y p-CREB después del tratamiento agudo con morfina y/o un agonista de los receptores dopaminérgicos D₄

Este estudio se diseñó para analizar el patrón de expresión de c-Fos, Fos B-ΔFos B y p-CREB en el CPu de rata tras la administración aguda de PD168,077 y/o morfina a lo largo del tiempo, así como para comprobar la especificidad de la acción del agonista de los receptores D₄. Para llevarlo a cabo se emplearon técnicas inmunohistoquímicas y de hibridación *in situ*.

Tabla 4. Fármacos utilizados.

Compuesto	Acción	Casa comercial	Vehículo	K _i (MOR)	K _i (D ₄ R)	K _i (otros)
Morfina sulfato ¹	Agonista MOR	<i>Sigma-Aldrich</i>	Agua destilada	14 nM ^a		DOR (>1000) KOR (538 nM)
		<i>Salars</i>	NaCl al 0.9%			
PD168,077 maleate ¹	Agonista D ₄	<i>Tocris Bioscience</i>	DMSO al 2% NaCl al 0.9%		8.7 nM ^b	D ₂ R (>400) D ₃ R (>300)
L745,870 trihydrochloride ¹	Antagonista D ₄	<i>Tocris Bioscience</i>	NaCl al 0.9%		0.43 nM ^c	D ₂ R (960 nM) D ₃ R (2300 nM) D ₁ R, D ₅ R, 5-HT ₂ (>1000)

Referencias: a, Raynor *et al.*, 1994; b, Kulagowski *et al.*, 1996; c, Glase *et al.*, 1997

Abreviaturas: DMSO, Dimetil sulfóxido; K_i, constante de afinidad; Vía admt., vía de administración; MOR, KOR, DOR, receptores opioides μ, κ, δ respectivamente; D₁R, D₂R, D₃R, D₄R, D₅R, receptores dopaminérgicos D₁, D₂, D₃, D₄ y D₅ respectivamente; 5-HT₂, receptor serotoninérgico tipo 2

Notas: 1, la vía de administración en ratas fue intraperitoneal (i.p.) y en ratón subcutánea (s.c.)

2.1.1. Estudio temporal

Con el fin de evaluar el efecto de la administración de PD168,077 y/o morfina sobre el patrón de expresión de los distintos factores de transcripción a lo largo del tiempo, se establecieron los grupos de experimentación que se recogen en la **tabla 5**. A las ratas se les administró PD168,077 y/o morfina de forma aguda y se sacrificaron a distintos tiempos ($\frac{1}{2}$, 2, 4 y 6 horas). Mediante técnicas inmunohistoquímicas se analizó el número de núcleos inmunoreactivos (IR) para c-Fos, Fos B-

Δ Fos B y p-CREB en el CPu y mediante hibridación *in situ* se analizaron los niveles de ARNm para c-fos en este mismo núcleo.

Según muestra la **figura 24**, a los animales se les inyectó PD168,077 (1 mg/kg; i.p.), o su vehículo, 30 minutos antes de la administración de morfina. Las ratas sacrificadas $\frac{1}{2}$ hora después del tratamiento con morfina recibieron una única inyección de esta sustancia (10 mg/kg; i.p.). Los animales sacrificados a las 2, 4 y 6 horas recibieron un total de 4 inyecciones (i.p.) de morfina de 10 mg/kg cada una y administradas cada 30 minutos.

Tabla 5. Grupos experimentales para el estudio del patrón de expresión de los factores de transcripción c-Fos, Fos B- Δ Fos B y p-CREB a lo largo del tiempo.

Tiempo de supervivencia (horas) ¹	Grupo	Tratamiento	n (IMQ)	n (HIS)
$\frac{1}{2}$	I	control	4	5
	II	PD168,077	4	5
	III	morfina	4	5
	IV	PD168,077 + morfina	4	5
2	V	control	8	5
	VI	PD168,077	6	5
	VII	morfina	8	5
	VIII	PD168,077 + morfina	7	5
4	IX	control	4	5
	X	PD168,077	4	5
	XI	morfina	4	5
	XII	PD168,077 + morfina	4	5
6	XIII	control	4	
	XIV	PD168,077	4	
	XV	morfina	4	
	XVI	PD168,077 + morfina	4	

Nota: 1, tiempo transcurrido desde la primera inyección de morfina o su vehículo

Abreviaturas: n, número de animales utilizados; IMQ, inmunohistoquímica; HIS, hibridación *in situ*

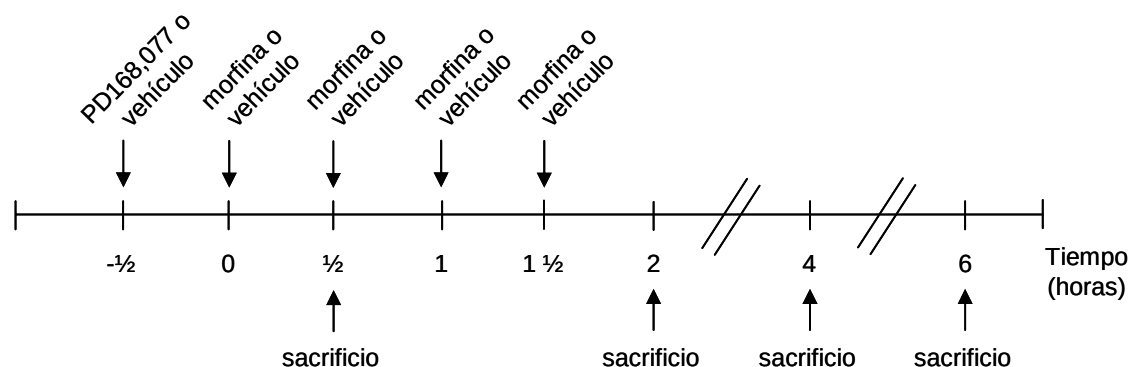


Figura 24. Diagrama temporal de los tratamientos administrados a las ratas para el estudio del patrón de expresión de los factores de transcripción c-Fos, Fos B-ΔFos B y p-CREB a lo largo del tiempo.

2.1.2. Especificidad del efecto mediado por el agonista PD168,077

Para comprobar que los efectos observados del agonista dopaminérgico PD168,077 sobre la expresión de c-Fos se debían específicamente a la activación de los receptores D_4 , se realizaron tratamientos usando el antagonista específico L745,870 y se analizó el número de núcleos c-Fos IR mediante técnicas inmunohistoquímicas. Los distintos grupos experimentales que se establecieron se recogen en la **tabla 6**.

Como muestra la **figura 25**, la administración de L745,870 (1 mg/kg, i.p.) o su vehículo se realizó 15 minutos antes de la administración de PD168,077 (1 mg/kg, i.p.) o su vehículo correspondiente.

Igual que en el experimento anterior (apartado 2.1.1), los animales recibieron 4 inyecciones de morfina (10 mg/kg; i.p.) o su vehículo, administrándoles una dosis cada 30 minutos durante 1 hora y media. Todas las ratas se sacrificaron 2 horas después de la primera inyección de morfina.

Tabla 6. Grupos experimentales para el estudio de la especificidad del efecto sobre la expresión de c-Fos mediado por PD168,077.

Grupo	Tratamiento	n
I	control	8
II	PD168,077	6
III	L745,870	6
IV	morfina	8
V	PD168,077 + morfina	7
VI	L745,870 + PD168,077 + morfina	5

Abreviaturas: n, número de animales utilizados

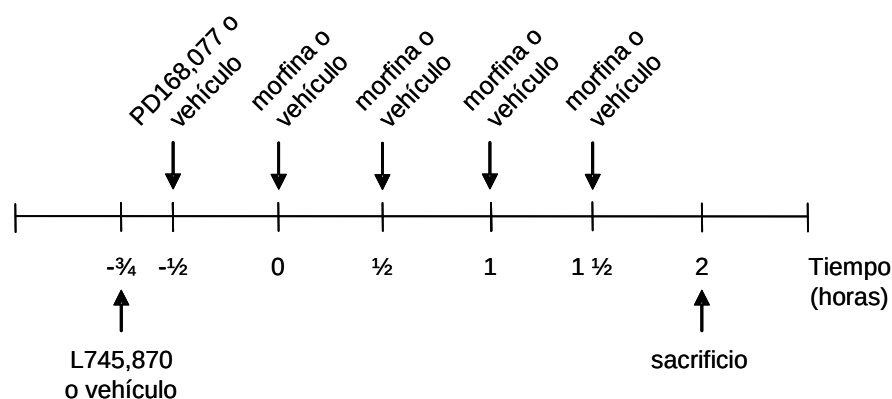


Figura 25. Diagrama temporal de los tratamientos administrados en el estudio de la especificidad del efecto mediado por el agonista de los receptores dopaminérgicos D₄.

2.2. Estudio de los niveles de expresión de encefalina y dinorfina tras el tratamiento agudo con morfina y/o un agonista de los receptores dopaminérgicos D₄

Con el fin de estudiar si el tratamiento con el agonista PD168,077, sólo o junto a morfina, modifica la expresión de los opioides endógenos encefalina y dinorfina en el CPu se realizaron los tratamientos que a continuación se detallan. Posteriormente se analizaron los niveles de expresión de ARNm para ambos opioides en el CPu mediante técnicas de hibridación *in situ*.

2.2.1. Estudio temporal del efecto de la administración del agonista PD168,077

Para evaluar el efecto de la administración aguda de PD168,077 sobre los niveles de ARNm para encefalina y dinorfina en el CPu a largo del tiempo se diseñaron los grupos de experimentación que se recogen en la **tabla 7**.

A las ratas se les administró una única inyección de PD168,077 (1 mg/kg; i.p.) y se sacrificaron a distintos tiempos (1/2, 2 y 4 horas). Paralelamente se trataron animales control con el vehículo y se sacrificaron a los mismos tiempos.

2.2.2. Estudio temporal del efecto de la administración de morfina sola o junto con el agonista PD168,077

Para conocer los efectos de la administración aguda de morfina sobre los niveles de expresión del ARNm para encefalina y dinorfina en el CPu de rata y comprobar si los receptores D₄ están implicados, se utilizó la técnica de hibridación *in situ* y se establecieron distintos grupos de experimentación de igual manera que en el apartado 2.1.1 que se recogen en la **tabla 8**.

Tabla 7. Grupos experimentales para el estudio temporal del efecto de la administración aguda de PD168,077 en la expresión del ARNm para encefalina y dinorfina.

Tiempo de supervivencia (horas)	Grupo	Tratamiento	n
1/2	I	control	4
	II	PD168,077	5
2	III	control	4
	IV	PD168,077	4
4	V	control	4
	VI	PD168,077	5

Abreviaturas: n, número de animales utilizados

Tabla 8. Grupos experimentales para el estudio temporal del efecto de la administración aguda de PD168,077 y/o morfina sobre la expresión del ARNm para encefalina y dinorfina.

Tiempo de supervivencia (horas) ¹	Grupo	Tratamiento	n
$\frac{1}{2}$	I	control	5
	II	PD168,077	5
	III	morfina	5
	IV	PD168,077 + morfina	5
2	V	control	5
	VI	PD168,077	5
	VII	morfina	5
	VIII	PD168,077 + morfina	5
4	IX	control	5
	X	PD168,077	5
	XI	morfina	5
	XII	PD168,077 + morfina	5

Nota: 1, tiempo transcurrido desde la primera inyección de morfina o su vehículo
Abreviaturas: n, número de animales utilizados

Siguiendo el mismo protocolo de inyecciones que se utilizó anteriormente (apartado 2.1.1), a las ratas se les administró PD168,077 (1 mg/kg; i.p.) 30 minutos antes de que se les inyectara la primera dosis de morfina (10 mg/kg; i.p.) y se sacrificaron a distintos tiempos ($\frac{1}{2}$, 2 y 4 horas). Como muestra la **figura 26**, las ratas sacrificadas a la $\frac{1}{2}$ hora sólo recibieron una

dosis de morfina, mientras que las sacrificadas a las 2 y 4 horas se les administraron 4 dosis (una inyección cada 30 minutos durante 1 hora y media).

En los grupos control, los animales fueron tratados con los vehículos correspondientes y sacrificados a los mismos tiempos después de la primera inyección del vehículo de morfina.

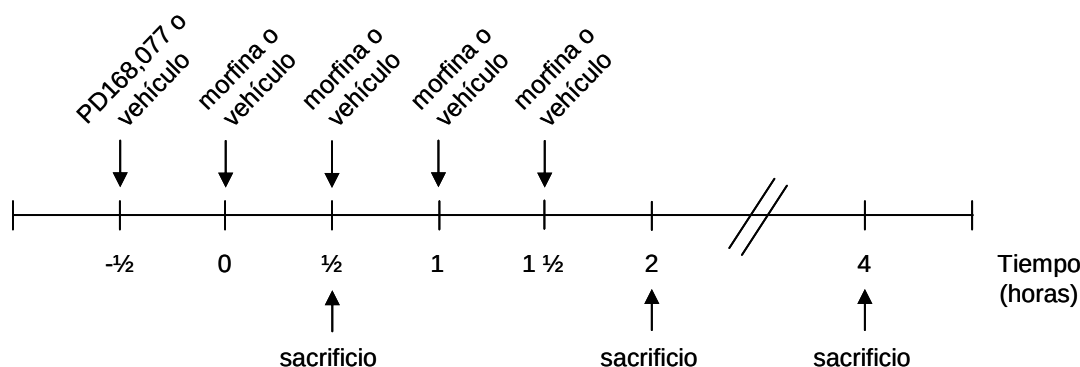


Figura 26. Diagrama temporal de los tratamientos administrados para el estudio del efecto del cotratamiento de PD168,077 y/o morfina sobre la expresión del ARNm para encefalina y dinorfina a lo largo del tiempo.

2.3. Estudio de la interacción de los receptores dopaminérgicos D_4 y opioide tipo μ mediante experimentos de unión a ligandos

Para conocer si la activación de los receptores D_4 modifica las características farmacológicas afinidad y número de sitios de unión de los receptores MOR en el CPu de rata se realizaron estudios de unión a ligandos en condiciones de saturación.

2.3.1. Estudio temporal

Para realizar el estudio a lo largo del tiempo, se trataron a las ratas con una única inyección de PD168,077 (1 mg/kg, i.p.) y se sacrificaron a distintos tiempos ($\frac{1}{2}$, 2, 4 y 6 horas). Paralelamente se trataron ratas con el vehículo y se sacrificaron a los mismos tiempos. Los distintos grupos de experimentación se recogen en la **tabla 9**.

2.3.2. Estudio de dosis-respuesta

Para conocer si existen efectos dependientes de la dosis de PD168,077 utilizada se establecieron distintos grupos de experimentación como refleja la **tabla 10**. A las ratas se les administró la dosis de PD168,077 correspondiente (0.5, 1 y 3 mg/kg; i.p.) y se sacrificaron 2 horas después. En el grupo control, a las ratas se les administró el vehículo del agonista de D_4 y se sacrificaron a las 2 horas de la inyección.

2.4. Estudio de la implicación de los receptores dopaminérgicos D_4 en la actividad locomotora inducida por morfina

El estudio de la posible contribución de los receptores D_4 en el incremento de la actividad locomotora inducida por la administración aguda de morfina en ratones se llevó a cabo mediante el test de campo abierto. Como se recoge en la **tabla 11**, para realizar este estudio se comprobó el efecto de 3 dosis distintas de PD168,077

(0.06, 0.2, 1 mg/kg; s.c.) en animales tratados con morfina (10 mg/kg; s.c.) de forma aguda.

A los ratones se les administró una inyección de PD168,077 (0.06, 0.2, 1 mg/kg; s.c.) o el vehículo (0.9% NaCl; s.c.) 15 minutos antes de recibir una única inyección de morfina (10 mg/kg; s.c.) o su vehículo (0.9% NaCl; s.c.).

3. Inmunohistoquímica

A lo largo de las últimas décadas, las técnicas inmohistoquímicas han sido utilizadas como método eficaz para la cuantificación de cambios en la expresión de factores de transcripción y otras proteínas celulares. Así, el análisis de la expresión de c-Fos, Fos B- Δ Fos B y p-CREB tras el tratamiento con PD168,077 y/o morfina, se ha realizado mediante estas técnicas.

3.1. Procesamiento del tejido

3.1.1. Fijación del tejido

Los cerebros de rata fueron fijados mediante perfusión vascular transcardiaca con una solución fijadora, seguida de una postfijación por inmersión en el mismo fijador.

Los animales se anestesiaron con pentobarbital sódico (*Abbott*) (60 mg/kg, i.p.). Tras la pérdida total de reflejos, se abrió la cavidad torácica para exponer el corazón. A través de una cánula insertada en el ventrículo izquierdo se hizo pasar tampón fosfato salino 0.1M, pH 7.3 (PBS) (Apéndice A-3), y el drenaje se realizó por una incisión practicada en la aurícula derecha. Después de 5 minutos se pasó la solución fijadora, paraformaldehído al 4% en tampón fosfato PB 0.1M, pH 7.3 (PB) (Apéndice B).

Los cerebros se extrajeron y se postfijaron por inmersión durante 16-18 horas en la misma solución fijadora utilizada anteriormente a temperatura ambiente y en agitación.

Tabla 9. Grupos experimentales para estudiar el efecto mediado por PD168,077 sobre las características farmacológicas de los receptores opioides tipo μ en el caudado putamen de rata a lo largo del tiempo.

Tiempo de supervivencia (horas) ¹	Grupo	Tratamiento	n
$\frac{1}{2}$	I	control	5
	II	PD168,077	6
2	III	control	14
	IV	PD168,077	14
4	V	control	6
	VI	PD168,077	6
6	VII	control	4
	VIII	PD168,077	4

Abreviaturas: n, número de animales utilizados

Tabla 10. Grupos experimentales para estudiar el efecto dependiente de dosis de PD168,077 sobre las características farmacológicas de los receptores opioides tipo μ en el caudado putamen de rata.

Grupo	Tratamiento	n
I	control	14
II	PD168,077 0.5 mg/kg	6
III	PD168,077 1 mg/kg	14
IV	PD168,077 3 mg/kg	7

Abreviaturas: n, número de animales utilizados

Tabla 11. Grupos experimentales para el estudio de la implicación de los receptores D₄ en la sensibilización locomotora inducida por morfina.

Grupo	Tratamiento	n
I	control	7
II	morfina	8
III	PD168,077 0.06 mg/kg	7
IV	PD168,077 0.2 mg/kg	7
V	PD168,077 1 mg/kg	7
VI	PD168,077 0.06 mg/kg + morfina	6
VII	PD168,077 0.2 mg/kg + morfina	7
VIII	PD168,077 1 mg/kg + morfina	7

Abreviaturas: n, número de animales utilizados

3.1.2. Crioprotección

Para preservar la estructura del tejido durante la congelación se sometió a los cerebros a un proceso de crioprotección. Los cerebros se lavaron en abundante PBS para eliminar los restos del fijador (3 lavados de 10 minutos cada uno) y se pasaron a una solución de sacarosa al 30% con azida sódica al 0.02% en PBS (Apéndice C). Se mantuvieron a 4°C y en agitación suave durante 72 horas.

3.1.3. Congelación de los cerebros y obtención de las secciones

Una vez congelados los cerebros con nieve carbónica (para una congelación rápida y así evitar la formación de cristales), se obtuvieron las secciones coronales flotantes con un microtomo de congelación (modelo CM 1325, *Leica*) de 30 µm de grosor. Las secciones se recogieron de forma seriada en placas de 12 compartimentos que contenían una solución

de PBS con azida sódica al 0.02% (Apéndice E-1). Se introdujo el primer corte en el compartimento 1, el segundo corte en el compartimento 2, y así sucesivamente hasta llegar al compartimento 12 para comenzar de nuevo por el primero. Así, en cada compartimento se encontraba una o dos secciones representativas de cada nivel del eje rostro-caudal del cerebro (Paxinos y Watson, 2001), por lo que entre secciones consecutivas de un mismo compartimento había una diferencia de 360 µm. Las secciones fueron almacenadas a 4 °C hasta su posterior procesamiento con técnicas inmunohistoquímicas.

3.2. Anticuerpos primarios

Los anticuerpos primarios utilizados en este trabajo fueron anti-c-Fos, anti-Fos B y anti-p-CREB. La información detallada de cada uno de ellos se recoge en la **tabla 12**.

Los anticuerpos se diluyeron en una solución de PBS con Tritón X-100 al 0.2% y azida sódica al 0.1% (Apéndice D).

Tabla 12. Anticuerpos primarios utilizados en este estudio.

Anticuerpos	Anti-c-Fos	Anti-Fos-B	Anti-p-CREB
especie inmunizada	conejo	conejo	conejo
especie inmunogénica	humano	humano	rata
secuencia antigénica	péptido del extremo N-terminal	aa 75-150	fosfopéptido sintético (aa 123-136)
especificidad (western blot)	c-Fos (62 KDa)	Fos B (45 KDa) ΔFos B (35 KDa)	p-CREB (43KDa)
casa comercial y número de catálogo	<i>Santa Cruz Biotechnology</i> sc-52	<i>Santa Cruz Biotechnology</i> sc-7203	<i>Upstate Biotechnology</i> 06-519
marcaje inmunohistoquímico	núcleo celular	núcleo celular	núcleo celular
referencia	Andersen <i>et al.</i> , 2001	Grande <i>et al.</i> , 2004	Colombo <i>et al.</i> , 2003

3.3. Protocolo de la técnica inmunohistoquímica para microscopía óptica

La técnica inmunohistoquímica se aplicó a 5-7 secciones pertenecientes a una serie rostro-caudal completa del CPu de cada animal. Las secciones coronales flotantes se procesaron con algunas variaciones siguiendo el método convencional de la avidina-biotina (Hsu y Raine, 1981) como se explica a continuación.

En primer lugar se inactivó la peroxidasa endógena tratando las secciones con H_2O_2 al 3% en PBS durante 15 minutos a temperatura ambiente y en agitación. A continuación el tejido se lavó abundantemente (3 lavados de 10 minutos) con PBS. Las secciones se incubaron en el anticuerpo primario elegido (1:1000 anti-c-Fos; 1:200 anti-Fos B; 1:500 anti-p-CREB) durante 24 horas a temperatura ambiente y posteriormente se lavaron con PBS. El anticuerpo secundario utilizado fue anti-IgG de conejo biotinilado desarrollado en cabra (Vector) diluido 1:500 en PBS con Tritón X-100 al 0.2% y azida sódica al 0.1%. La incubación fue de una hora a temperatura ambiente. Los cortes se lavaron en PBS y después se incubaron durante una hora a temperatura ambiente en estreptavidina acoplada a la enzima peroxidasa de rábano (HRP) (*Sigma-Aldrich*) diluida 1:2000 en PBS con Tritón X-100 al 0.2%. El revelado de la actividad peroxidasa se llevó a cabo con 3-3'Diaminobencidina (DAB) (*Sigma-Aldrich*) (0.2 mg/ml; diluido en PBS y H_2O_2 al 0.01%). La reacción se intensificó con sulfato amónico de níquel (*Carlo Erba*) a una concentración de 0.8 mg/ml.

Tras lavar las secciones con PBS, éstas se montaron sobre portaobjetos gelatinados (Apéndice E-2) y se dejaron secar al aire. Posteriormente, se deshidrataron en una graduación ascendente de alcoholes (50°, 70°, 96° y 100°), se aclararon con xileno (*Panreac*) y se cubrieron usando el medio

de montaje DPX (BDH) con un cubreobjetos.

3.4. Cuantificación del marcaje inmunohistoquímico

Con una cámara digital acoplada a un microscopio óptico (Eclipse E400, *Nikon*) se obtuvieron microfotografías de las secciones teñidas con los anticuerpos anti-c-Fos, anti-Fos B y anti-p-CREB. Para realizar la cuantificación del número de núcleos c-Fos IR se usó el objetivo de 10x y para los núcleos Fos B-ΔFos B y p-CREB IR el objetivo de 20x. La expresión de c-Fos se analizó en el cuadrante dorso-medial (DM) del CPu en todas las secciones inmunoteñidas y la de Fos B-ΔFos B y p-CREB se estudió en las regiones medial (unión de los cuadrantes DM y ventromedial (VM)) y lateral (unión de los cuadrantes dorso-lateral (DL) y ventrolateral (VL)) del CPu (**Fig. 27**), aunando los resultados obtenidos en ambas regiones.

Se determinó un umbral homogéneo en la escala de valores de grises utilizando el programa de tratamiento de imágenes Adobe®Photoshop®CS versión 8.0 (*Adobe Systems, Inc.*) para detectar en las microfotografías núcleos IR marcados con una intensidad media-alta. El número de núcleos IR para los distintos anticuerpos se valoró con el programa de análisis de imagen Image J 1.34s (*Nacional Institutes of Health* (NIH)).

Para cuantificar el número de núcleos positivos para cada factor de transcripción se analizaron los dos hemisferios de 5-7 secciones por cada animal. Para el estudio detallado a lo largo del eje rostro-caudal se definieron como secciones rostrales aquellas cuyas coordenadas estaban cercanas a Bregma +1.60 mm, secciones medias aquellas alrededor de Bregma +1.00 mm y caudales a secciones cuyas coordenadas eran similares a Bregma -0.26 mm según Paxinos y Watson (2001) (**Fig. 27**).

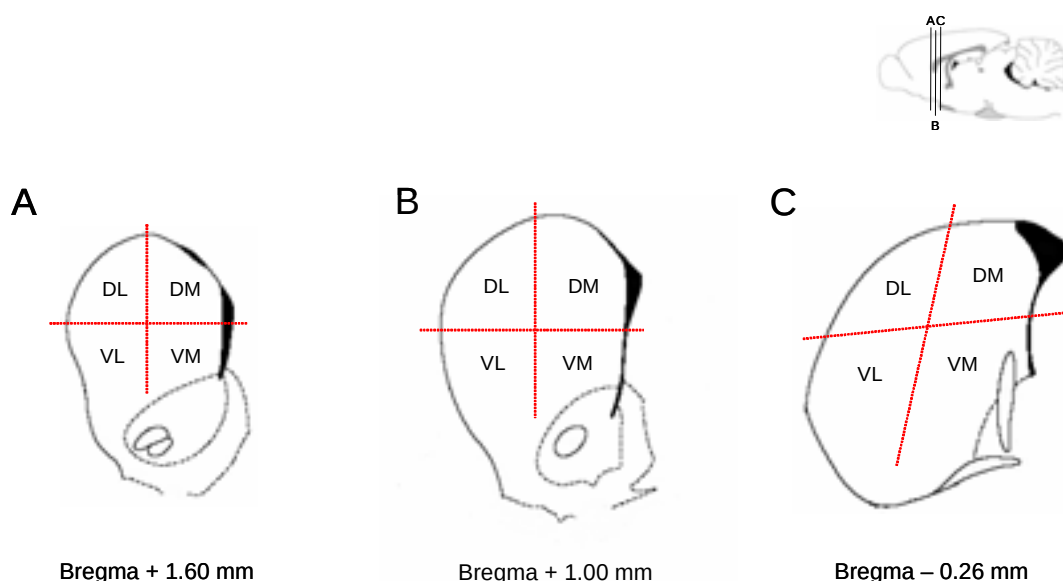


Figura 27. Representación esquemática de los niveles rostrales (A), medios (B) y caudales (C) del caudado putamen de rata y las regiones en las que se dividió este núcleo para analizar el número de núcleos positivos para c-Fos, Fos B-ΔFos B y p-CREB. Las coordenadas están basadas en el atlas de Paxinos y Watson (2001).

Abreviaturas: DL, dorso-lateral; DM, dorso-medial; VL, ventro-lateral; VM, ventro-medial

4. Hibridación *In Situ*

La técnica de hibridación *in situ* isotópica ha sido empleada por numerosos autores para determinar los niveles de expresión del ARN mensajero (ARNm) de multitud de genes en diversos tejidos. Por tanto, es una herramienta útil y válida para analizar si existen cambios en la expresión de los genes de dinorfina y encefalina en el CPu en ratas tratadas con PD168,077 y/o morfina.

4.1. Procesamiento del tejido

Las ratas fueron sacrificadas mediante decapitación con guillotina tras recibir el tratamiento correspondiente (apartado 2.2).

Los cerebros se extrajeron rápidamente, se congelaron mediante inmersión en isopentano (Merck) (-40 °C) y se almacenaron a una temperatura de -80 °C hasta su posterior utilización.

El análisis mediante hibridación *in situ* se llevó a cabo en secciones coronales de 14 μm de grosor. Estas secciones se obtuvieron con un criostato (MICROM HM 550, Microm Laborgeräte S. L.) a una

temperatura de -20 °C, recogidas sobre portas SuperFrost® Plus (Menzel-Gläser) y almacenadas a -20 °C hasta su posterior uso.

4.2. Marcaje de las sondas

Las sondas usadas fueron oligonucleótidos de ADN de cadena simple de 48 nucleótidos de longitud (Pharmacia Biotech) complementarios a regiones específicas de las secuencias de ARNm de dinorfina (nucleótidos 296-345) (Douglass *et al.*, 1989), encefalina (nucleótidos 235-282) (Zurawski *et al.*, 1986) y c-fos (nucleótidos 489-538) (Curran *et al.*, 1987). Estas sondas fueron cedidas amablemente por los Drs. Olson y Brené del Departamento de Neurociencias del Instituto Karolinska (Suecia).

Las sondas fueron marcadas en el extremo 3' con [α-³²P]dATP (PerkinElmer) usando el enzima Tdt (*terminal deoxynucleotidyl transferase*) (Apéndice F-1). Posteriormente se purificaron las sondas (Apéndice F-2) y se determinó su marcaje (Apéndice F-3).

4.3. Protocolo de hibridación

Una vez colocados los portaobjetos con las muestras en cámaras húmedas de hibridación se les aplicó a cada uno de ellos 0.15 ml de mezcla de hibridación (formamida al 50%, SSC 4x, solución Denhardt's 1x, Sarcosyl al 1%, PB 0.02M, pH 7, dextran sulfato al 0.10%, DTT 0.06 M, 0.1 mg/ml ADN de esperma de salmón) con la sonda marcada (Apéndice F-4) y se cubrieron con parafilm (*Pechiney Plastic Packaging, Inc.*).

Las cámaras húmedas se colocaron en una estufa a 42 °C durante 16-18 horas. Transcurrido este tiempo, se retiró el parafilm de los portaobjetos y se eliminó la mezcla de hibridación con lavados sucesivos en tampón SSC 1x (4 lavados de 15-30 minutos a 60 °C y 1 lavado a temperatura ambiente durante 1 hora).

Finalmente, las muestras se introdujeron en agua destilada, se deshidrataron en una batería de alcoholes de graduación ascendente (70°, 95° y 99°) y se dejaron secar al aire durante al menos 1 hora.

4.4. Exposición de los films

Los portaobjetos con las secciones se expusieron a films *Kodak BioMax MR-1* (*Amersham Bioscience*), que fueron revelados (Apéndice F-5) a los 2 (encefalina), 3 (dinorfina) y 10 (c-fos) días.

4.5. Cuantificación del marcaje

Los films fueron digitalizados (ScanMaker 9800XL, *Microtek Internacional Inc*) y se obtuvieron valores de densidad óptica con el programa de análisis de imagen *Image J 1.34s* (*NIH*). Una muestra estándar de ^{14}C (*Amersham Bioscience*) se usó para calibrar las medidas de densidad óptica y convertirlas en unidades relativas de radiactividad (nCi/g).

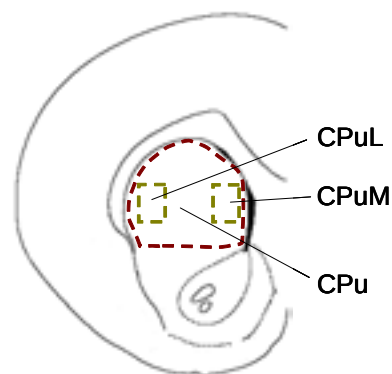


Figura 28. Representación esquemática de las regiones del CPu donde se realizaron las medidas del marcaje de hibridación *in situ* de los ARNm para encefalina, dinorfina y c-fos.

Abreviaturas: CPu, caudado putamen; CPuL, caudado putamen lateral; CPuM, caudado putamen medial

Se analizaron los dos hemisferios de dos secciones por cada animal. Las regiones analizadas fueron el CPu y sus regiones lateral y medial, tal y como se muestra en la **figura 28**.

5. Ensayos de Unión a Ligandos

Los estudios de unión a ligandos en condiciones de saturación permiten determinar la afinidad de un radioligando por un receptor y el número de sitios de unión. La afinidad viene determinada por la constante de disociación en el equilibrio (K_D) y el número de sitios de unión ($B_{\max}$) indica la densidad de receptores en membrana.

5.1. Procesamiento del tejido

Las ratas se sacrificaron mediante decapitación con guillotina tras recibir el tratamiento correspondiente según el grupo experimental (apartado 2.3).

Los cerebros se extrajeron rápidamente y se diseccionó el CPu. El tejido se congeló mediante inmersión en isopentano (*Merck*) (-40 °C) y se almacenó a una temperatura de -80 °C hasta su posterior utilización.

5.2. Preparación de las membranas celulares

Una vez conocido el peso de las muestras, el tejido se homogeneizó (homogeneizador, *Glas-Col*) en Tris-HCl 50 mM, pH 7.4 (Tris-HCl) (Apéndice A). Tras centrifugar 20 minutos a 20,000 rpm a 4 °C (Ultracentrífuga XL-90, *Beckman*), el pellet obtenido se resuspendió en Tris-HCl. Las muestras fueron incubadas a 25 °C durante 30 minutos para la eliminación de opioides endógenos del tejido.

Transcurrido este tiempo, las muestras se centrifugaron de nuevo (20 minutos a 20,000 rpm; 4 °C). El pellet resultante se resuspendió en Tris-HCl para obtener una concentración final de la muestra de 10 mg/ml. Se reservó 1 ml de la muestra final para la determinación de la cantidad de proteínas total mediante el método Bradford (Apéndice G) y al resto de la muestra se le añadió bacitracina al 0.025% (*Sigma-Aldrich*) y albúmina de suero bovino al 1% (BSA, *bovine serum albumin*; *Sigma-Aldrich*).

5.3. Protocolo de ensayos de unión a ligandos

Se realizaron estudios de saturación que se llevaron a cabo con 8 concentraciones (0.1 nM - 14 nM) de [³H]DAMGO (*PerkinElmer*), agonista específico de los receptores MOR. Las muestras se incubaron con el radioligando durante 60 minutos a 25 °C.

La unión no específica se determinó como la unión del radioligando en presencia de naloxona (antagonista de los receptores opioides) (10 μM; *Tocris Bioscience*).

5.4. Filtrado y lectura de la radioactividad

Tras la incubación, las muestras se pasaron a través de filtros de fibra de cristal (filtros GF/B, *Whatman*) y se lavaron 3 veces con 5 ml de agua destilada fría

(filtrador rápido, *Brandel*). Los filtros fueron previamente tratados con *polyethylenimine* al 2% en Tris-HCl (Apéndice A) a 4 °C durante al menos 60 minutos.

Los filtros se incubaron en líquido de centelleo (*Ecoscint H*; *Nacional Diagnostic*) durante 24 horas. Tras este periodo de tiempo se detectó el contenido de radioactividad mediante un contador de centelleo (LS 6500, *Beckman*).

5.5. Análisis de datos

La unión específica del radioligando a los receptores MOR se determinó como la cantidad de radioligando unido en ausencia de naloxona (unión total) menos la cantidad de unión en presencia de naloxona (unión no específica).

Los datos obtenidos fueron analizados mediante un análisis de regresión no lineal con el programa informático *GraphPad Prism*® 2.01 (*GraphPad Software, Inc*) para determinar la constante de disociación (K_d) y el número de sitios de unión (B_{max}).

6. Actividad locomotora

Existen diversas pruebas que permiten el estudio de la dependencia a drogas en roedores desde un punto de vista conductual. Uno de los fenómenos que se analizan es la variación en la conducta motora del animal tras la administración aguda o crónica de una droga, que puede ser valorada mediante un test en el campo abierto.

6.1. Campo abierto

El campo abierto consistió en un cajón rectangular opaco (40 x 40 cm) dividido en 25 cuadrados y se situó en una habitación iluminada con una lámpara fluorescente (350 lux).

6.2. Test de actividad locomotora

Un día antes de comenzar el experimento, los ratones se mantuvieron

durante 10 minutos en el campo abierto para su habituación al espacio. El suelo del campo abierto se limpió con agua y jabón para cada animal.

Tras la administración de las drogas o sus vehículos, según el grupo experimental correspondiente (apartado 2.4), los ratones se introdujeron inmediatamente en el centro del campo abierto.

Con la ayuda de una cámara de vídeo acoplada a un sistema informático (Smart[®] versión 1.22, *Panlab S.L.*) se contabilizó la distancia total recorrida por los animales durante 30 minutos, así como la distancia recorrida acumulada en los 3 intervalos de 10 minutos en los que se dividió el test.

7. Análisis Estadístico

Los resultados obtenidos en los distintos experimentos se analizaron según el caso mediante test estadísticos utilizando el programa informático Sigmapstat[®] 2.03 (*SPSS, Inc.*):

-Test t de Student.

-Análisis de la varianza para una variable (ANOVA de 1 vía paramétrica o no paramétrica) o para 2 variables (ANOVA de 2 vías), seguidos de los test *post hoc* de Dunn o Bonferroni según correspondiera.

Los grados de significación se establecieron en $p < 0.05$, $p < 0.01$ y $p < 0.001$.

Resultados

1. Estudio del Patrón de Expresión de c-Fos, Fos B-ΔFos B y p-CREB en el Caudado Putamen de Rata después del Tratamiento Agudo con Morfina y/o un Agonista de los Receptores Dopaminérgicos D₄

En este estudio se evaluó el efecto de la administración aguda de morfina y el agonista PD168,077, de forma separada o conjunta, sobre la expresión de c-Fos, Fos B-ΔFos B y p-CREB en el CPu de rata a lo largo del tiempo.

Para llevar a cabo este análisis se cuantificó el número de núcleos marcados mediante técnicas inmunohistoquímicas para c-Fos, Fos B-ΔFos B y p-CREB en el total del CPu y a lo largo de su eje rostro-caudal. El estudio se completó analizando los niveles de expresión del ARNm para c-fos en el CPu mediante técnicas de hibridación *in situ*.

1.1. c-Fos

La morfina induce la expresión de la proteína c-Fos en la región dorsomedial del caudado putamen de rata 2 horas después de su administración

En los animales control se observó un número bajo de núcleos c-Fos inmunorreactivos (IR) que se localizaron principalmente en la región medial del CPu, aunque también se apreciaron núcleos dispersos en la región lateral. Este patrón de expresión se repitió a lo largo de todo el eje rostro-caudal del CPu (**Fig. 29A-C**).

El marcaje inmunohistoquímico para c-Fos se incrementó ostensiblemente 2 horas después del tratamiento con morfina en la región DM del CPu, tal y como han descrito otros autores (García *et al.*, 1995; Liu *et al.*, 1994) (**Fig. 29A'-C'**), sin que se apreciaran diferencias a las ½, 4 y 6 horas. Por esta razón, la cuantificación de núcleos IR para el análisis cuantitativo se llevó a cabo exclusivamente en esta zona del CPu.

Este análisis reveló que 30 minutos después del tratamiento con morfina el número de núcleos IR para c-Fos era igual que en los animales control (**Fig. 30**). En los animales sacrificados a las 2 horas se produjo un importante incremento en el número de núcleos IR (+76.2%). A las 4 y 6 horas después del tratamiento con morfina sólo se observó un ligero incremento respecto a los grupos control (+18.8% y +20.6% respectivamente).

El análisis estadístico de los datos mediante un ANOVA de dos vías mostró que los efectos sobre la expresión de c-Fos asociados a la interacción de los factores tiempo de supervivencia y tratamiento eran significativos ($F=21.5$, $p<0.001$), así como los cambios debidos a estos factores de forma individual (tiempo de supervivencia $F=21.5$, $p<0.001$; tratamiento $F=43.9$, $p<0.001$). El test *post hoc* de Bonferroni confirmó que el incremento del número de núcleos c-Fos observado a las 2, 4 y 6 horas en los animales tratados con morfina fue significativo (**Fig. 30**).

Debido a la existencia de un gradiente de expresión de los receptores MOR en el eje rostro-caudal del CPu (Arvidsson *et al.*, 1995; Svingos *et al.*, 1996), se realizó el mismo tipo de análisis descrito anteriormente pero cuantificando el número de núcleos IR de forma independiente en los niveles rostrales, medios y caudales.

Como se recoge en la **tabla 13**, en los tres niveles del CPu se produjo la inducción de la expresión de c-Fos 2 horas después del tratamiento con morfina ($p<0.001$), sin que hubiera diferencias significativas en la magnitud del efecto entre dichos niveles ($F=1.3$, n.s.). Respecto a los animales sacrificados a los 30 minutos, no se observaron cambios en el número de núcleos IR en el eje rostro-caudal ($F=0.6$, n.s.) debido al tratamiento ($F=0.1$, n.s.). A las 4 horas, la administración de la sustancia opioide tampoco tuvo un efecto significativo ($F=0.3$, n.s.) en los niveles rostrales, medios y caudales ($F=3.5$, n.s.). En los animales sacrificados a las 6 horas,

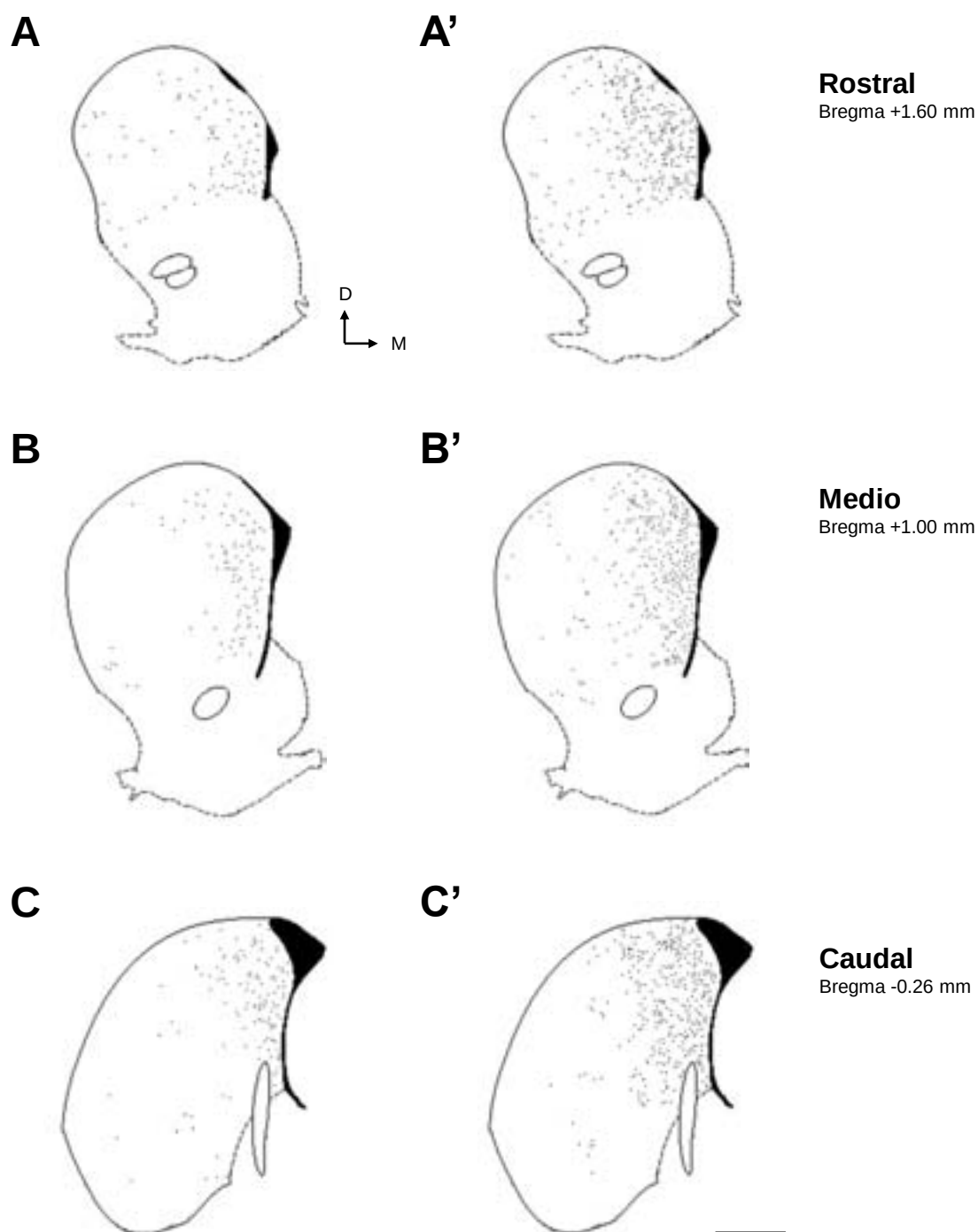


Figura 29. Patrón de expresión de la proteína c-Fos en el caudado putamen de rata tras la administración aguda de morfina.

A-C Esquemas representativos de la expresión de c-Fos en animales control en los niveles rostrales (**A**), medios (**B**) y caudales (**C**) del caudado putamen.

A'-C' Esquemas representativos de la expresión de c-Fos en animales tratados con morfina y sacrificados a las 2 horas en los niveles rostrales (**A'**), medios (**B'**) y caudales (**C'**) del caudado putamen.

Barra: 1mm

Abreviaturas: D, dorsal; M, medial

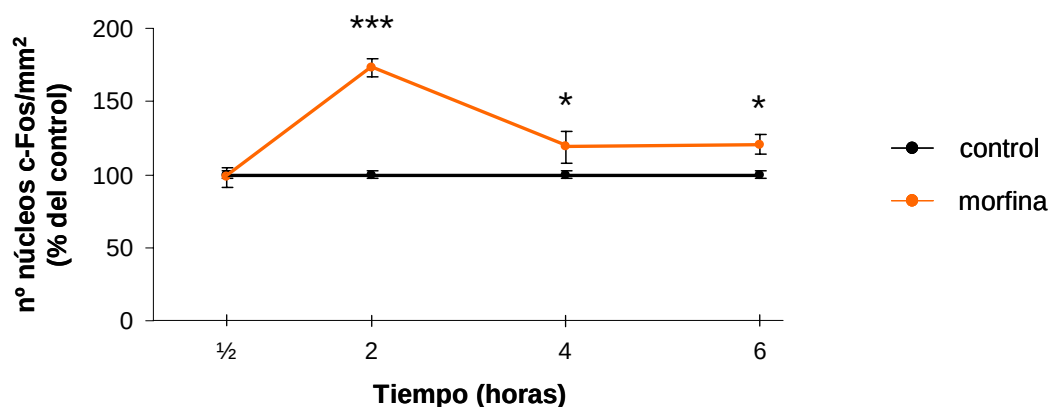


Figura 30. Número de núcleos inmunorreactivos para c-Fos por mm^2 en la región dorso-medial del caudado putamen a distintos tiempos ($\frac{1}{2}$, 2, 4 y 6 horas) después del tratamiento agudo con morfina. Los valores representan porcentajes respecto al grupo control y se expresan como media $\pm$ EEM. ANOVA de dos vías (tiempo de supervivencia $\times$ tratamiento) seguido del test *post hoc* de Bonferroni; *** $p < 0.001$, * $p < 0.05$ vs. control.

Tabla 13. Número de núcleos inmunorreactivos para c-Fos por mm^2 en niveles rostrales, medios y caudales del caudado putamen a distintos tiempos ($\frac{1}{2}$, 2, 4, 6 horas) después del tratamiento agudo con morfina.

Tiempo (horas)	Tratamiento	Niveles rostrales	Niveles medios	Niveles caudales
$\frac{1}{2}$	Control	100.0 $\pm$ 3.1	100.0 $\pm$ 5.9	100.0 $\pm$ 4.2
	Morfina	108.3 $\pm$ 8.0	86.8 $\pm$ 12.2	97.4 $\pm$ 13.5
2	Control	100.0 $\pm$ 3.2	100.0 $\pm$ 3.5	100.0 $\pm$ 2.4
	Morfina	186.7 $\pm$ 16.4 ***	182.2 $\pm$ 9.3 ***	161.5 $\pm$ 9.7 ***
4	Control	100.0 $\pm$ 6.8	100.0 $\pm$ 4.6	100.0 $\pm$ 4.4
	Morfina	114.3 $\pm$ 22.6	130.9 $\pm$ 22.8	112.9 $\pm$ 14.8
6	Control	100.0 $\pm$ 6.8	100.0 $\pm$ 4.1	100.0 $\pm$ 4.8
	Morfina	152.2 $\pm$ 14.2 ***	120.2 $\pm$ 8.9	99.8 $\pm$ 6.2

Los valores representan porcentajes respecto al grupo control y se expresan como media $\pm$ EEM. ANOVA de dos vías (tratamiento $\times$ nivel del CPu) para cada punto de la curva de tiempo seguido del test *post hoc* de Bonferroni; *** $p < 0.001$ vs. control.

el tratamiento ($F=15.7$, $p<0.001$) aumentó significativamente el número de núcleos c-Fos positivos (+52.2%, $p<0.001$) en los niveles rostrales, aunque no en los niveles medios y caudales.

El tratamiento agudo con morfina no modifica los niveles de ARNm para c-fos en la región medial del caudado putamen de rata

La expresión de ARNm para c-fos también se analizó a lo largo del tiempo en animales a los que se les administró morfina de forma aguda.

El marcaje obtenido mediante hibridación *in situ* reveló que la expresión del ARNm para c-fos en animales control es más abundante en la región medial que en la lateral (**Fig. 31A-C**), por lo que la cuantificación se realizó sólo en la región medial del CPu.

El tratamiento agudo con morfina no modificó los niveles de ARNm para c-fos (**Fig. 31 y 32**) respecto al grupo control en ninguno de los tiempos analizados ($\frac{1}{2}$, 2 y 4 horas después del tratamiento) ($F=0.2$, n.s.).

La activación aguda de los receptores dopaminérgicos D_4 modifica la expresión de la proteína c-Fos en la región dorsomedial del caudado putamen de rata

Como ya se describió anteriormente, el marcaje inmunocitoquímico para c-Fos en el CPu de los animales control se localizó principalmente en la región DM a lo largo del eje rostro-caudal de este núcleo (**Fig. 29A-C y 33A-C**). La distribución de los núcleos IR en los animales tratados de forma aguda con PD168,077 y sacrificados a las $\frac{1}{2}$ y 4 horas fue similar (**Fig. 33A'-C''**), aunque se apreció un ligero incremento del número de núcleos IR en los animales sacrificados a los 30 minutos (**Fig. 33A'-C'**) y una disminución a las 4 horas (**Fig. 33A''-C''**). En los animales sacrificados a las 2 y 6 horas no se apreciaron cambios.

La administración aguda del agonista de los receptores D_4 provocó un aumento (+23.6%) en el número de núcleos IR para c-Fos $\frac{1}{2}$ hora después del tratamiento respecto al grupo control, mientras que a las 4 horas se observó una disminución (-20.3%). A las 2 y 6 horas no se hallaron cambios significativos debido al tratamiento (**Fig. 34**).

El análisis estadístico de los datos obtenidos en los distintos puntos de la curva de tiempo se realizó mediante un ANOVA de dos vías. Éste indicó que la interacción de los factores tiempo de supervivencia y tratamiento ($F=5.4$, $p<0.01$) tuvo un efecto significativo sobre la expresión de c-Fos. Sin embargo, al analizar el efecto de los factores por separado, los cambios asociados al tiempo de supervivencia fueron significativos ($F=5.4$, $p<0.01$), mientras que los asociados al tratamiento no ($F=2.5$, n.s.). El test *post hoc* de Bonferroni confirmó que tanto el incremento del número de núcleos IR para c-Fos observado a los 30 minutos del tratamiento, como el descenso del mismo a las 4 horas, fueron significativos respecto a los grupos control ($\frac{1}{2}$ hora $p<0.01$; 4 horas $p<0.05$) (**Fig. 34**).

Los receptores D_4 también presentan un gradiente de expresión en el CPu (Rivera *et al.*, 2002a), por lo que para completar este estudio se analizó el efecto del agonista PD168,077 en el eje rostro-caudal. Como se muestra en la **tabla 14**, a la $\frac{1}{2}$ hora del tratamiento sólo hubo inducción de c-Fos en los niveles medios y caudales ($F=20.2$, $p<0.001$), sin que hubiera diferencias en la intensidad del efecto entre estos niveles ($F=1.5$, n.s.). Cuatro horas después de la administración del agonista PD168,077, el descenso del número de núcleos IR para c-Fos sólo fue significativo en los niveles caudales ($F=9.6$, $p<0.01$). No se encontraron diferencias significativas asociadas a la administración de PD168,077 ni a las 2 ($F=3.2$, n.s.) ni a las 6 horas ($F=0.5$, n.s.) en ninguno de los niveles del CPu (2 horas, $F=0.4$, n.s.; 6 horas, $F=2.0$, n.s.).

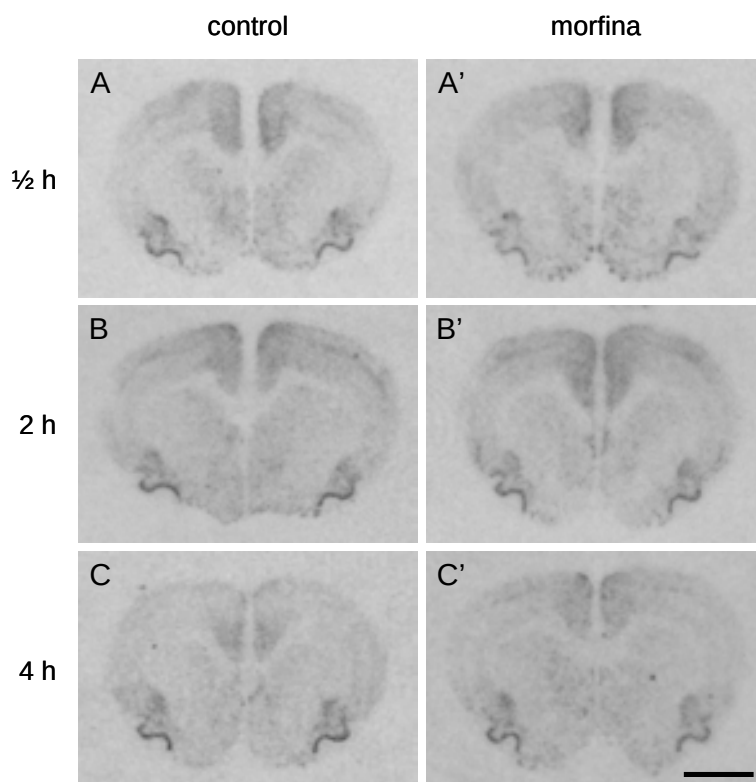


Figura 31. Autorradiogramas representativos del marcaje del ARNm para c-fos en el caudado putamen obtenido mediante hibridación *in situ* en ratas control (A-C) y en ratas tratadas de forma aguda con morfina (A'-C') y sacrificadas a distintos tiempos ($\frac{1}{2}$, 2 y 4 horas).

Barra: 500 mm

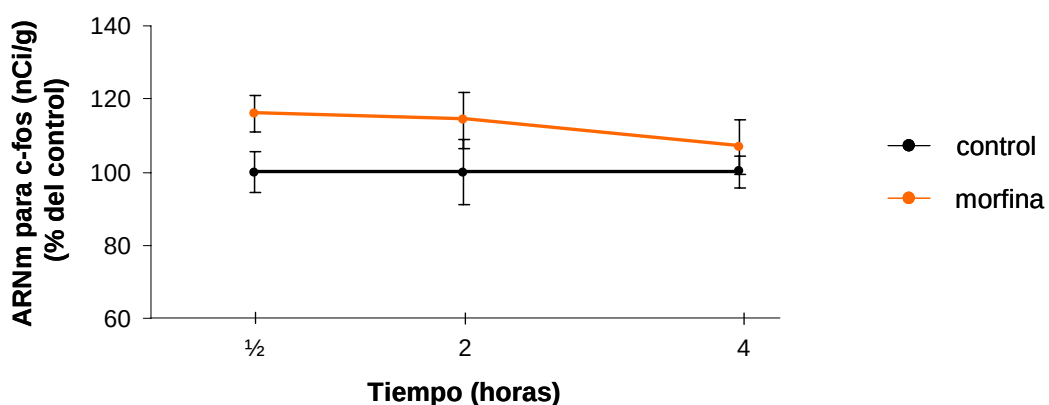


Figura 32. Niveles de ARNm (nCi/g) para c-fos en la región medial del caudado putamen de rata a distintos tiempos ($\frac{1}{2}$, 2, 4 horas) después del tratamiento agudo con morfina. Los valores representan porcentajes respecto al grupo control y se expresan como media $\pm$ EEM. ANOVA de dos vías (tiempo de supervivencia $\times$ tratamiento) seguido del test *post hoc* de Bonferroni.

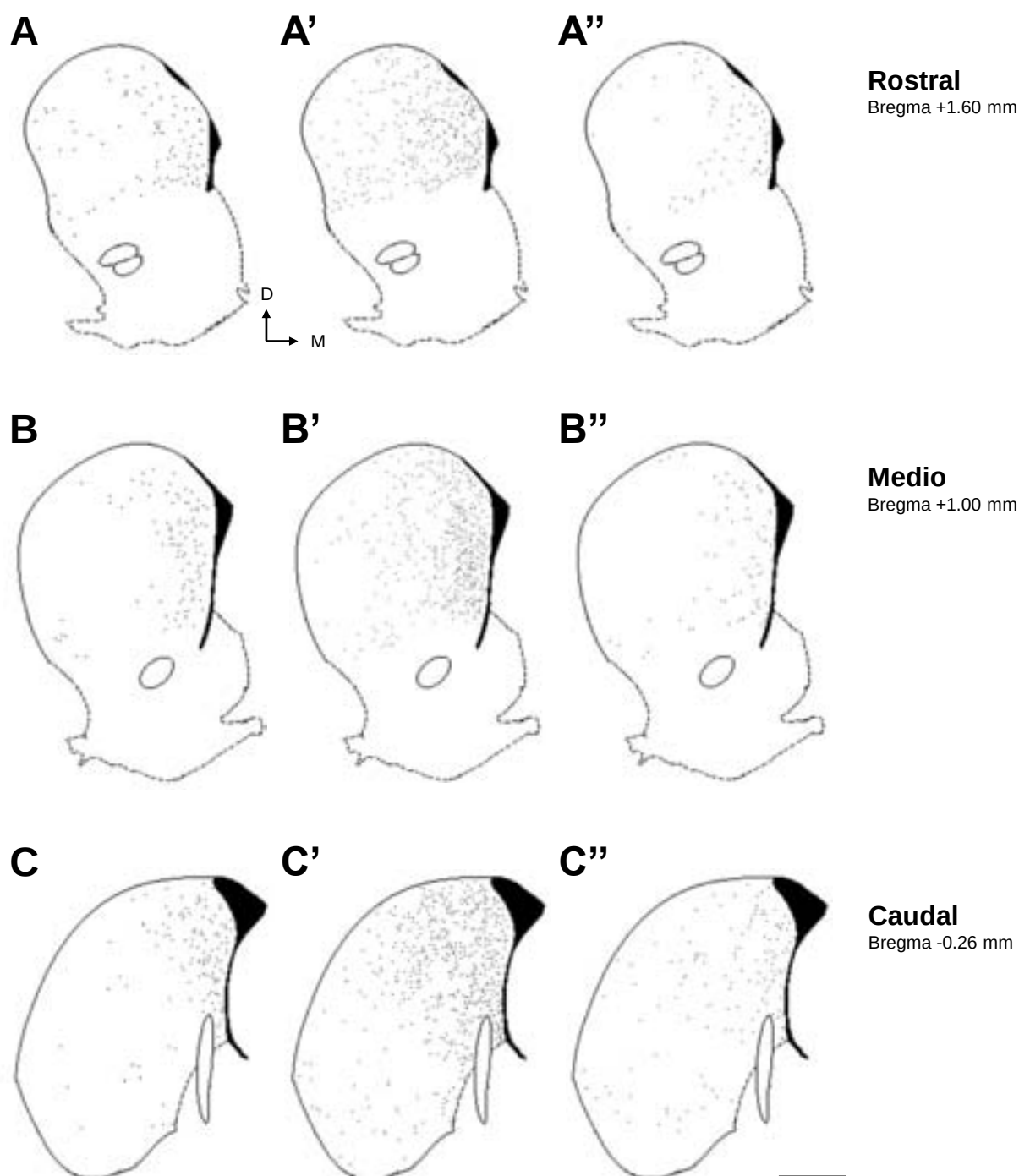


Figura 33. Patrón de expresión de la proteína c-Fos en el caudado putamen de rata tras la administración aguda de PD168,077.

A-C Esquemas representativos de la expresión de c-Fos en animales control en los niveles rostrales (**A**), medios (**B**) y caudales (**C**) del caudado putamen.

A'-C' Esquemas representativos de la expresión de c-Fos en animales tratados con PD168,077 y sacrificados a la ½ hora en los niveles rostrales (**A'**), medios (**B'**) y caudales (**C'**) del caudado putamen.

A''-C'' Esquemas representativos de la expresión de c-Fos en animales tratados con PD168,077 y sacrificados a las 4 horas en los niveles rostrales (**A''**), medios (**B''**) y caudales (**C''**) del caudado putamen.

Barra: 1mm

Abreviaturas: D, dorsal; M, medial

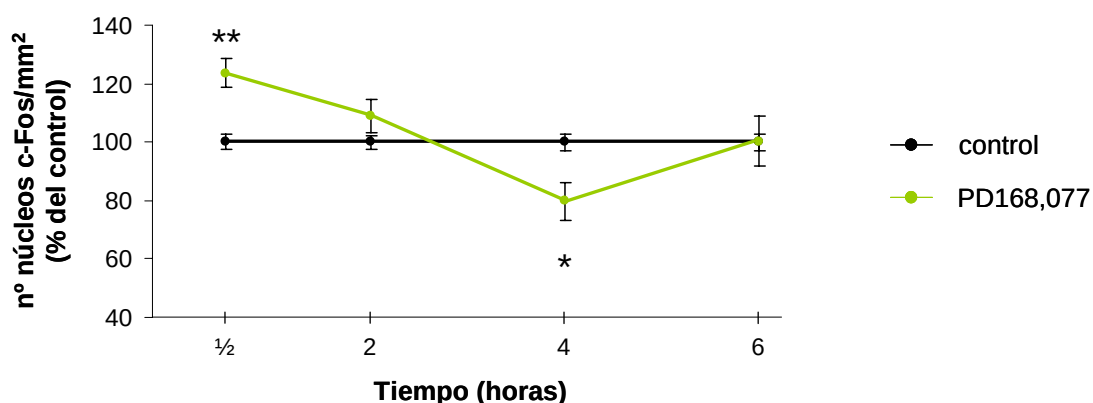


Figura 34. Número de núcleos inmunorreactivos para c-Fos por mm² en la región dorso-medial del caudado putamen a distintos tiempos (1/2, 2, 4 y 6 horas) después del tratamiento agudo con PD168,077. Los valores representan porcentajes respecto al grupo control y se expresan como media ± EEM. ANOVA de dos vías (tiempo de supervivencia x tratamiento) seguido del test *post hoc* de Bonferroni; ** p<0.01, * p<0.05 vs. control.

Tabla 14. Número de núcleos inmunorreactivos para c-Fos por mm² en niveles rostrales, medios y caudales del caudado putamen a distintos tiempos (1/2, 2, 4 y 6 horas) después del tratamiento agudo con PD168,077.

Tiempo (horas)	Tratamiento	Niveles rostrales	Niveles medios	Niveles caudales
1/2	Control	100.0 ± 3.1	100.0 ± 5.9	100.0 ± 4.2
	PD168,077	111.4 ± 7.3	133.0 ± 5.7 ***	126.9 ± 7.7 **
2	Control	100.0 ± 3.2	100.0 ± 3.5	100.0 ± 2.4
	PD168,077	105.1 ± 12.6	118.6 ± 7.4	107.1 ± 8.4
4	Control	100.0 ± 6.8	100.0 ± 4.6	100.0 ± 4.4
	PD168,077	92.6 ± 9.5	76.6 ± 11.2	68.6 ± 13.0 **
6	Control	100.0 ± 6.8	100.0 ± 4.1	100.0 ± 4.8
	PD168,077	111.5 ± 15.2	123.2 ± 22.2	82.9 ± 10.2

Los valores representan porcentajes respecto al grupo control y se expresan como media ± EEM. ANOVA de dos vías (tratamiento x nivel del CPu) para cada punto de la curva de tiempo seguido del test *post hoc* de Bonferroni; *** p<0.001, ** p<0.01 vs. control.

La activación aguda de los receptores dopaminérgicos D₄ no modifica los niveles de ARNm para c-fos en la región medial del caudado putamen de rata

El tratamiento agudo con PD168,077 no modificó ni el patrón de distribución ni los niveles de expresión del ARNm para c-fos en la región medial del CPu en ninguno de los puntos de la curva de tiempo ($\frac{1}{2}$, 2 y 4 horas) respecto al grupo control (**Fig. 35 y 36**).

El análisis estadístico de los datos confirmó que no hubo cambios significativos asociados ni al tiempo de supervivencia ($F=0.3$, n.s.), ni al tratamiento ($F=0.1$, n.s.) ni a la interacción de ambos factores ($F=0.3$, n.s.) (**Fig. 36**).

La activación de los receptores dopaminérgicos D₄ previene la inducción de la proteína c-Fos que ocurre 2 horas después del tratamiento agudo con morfina

Debido a que 2 horas después de la administración de morfina se produjo la mayor inducción de la expresión de la proteína c-Fos, analizamos en este punto de la curva de tiempo la expresión de este factor de transcripción en animales tratados conjuntamente con PD168,077 y morfina (PD168,077 + morfina). Como se observa en la **figura 37**, el patrón de expresión de c-Fos en la región DM del CPu de los animales tratados con los dos fármacos (**Fig. 37D**) fue muy parecido al que se

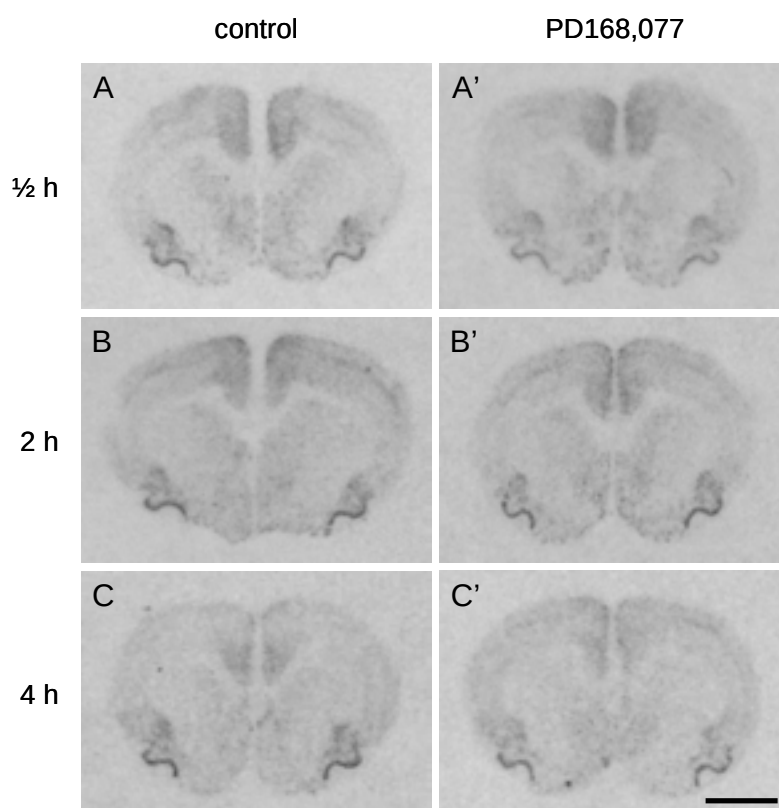


Figura 35. Autorradiogramas representativos del marcaje del ARNm para c-fos en el caudado putamen obtenido mediante hibridación *in situ* en ratas control (**A-C**) y en ratas tratadas de forma aguda con PD168,077 (**A'-C'**) y sacrificadas a distintos tiempos ($\frac{1}{2}$, 2 y 4 horas). Barra: 500 mm

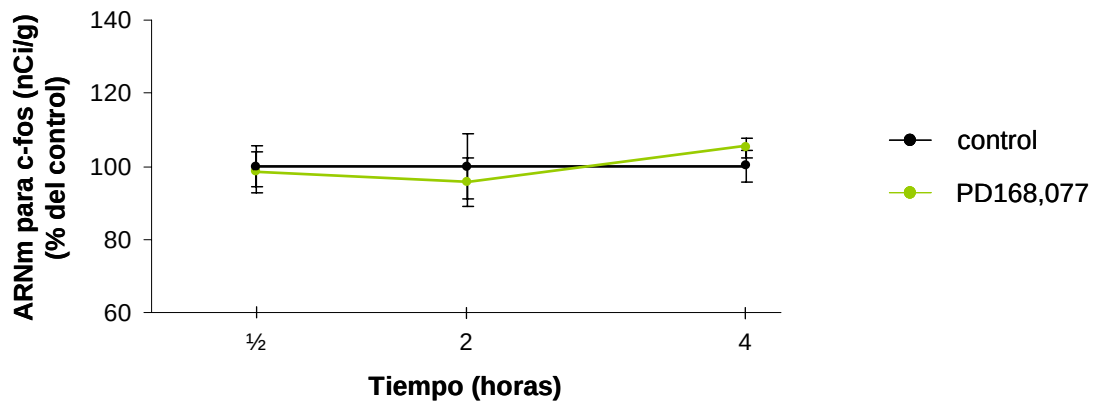


Figura 36. Niveles de ARNm (nCi/g) para c-fos en el caudado putamen de rata a distintos tiempos ($\frac{1}{2}$, 2 y 4 horas) después del tratamiento agudo con PD168,077. Los valores representan porcentajes respecto al grupo control y se expresan como media $\pm$ EEM. ANOVA de dos vías (tiempo de supervivencia x tratamiento) seguido del test *post hoc* de Bonferroni.

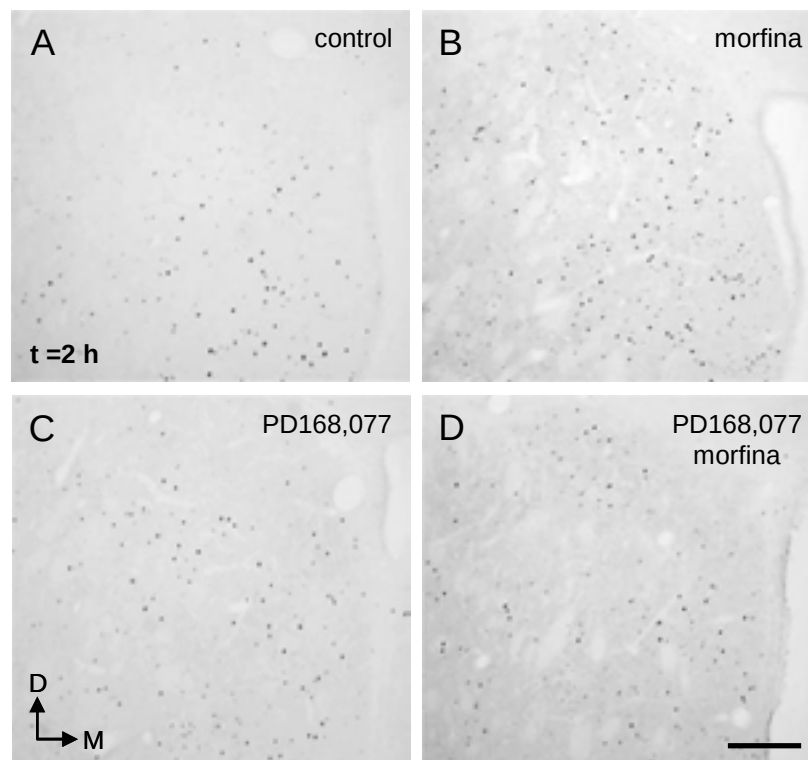


Figura 37. Microfotografías representativas de secciones coronales de cerebro de rata inmunoteñidas con anti-c-Fos que muestran núcleos inmunorreactivos para este marcador en la región dorso-medial del caudado putamen en animales control (A) y tratados con morfina (B), PD168,077 (C) y PD168,077 + morfina (D) 2 horas después de la administración de los fármacos.

Barra: 200 μ m

Abreviaturas: D, dorsal; M, medial

observó en los animales control (**Fig. 37A**) y los tratados con PD168,077 (**Fig. 37C**). Como ya se describió anteriormente, se produjo una inducción de la expresión de c-Fos en los animales tratados sólo con morfina (**Fig. 37B**).

Estas observaciones se confirmaron mediante el análisis cuantitativo del número de núcleos IR para c-Fos por mm². En los animales tratados con PD168,077 + morfina el número de núcleos IR fue similar al de los tratados únicamente con PD168,077 y al del grupo control, y menor que el de los animales tratados con morfina (**Fig. 38**).

El análisis estadístico mediante una ANOVA no paramétrico de una vía ($H=211.8$; $p<0.001$) seguido del test *post hoc* de Dunn mostró que las diferencias observadas entre los grupos tratados con morfina y PD168,077 + morfina fueron significativas ($p<0.05$), por lo que la activación de los receptores D₄ previno la inducción de c-Fos mediada por morfina (**Fig. 38**).

Para completar el estudio se analizó el efecto de los distintos tratamientos sobre el número de núcleos IR para c-Fos en la región DM del CPu a lo largo de su eje rostro-caudal en este punto de la curva de tiempo. Como ya se indicó anteriormente, el tratamiento con morfina aumentó significativamente la expresión de c-Fos de igual manera en los niveles rostrales,

medios y caudales del CPu, mientras que el tratamiento con PD168,077 no la modificó (**Tablas 13 y 14; Fig. 39**). Al analizar el efecto del cotratamiento de PD168,077 + morfina se observó que la activación de los receptores D₄ previno por completo y de manera significativa la inducción de c-Fos por morfina en los tres niveles del CPu ($F=59.6$, $p<0.001$) (**Fig. 39**).

La administración del antagonista dopaminérgico L745,870 confirma la especificidad del efecto mediado por el agonista de los receptores D₄

Para comprobar que el bloqueo de la inducción por morfina de c-Fos mediante PD168,077 se debía específicamente a la activación de los receptores D₄, se llevó a cabo un experimento control. Para ello, se administró el antagonista selectivo de los receptores D₄ L745,870 a animales tratados posteriormente con PD168,077 + morfina.

El análisis cualitativo de secciones del CPu inmunoteñidas para c-Fos mostró que el tratamiento con L745,870 no modificó la expresión de este factor de transcripción respecto al grupo control (**Fig. 40E**). Sin embargo, los animales tratados con los tres fármacos conjuntamente presentaron un número de núcleos IR mayor que el de los animales control y similar al del grupo tratado sólo con morfina (**Fig. 40**).

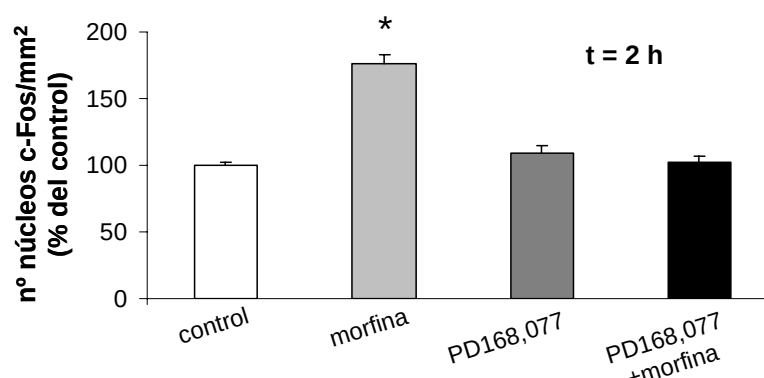


Figura 38. Número de núcleos inmunorreactivos para c-Fos por mm² en la región dorso-medial del caudado putamen en animales sacrificados 2 horas después del tratamiento agudo con morfina precedido o no de la administración del agonista PD168,077. Los valores representan porcentajes respecto al grupo control y se expresan como media $\pm$ EEM. ANOVA no paramétrico de una vía seguido del test *post hoc* de Dunn; * $p<0.05$ vs. control, PD168,077, PD168,077 + morfina.

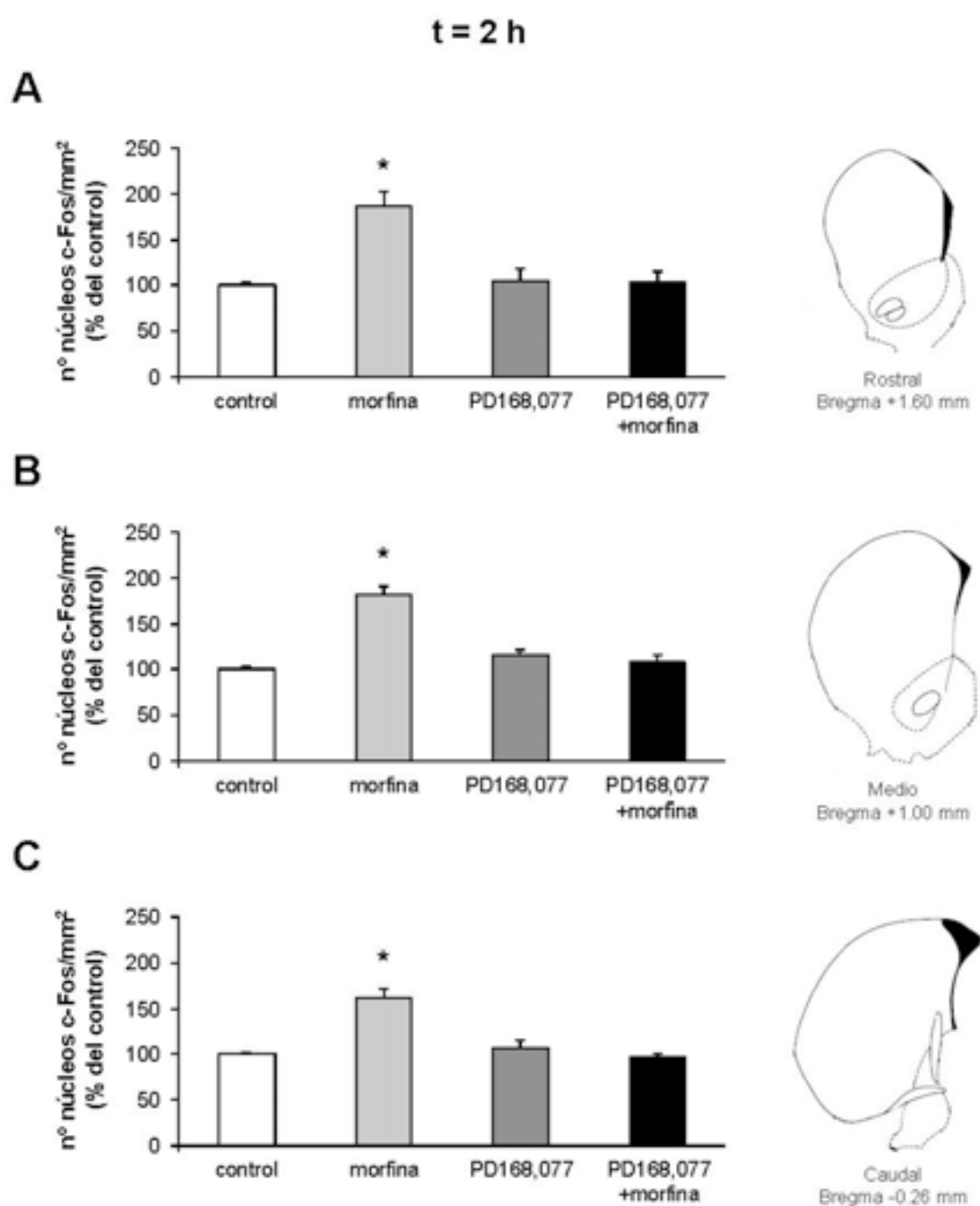


Figura 39. Número de núcleos c-Fos IR por mm² en la región dorso-medial del caudado putamen en los niveles rostrales (A), medios (B) y caudales (C) en animales sacrificados 2 horas después del tratamiento con morfina precedido o no de la administración de PD168,077. Los valores representan porcentajes respecto al grupo control y se expresan como media $\pm$ EEM. ANOVA de dos vías (tratamiento $\times$ nivel del CPu) seguido del test *post hoc* de Bonferroni; * $p < 0.05$ vs. control, PD168,077 y PD168,077 + morfina.

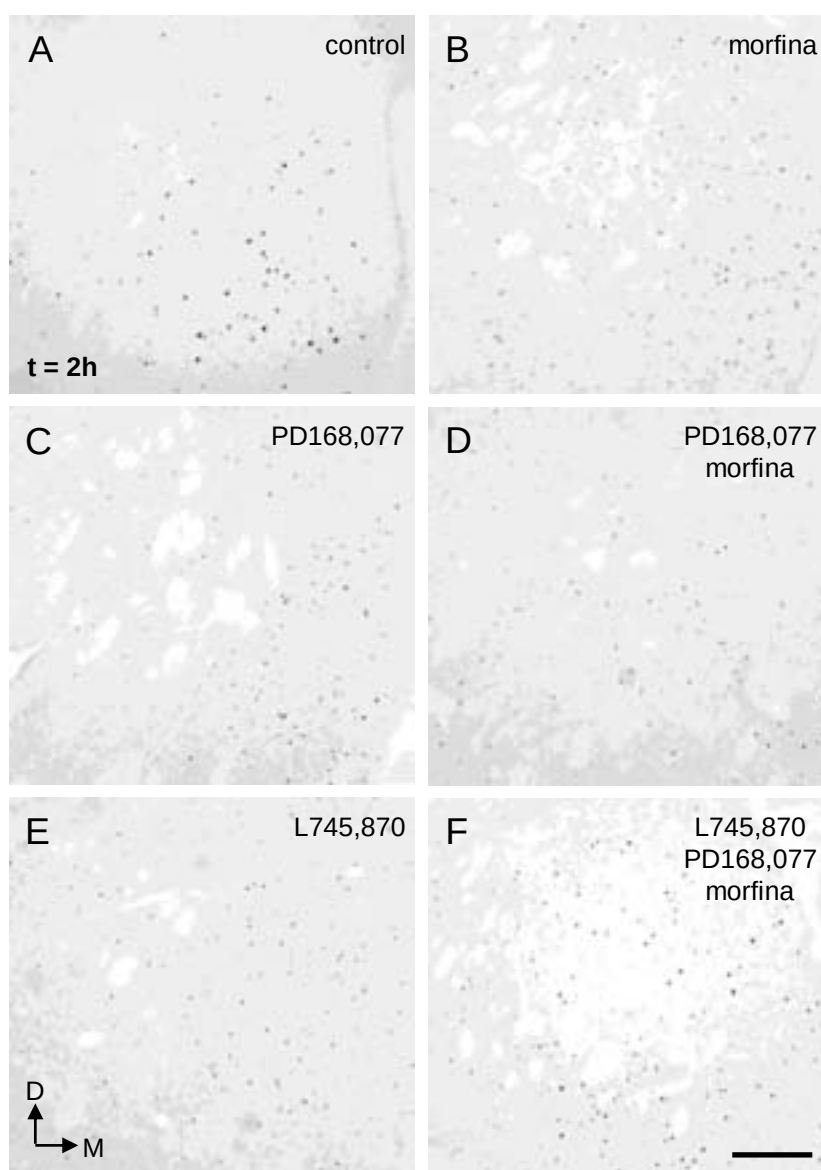


Figura 40. Microfotografías representativas de secciones coronales de cerebro de rata inmunoteñidas con anti-c-Fos que muestran núcleos inmunoreactivos para este marcador en la región dorso-medial del caudado putamen en animales control (**A**), y tratados con morfina (**B**), PD168,077 (**C**), PD168,077 + morfina (**D**), L745,870 (**E**), y L745,870 + PD168,077 + morfina (**F**) 2 horas después de la administración de los fármacos.

Barra: 200 μ m

Abreviaturas: D, dorsal; M, medial

La cuantificación del número de núcleos IR para c-Fos y el análisis estadístico de los datos mediante un ANOVA de una vía no paramétrica ($H=139.6$; $p<0.001$) (**Fig. 41**) confirmó que el tratamiento con L745,870 no modificó la expresión de c-Fos de manera significativa. Sin embargo, el número de núcleos IR tras el tratamiento con L745,870 + PD168,077 + morfina fue mayor que el observado en el grupo control (+80.8%, $p<0.05$) y que en el grupo de animales tratados con PD168,077 + morfina (+82.5%, $p<0.05$). Al comparar el efecto del tratamiento con los tres fármacos con el efecto de la morfina no se detectaron diferencias significativas, por lo que el tratamiento con L745,870 bloqueó el efecto del agonista de los receptores D_4 .

También se analizaron los cambios en el número de núcleos IR c-Fos IR a lo largo del eje rostro-caudal. El antagonista de los receptores D_4 incrementó el número de núcleos IR (+58.4%, $p<0.001$) en los niveles rostrales, aunque no lo modificó en los niveles medios y caudales (**Fig. 42**). Por otro lado, el tratamiento con L745,870 bloqueó el efecto del agonista PD168,077 con igual intensidad en los tres niveles del CPu (**Fig. 42**). El ANOVA de dos vías (tratamiento x nivel del CPu) indicó que las

variaciones observadas estaban asociadas de manera significativa a la interacción de ambos factores ($F=2.3$, $p<0.05$) y a cada uno de ellos de manera independiente (nivel del CPu $F=5.4$, $p<0.01$; tratamiento $F=45.6$, $p<0.001$) (**Fig. 42**).

La activación de los receptores dopaminérgicos D_4 tiene un efecto doble y contrapuesto a lo largo del tiempo sobre la inducción de c-Fos mediada por morfina

Aunque inicialmente se planteó el estudio del efecto de la administración de los dos fármacos agonistas en la expresión de c-Fos a las 2 horas, debido a que es cuando se produce la mayor inducción por morfina, se quiso completar el estudio analizando el efecto de la coadministración de PD168,077 y morfina a lo largo del tiempo ($\frac{1}{2}$, 2, 4 y 6 horas).

El estudio cualitativo de las secciones inmunoteñidas no mostró cambios en la expresión de la proteína c-Fos a la $\frac{1}{2}$ hora después del cotratamiento. A las 4 y 6 horas de la administración de PD168,077 + morfina el número de núcleos IR sí aumentó (**Fig. 43**).

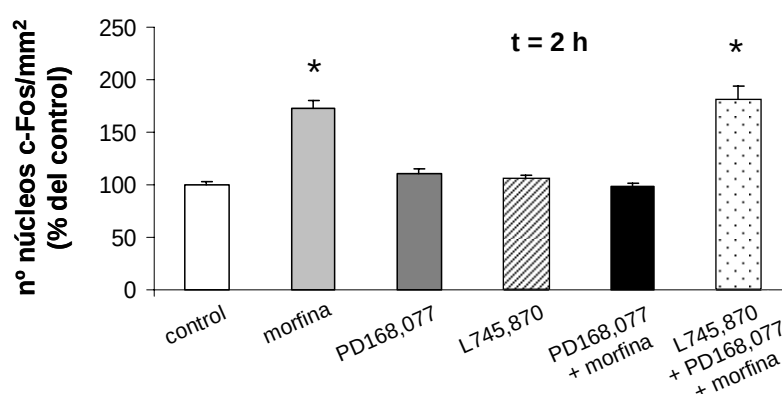


Figura 41. Número de núcleos inmunorreactivos para c-Fos por mm^2 en la región dorso-medial del caudado putamen 2 horas después de la administración de los distintos tratamientos. Los valores representan porcentajes respecto al grupo control y se expresan como media $\pm$ EEM. ANOVA no paramétrico de una vía seguido del test *post hoc* de Dunn; * $p<0.05$ vs. control, PD168,077, L745,870, PD168,077 + morfina.

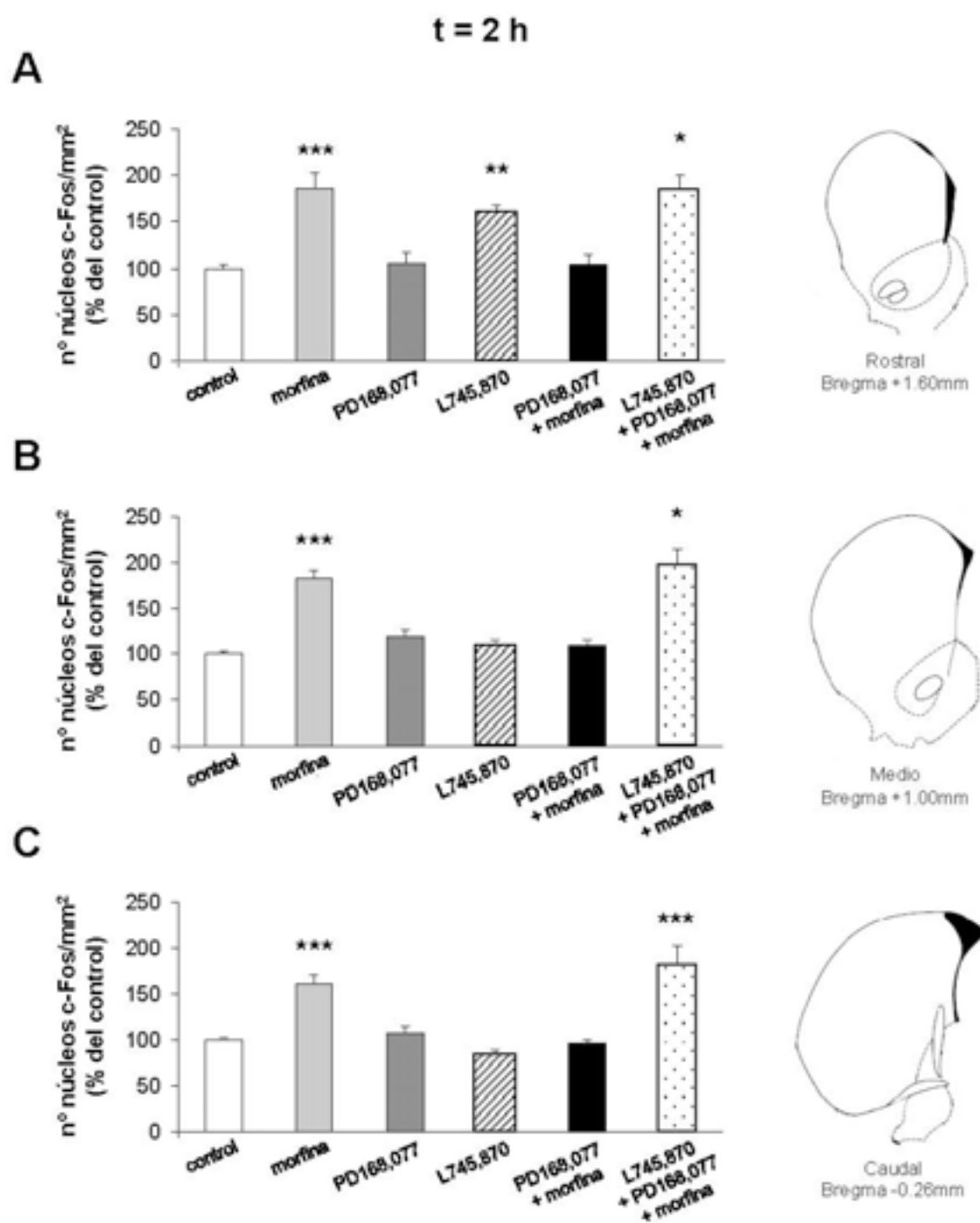


Figura 42. Número de núcleos c-Fos IR por mm² en la región dorso-medial del caudado putamen en los niveles rostrales (A), medios (B) y caudales (C) en animales sacrificados 2 horas después del tratamiento con morfina precedida o no del tratamiento con L745,870 y/o PD168,077. Los valores representan porcentajes respecto al grupo control y se expresan como media $\pm$ EEM. ANOVA de dos vías (tratamiento $\times$ nivel del CPu) seguido del test *post hoc* de Bonferroni; *** $p < 0.001$ vs. control, PD168,077, L745,870, PD168,077 + morfina; ** $p < 0.01$ vs. control, PD168,077, PD168,077 + morfina; + $p < 0.05$ vs. control, PD168,077, L745,870, PD168,077 + morfina.

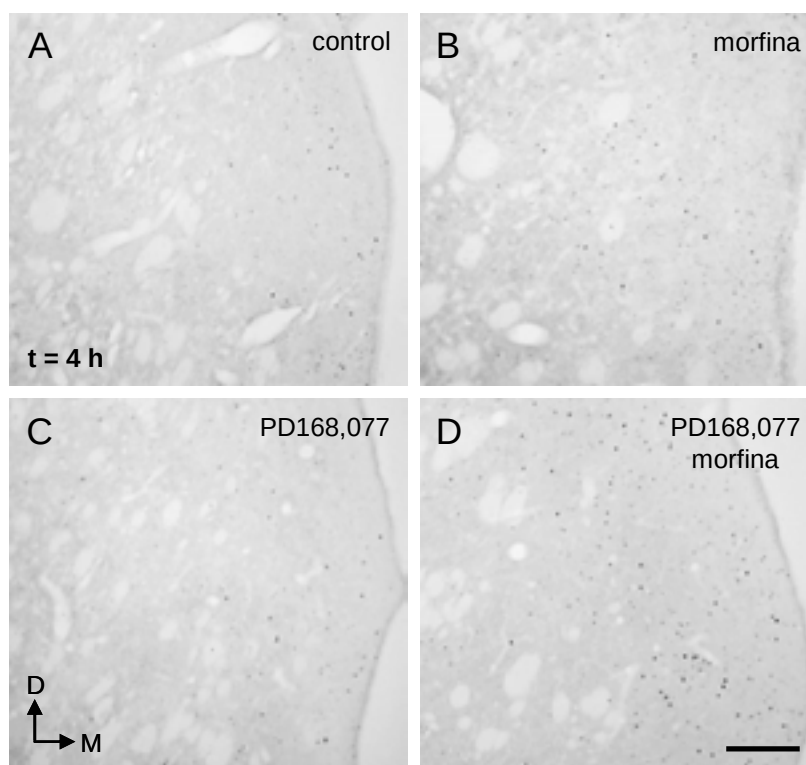


Figura 43. Microfotografías representativas de secciones coronales de cerebro de rata inmunoteñidas con anti-c-Fos que muestran núcleos inmunorreactivos para este marcador en la región dorso-medial del caudado putamen en animales control (**A**) y tratados con morfina (**B**), PD168,077 (**C**) y PD168,077 + morfina (**D**) 4 horas después de la administración de los fármacos.

Barra: 200 μ m

Abreviaturas: D, dorsal; M,medial

Como se puede observar en la **figura 44**, la cuantificación del número de núcleos IR para c-Fos mostró que después de $\frac{1}{2}$ hora ningún tratamiento modificó la expresión de c-Fos. Como se indicó también anteriormente, en los animales sacrificados a las 2 horas, la administración de PD168,077 previno el aumento de la expresión de c-Fos inducido por morfina. Sin embargo, la coadministración de PD168,077 y morfina incrementó la expresión de c-Fos tanto a las 4 (+ 294.3%) como a las 6 horas (+ 144.8%).

El análisis estadístico mediante un ANOVA de dos vías mostró que los efectos sobre la expresión de c-Fos estaban asociados a la interacción de los factores tiempo de supervivencia y tratamiento administrado ($F=60.2$, $p<0.001$) y a estos factores de forma independiente (tiempo de supervivencia $F=31.4$, $p<0.001$; tratamiento $F=108.0$, $p<0.001$) (**Fig. 44**). El test *post hoc* de Bonferroni confirmó que el cotratamiento potenció la inducción de c-Fos tanto a las 4 como a las 6 horas ($p<0.001$), aunque el efecto fue mayor a las 4 horas ($p<0.001$).

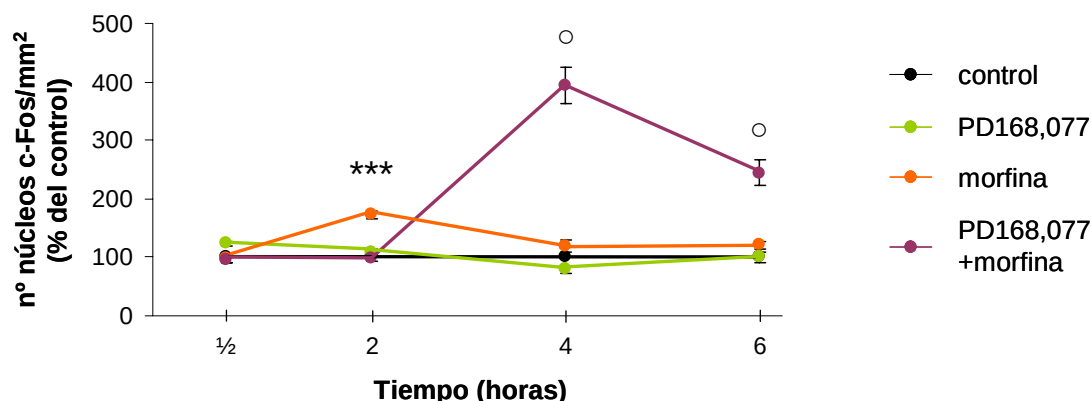


Figura 44. Número de núcleos inmunorreactivos para c-Fos por mm^2 en la región dorso-medial del caudado putamen de rata a lo largo del tiempo ($\frac{1}{2}$, 2, 4, 6 horas) después del tratamiento con morfina, precedido o no de la administración de PD168,077. Los valores representan porcentajes respecto al grupo control y se expresan como media $\pm$ EEM. ANOVA de dos vías (tiempo de supervivencia $\times$ tratamiento) seguido del test *post hoc* de Bonferroni, *** $p < 0.001$ morfina vs. control, PD168,077, PD168,077 + morfina; ○ $p < 0.001$ PD168,077 + morfina vs. control, morfina, PD168,077.

Los efectos de los distintos tratamientos en cada punto de la curva de tiempo fueron analizados a lo largo del eje rostro-caudal del CPu. En los animales sacrificados 30 minutos después de los tratamientos no se observaron cambios significativos en los niveles rostrales, medios y caudales del CPu (Fig. 45). Como ya se ha descrito antes, a las 2 horas el tratamiento con morfina indujo la expresión de c-Fos con igual intensidad a lo largo del eje rostro-caudal, y la activación de los receptores D_4 revirtió este efecto también en los tres niveles del núcleo (Fig. 39). Cuatro horas después de los tratamientos (Fig. 46), la administración de PD168,077 junto con morfina indujo la expresión de c-Fos en todo el eje rostro-caudal ($p < 0.001$ en los tres niveles), siendo mayor el efecto en los niveles rostrales (+455.9%) que en los caudales (+146%), por lo que existe un gradiente rostro-caudal en el efecto ($p < 0.001$). Por último, a las 6 horas (Fig. 47), la administración conjunta de PD168,077 y morfina también aumentó el número de núcleos c-Fos positivos en los tres niveles del eje rostro-caudal del CPu,

pero sin que hubiera diferencias significativas (niveles rostrales +104.8%; niveles medios 162.4%; niveles caudales 154.9%).

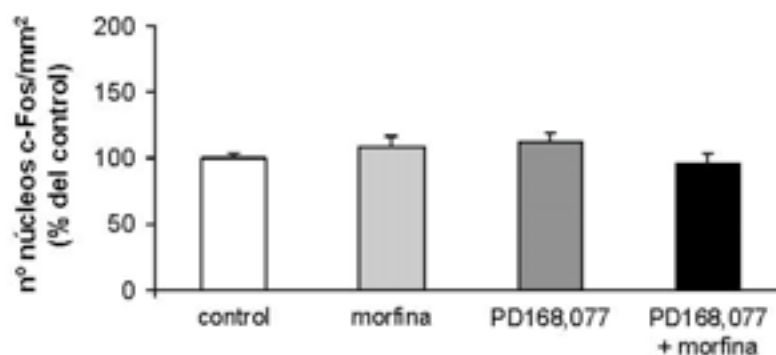
La coadministración de morfina y PD168,077 incrementa los niveles de expresión del ARNm para c-fos 2 horas después del tratamiento

Al analizar el efecto del tratamiento conjunto de PD168,077 + morfina, se observó a las 2 horas un incremento (+18.2%, $p < 0.001$) de los niveles de ARNm para c-fos en la región medial del CPu respecto al grupo control (Fig. 48 y 49). No se hayaron cambios ni a los 30 minutos ni a las 4 horas.

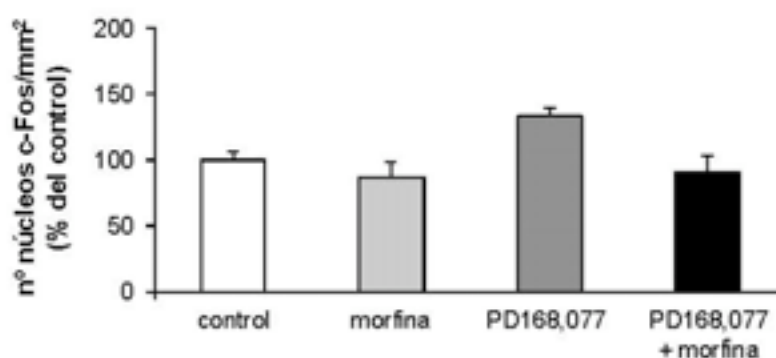
El ANOVA de dos vías (tiempo de supervivencia $\times$ tratamiento) indicó que los efectos sobre los niveles de ARNm para c-fos estaban asociados de forma significativa al factor tratamiento ($F = 4.3$, $p < 0.01$) y a su interacción con el factor tiempo de supervivencia ($F = 2.3$, $p < 0.05$), pero no a este segundo factor de forma individual ($F = 1.3$, n.s.).

t = ½ h

A



B



C

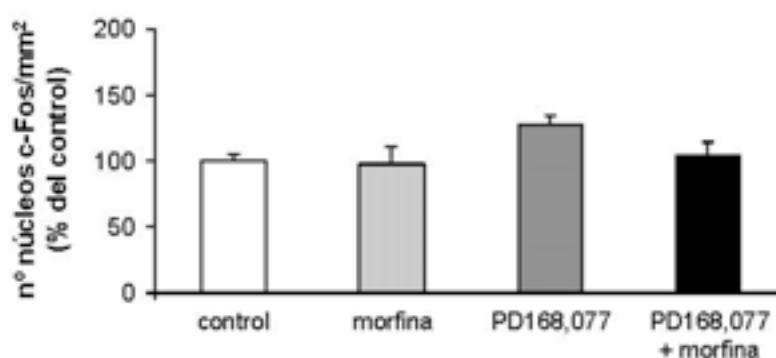


Figura 45. Número de núcleos c-Fos IR por mm² en la región dorso-medial del caudado putamen en los niveles rostrales (A), medios (B) y caudales (C) en animales sacrificados ½ hora después del tratamiento agudo con morfina precedido o no de la administración de PD168,077. Los valores representan porcentajes respecto al grupo control y se expresan como media ± EEM. ANOVA de dos vías (tratamiento x nivel del CPu) seguido del test *post hoc* de Bonferroni.

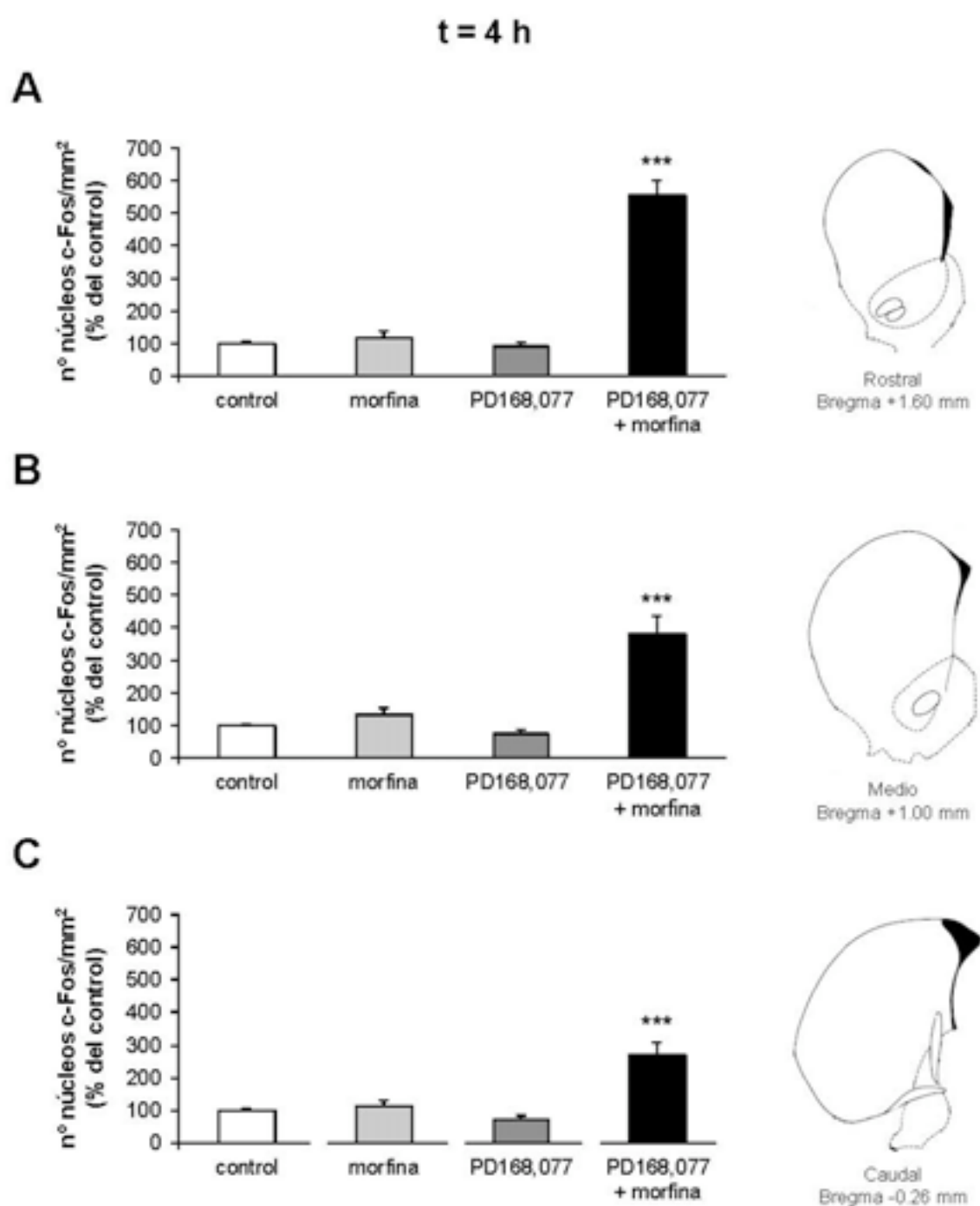


Figura 46. Número de núcleos c-Fos IR por mm² en la región dorso-medial del caudado putamen en los niveles rostrales (A), medios (B) y caudales (C) en animales sacrificados 4 horas después del tratamiento con morfina precedido o no de la administración de PD168,077. Los valores representan porcentajes respecto al grupo control y se expresan como media $\pm$ EEM. ANOVA de dos vías (tratamiento $\times$ nivel del CPu) seguido del test *post hoc* de Bonferroni; *** $p < 0.001$ vs. control, morfina, PD168,077.

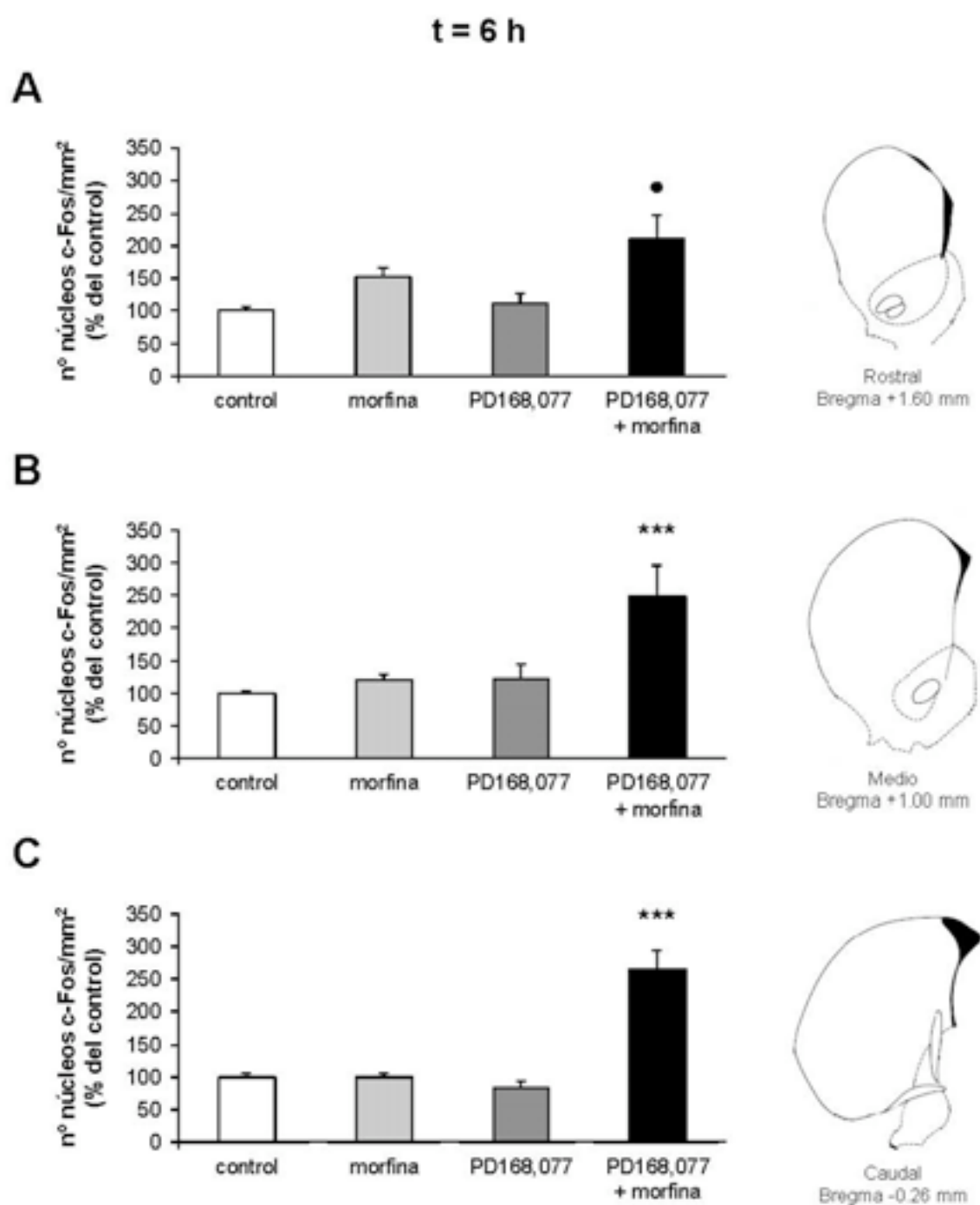


Figura 47. Número de núcleos c-Fos IR por mm² en la región dorso-medial del caudado putamen en los niveles rostrales (A), medios (B) y caudales (C) en animales sacrificados 6 horas después del tratamiento con morfina precedido o no de la administración de PD168,077. Los valores representan porcentajes respecto al grupo control y se expresan como media $\pm$ EEM. ANOVA de dos vías (tratamiento $\times$ nivel del CPu) seguido del test *post hoc* de Bonferroni; • $p < 0.001$ vs. control; *** $p < 0.001$ vs. control, morfina, PD168,077.

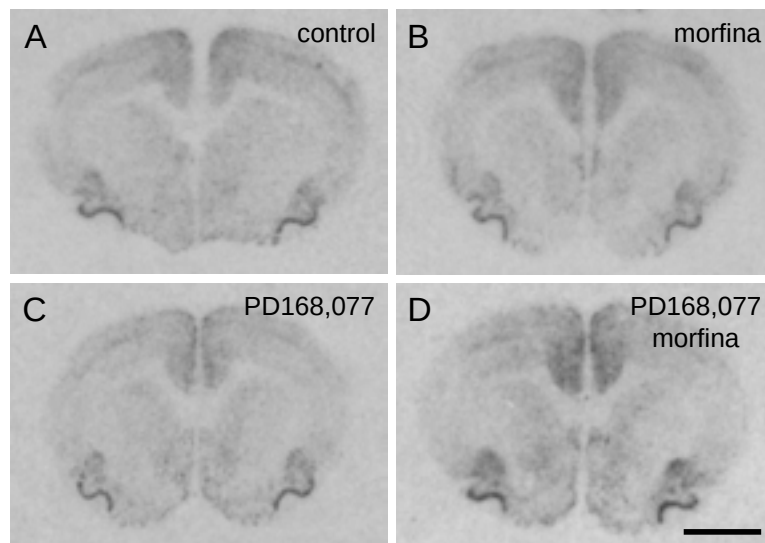


Figura 48. Autorradiogramas representativos del marcaje del ARNm para c-fos en el caudado putamen obtenido mediante hibridación *in situ* en ratas control (A) y ratas tratadas con morfina (B), PD168,077 (C) y PD168,077 + morfina (D) y sacrificadas 2 horas después de recibir los tratamientos. Barra: 500 mm

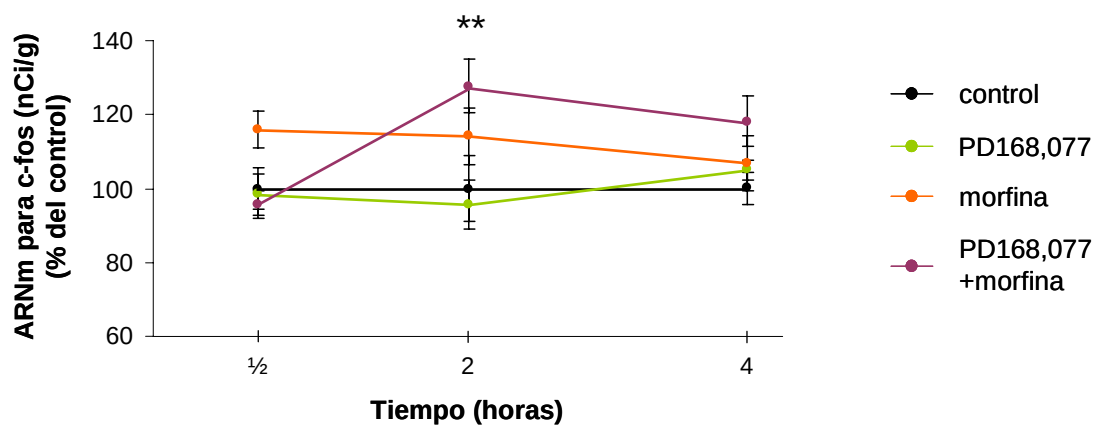


Figura 49. Niveles de ARNm (nCi/g) para c-fos en el caudado putamen de rata a distintos tiempos (1/2, 2 y 4 horas) después del tratamiento agudo con morfina precedido o no de la administración de PD168,077. Los valores representan porcentajes respecto al grupo control y se expresan como media $\pm$ EEM. ANOVA de dos vías (tiempo de supervivencia x tratamiento) seguido del test *post hoc* de Bonferroni, ** $p < 0.01$ PD168,077 + morfina vs. control, PD168,077.

1.2. Fos B- Δ Fos B

La morfina induce la expresión de las proteínas Fos B- Δ Fos B en el caudado putamen de rata 4 horas después de su administración

En animales control, los núcleos IR para Fos B- Δ Fos B se localizaron principalmente en la región medial del CPu (**Fig. 50A-C**). Este patrón de expresión se mantuvo constante a lo largo del eje rostro-caudal. Para hacer el análisis cuantitativo se tomó como número total de núcleos IR la suma total de los núcleos localizados en la región medial y en la región lateral (ver material y métodos). Al analizar las secciones inmunoteñidas de animales tratados con morfina y sacrificadas a las 4 horas, se apreció un incremento del número de núcleos IR en los tres niveles del CPu, sin que se modificara el patrón de distribución de los núcleos IR (**Fig. 50A'-C'**). En los animales sacrificados a la $\frac{1}{2}$, 2 y 6 horas no se apreciaron diferencias respecto al grupo control.

La cuantificación del número de núcleos IR para Fos B- Δ Fos B reveló que el tratamiento agudo con morfina no modificó la expresión de los factores de transcripción ni a la $\frac{1}{2}$ ni a las 2 horas de su

administración. Sin embargo, sí observamos un incremento en el número de núcleos IR para Fos B- Δ Fos B en los animales sacrificados a las 4 horas del tratamiento (+23.2%) (**Fig. 51**). A las 6 horas, no se apreciaron cambios respecto al grupo control.

El ANOVA de dos vías mostró que el efecto sobre el número de núcleos IR para Fos B- Δ Fos B estaba asociado al tiempo de supervivencia ($F=8.5$, $p<0.001$), al tratamiento ($F=7.7$, $p<0.05$) y a la interacción entre estos dos factores ($F=8.5$, $p<0.001$). El test *post hoc* de Bonferroni determinó que el aumento observado en los animales sacrificados a las 4 horas ($p<0.001$) era significativo (**Fig. 51**).

El análisis cuantitativo a lo largo del eje rostro-caudal del CPu (**tabla 15**) confirmó la ausencia de cambios a los 30 minutos en los tres niveles ($F=0.3$, n.s.) debido al tratamiento ($F=0.3$, n.s.). A las 2 horas la administración aguda de morfina tampoco produjo cambios en el número de núcleos IR para Fos B- Δ Fos B asociados de forma significativa al tratamiento ($F=1.9$, n.s) o a los niveles del CPu en estudio ($F=0.8$, n.s.). El incremento observado a las 4 horas debido al tratamiento ($F=29.7$, $p<0.001$) se vio reflejado tanto en los niveles rostrales (+29.8%, $p<0.001$) como medios (+29.7%,

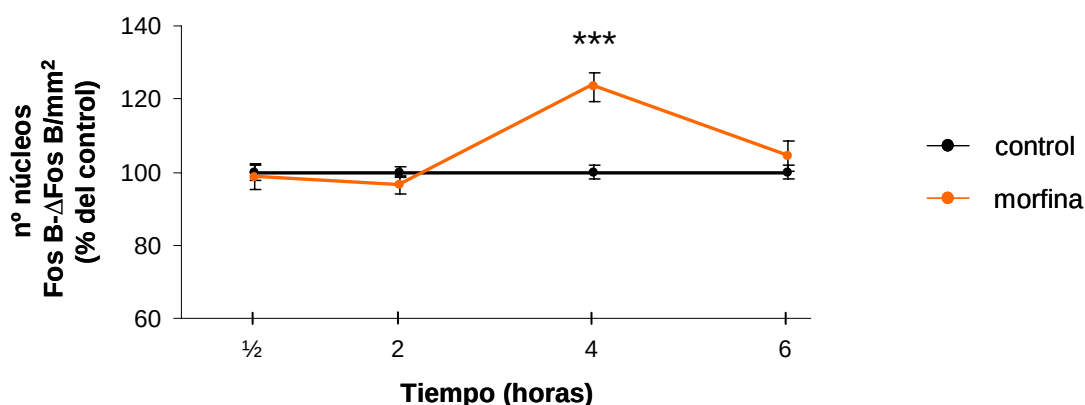


Figura 51. Número de núcleos inmunorreactivos para Fos B/ Δ Fos B por mm² en el caudado putamen de rata a distintos tiempos ($\frac{1}{2}$, 2, 4, 6 horas) después del tratamiento agudo con morfina. Los valores representan porcentajes respecto al grupo control y se expresan como media $\pm$ EEM. ANOVA de dos vías (tiempo de supervivencia x tratamiento) seguido del test *post hoc* de Bonferroni; *** $p<0.001$ vs. control.

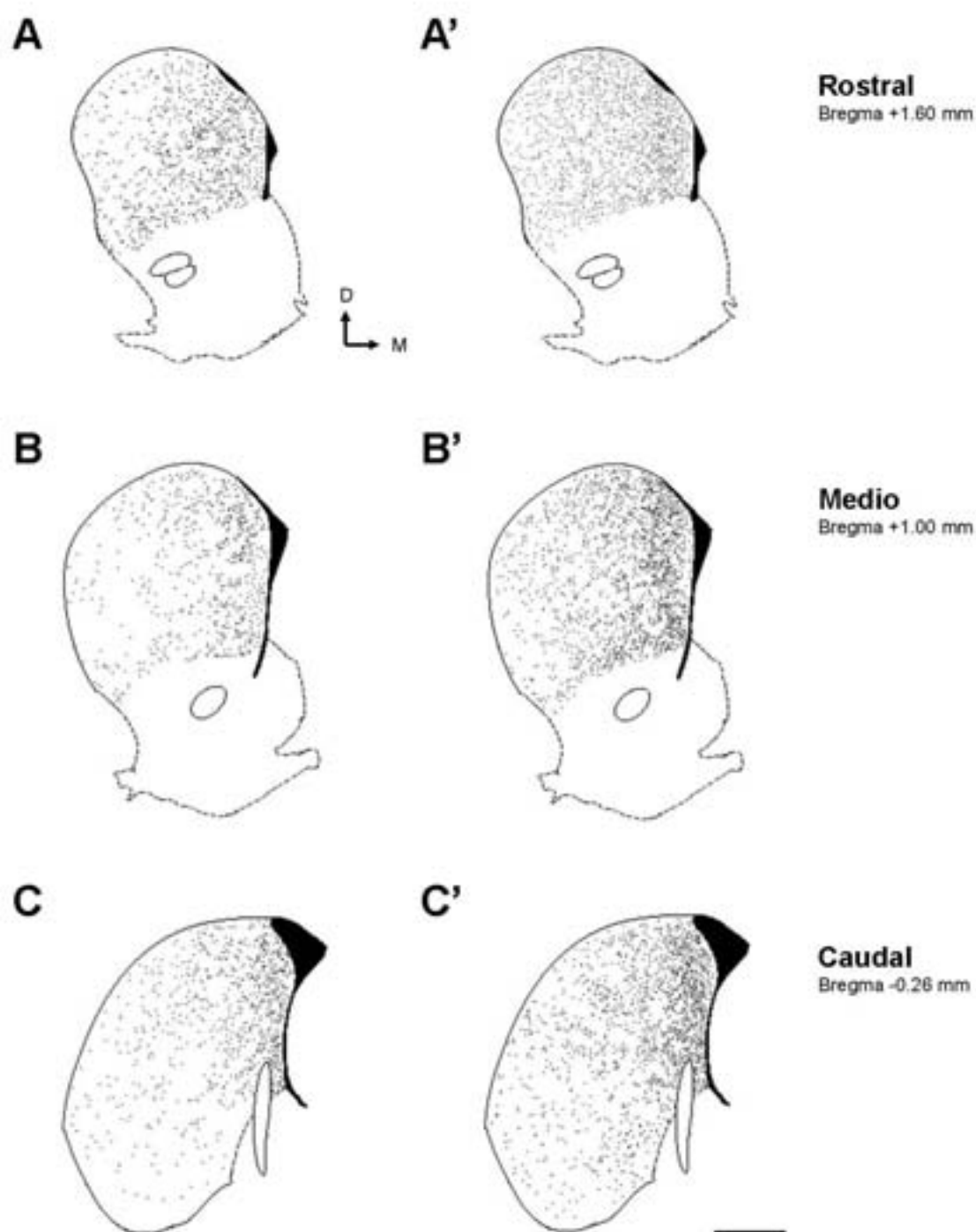


Figura 50. Patrón de expresión de las proteínas Fos B- Δ Fos B en el caudado putamen de rata tras la administración aguda de morfina.

A-C Esquemas representativos de la expresión de Fos B- Δ Fos B en animales control en los niveles rostrales (**A**), medios (**B**) y caudales (**C**) del caudado putamen.

A'-C' Esquemas representativos de la expresión de Fos B- Δ Fos B en animales tratados con morfina y sacrificados a las 4 horas en los niveles rostrales (**A'**), medios (**B'**) y caudales (**C'**) del caudado putamen.

Barra: 1mm

Abreviaturas: D, dorsal; M, medial

Tabla 15. Número de núcleos inmunorreactivos para Fos B- Δ Fos B por mm² en niveles rostrales, medios y caudales del caudado putamen a distintos tiempos ($\frac{1}{2}$, 2, 4, 6 horas) después del tratamiento agudo con morfina.

Tiempo (horas)	Tratamiento	Niveles rostrales	Niveles medios	Niveles caudales
$\frac{1}{2}$	Control	100.0 $\pm$ 3.2	100.0 $\pm$ 4.8	100.0 $\pm$ 3.2
	Morfina	97.5 $\pm$ 4.7	93.7 $\pm$ 4.9	102.2 $\pm$ 6.2
2	Control	100.0 $\pm$ 2.4	100.0 $\pm$ 2.1	100.0 $\pm$ 2.3
	Morfina	95.7 $\pm$ 4.3	100.8 $\pm$ 4.5	92.8 $\pm$ 3.8
4	Control	100.0 $\pm$ 3.3	100.0 $\pm$ 4.1	100.0 $\pm$ 2.6
	Morfina	129.8 $\pm$ 5.4 ***	129.7 $\pm$ 9.1 ***	109.1 $\pm$ 5.7
6	Control	100.0 $\pm$ 3.8	100.0 $\pm$ 4.0	100.0 $\pm$ 2.7
	Morfina	102.9 $\pm$ 6.2	120.8 $\pm$ 9.6	92.2 $\pm$ 4.9

Los valores representan porcentajes respecto al grupo control y se expresan como media $\pm$ EEM. ANOVA de dos vías (tratamiento x nivel del CPu) para cada punto de la curva de tiempo seguido del test *post hoc* de Bonferroni; *** $p < 0.001$ vs. control.

$p < 0.001$) de manera significativa, pero no en los caudales. No hubo diferencias en la intensidad del efecto entre los niveles rostrales y medios. El análisis del efecto a las 6 horas no indicó cambios significativos asociados al tratamiento administrado ($F=1.1$, n.s.) a lo largo del eje rostro-caudal ($F=2.7$, n.s.).

La activación aguda de los receptores dopaminérgicos D₄ incrementa la expresión de las proteínas Fos B- Δ Fos B en el caudado putamen de rata $\frac{1}{2}$ hora después del tratamiento

Como ya se ha mencionado anteriormente, en los animales control los núcleos IR para Fos B- Δ Fos B se localizaron principalmente en la región medial del CPu, aunque también se observaron núcleos IR en la región lateral (**Fig. 52A-C**). En los animales tratados con PD168,077 y sacrificados a la $\frac{1}{2}$ hora se observó un pequeño incremento del número de núcleos

IR para Fos B- Δ Fos B a lo largo de todo el eje rostro-caudal del CPu sin que se modificara el patrón de distribución (**Fig. 52A'-C'**). A las 2, 4 y 6 horas, la expresión de Fos B- Δ Fos B fue similar a la observada en los animales control.

Tras cuantificar el número de núcleos IR se observó un incremento (+15.5%) del número de núcleos IR para Fos B- Δ Fos B $\frac{1}{2}$ hora después del tratamiento con PD168,077 y no se apreciaron cambios a las 2, 4 y 6 horas (**Fig. 53**).

El análisis estadístico de los datos mediante un ANOVA de dos vías mostró que los efectos sobre la expresión de Fos B- Δ Fos B observados no estaban asociados al tratamiento administrado ($F=0.6$, n.s.), pero sí al tiempo de supervivencia ($F=4.5$, $p < 0.01$) y a la interacción de ambos factores ($F=4.5$, $p < 0.01$). El test *post hoc* de Bonferroni indicó que el incremento que se observó a la $\frac{1}{2}$ hora del tratamiento con PD168,077 era significativo respecto al grupo control ($p < 0.001$) (**Fig. 53**).

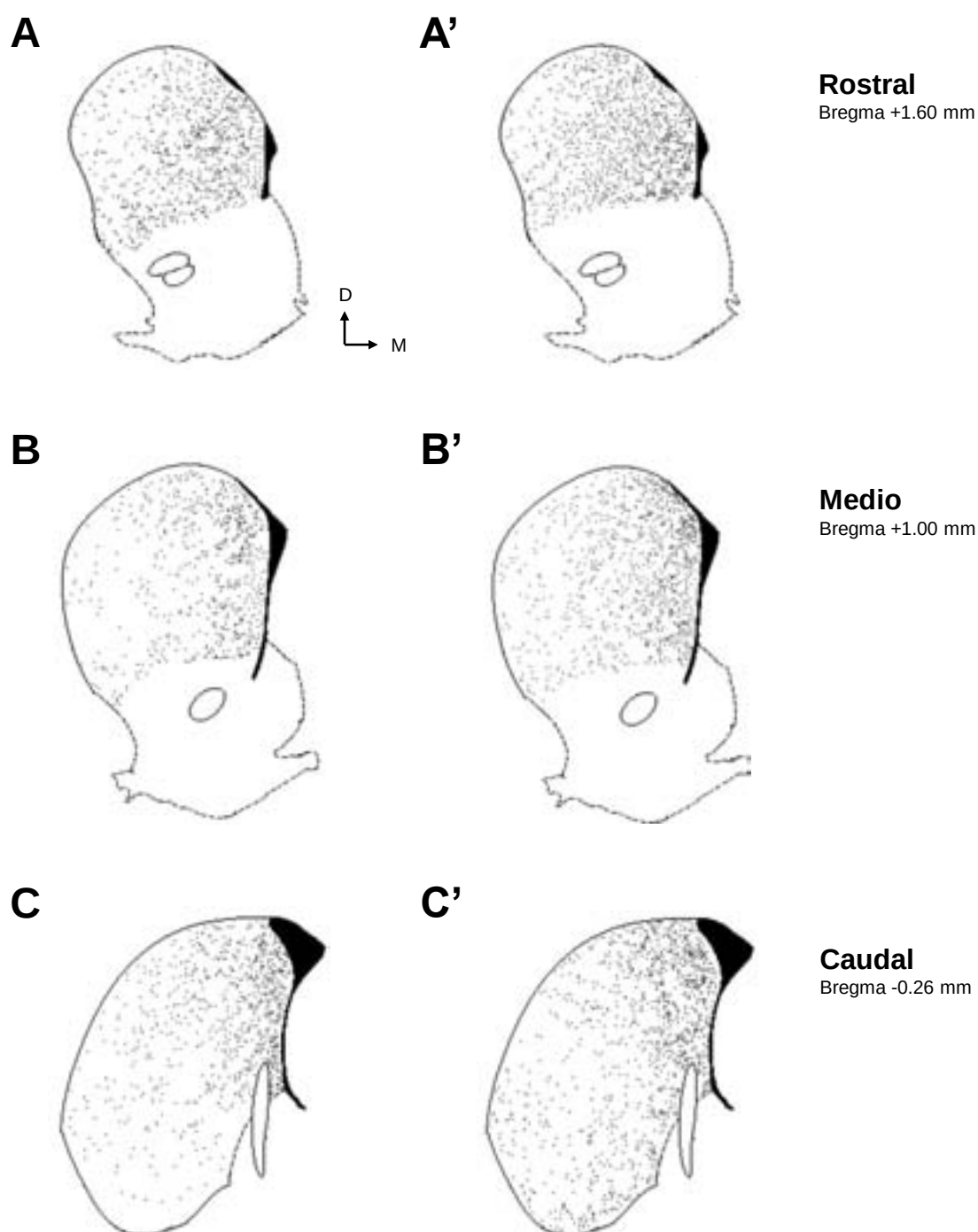


Figura 52. Patrón de expresión de las proteínas transcripción Fos B- Δ Fos B en el caudado putamen de rata tras la administración aguda de PD168,077.

A-C Esquemas representativos de la expresión de Fos B- Δ Fos B en animales control en los niveles rostrales (**A**), medios (**B**) y caudales (**C**) del caudado putamen.

A'-C' Esquemas representativos de la expresión de Fos B- Δ Fos B en animales tratados con PD168,077 y sacrificados a la ½ hora en los niveles rostrales (**A'**), medios (**B'**) y caudales (**C'**) del caudado putamen.

Barra: 1mm

Abreviaturas: D, dorsal; M, medial

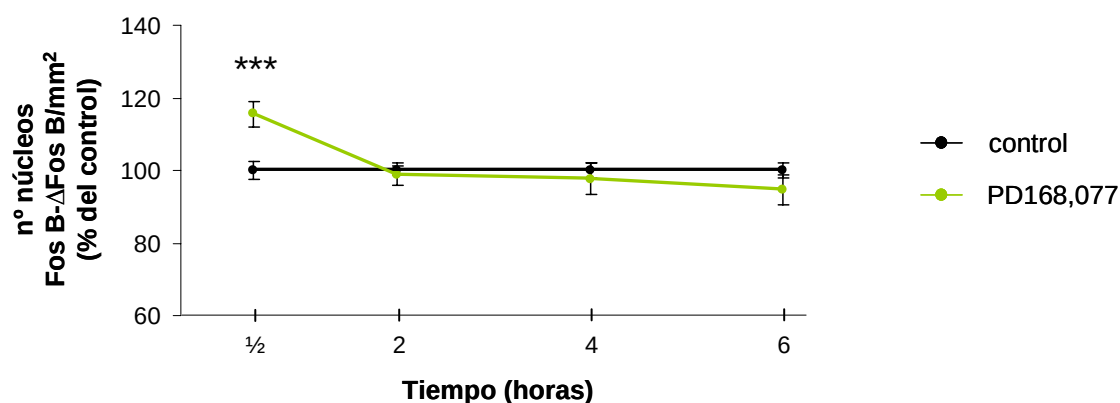


Figura 53. Número de núcleos inmunorreactivos para Fos B-ΔFos B por mm² en el caudado putamen a distintos tiempos (½, 2, 4, 6 horas) después del tratamiento agudo con PD168,077. Los valores representan porcentajes respecto al grupo control y se expresan como media ± EEM. ANOVA de dos vías (tiempo de supervivencia x tratamiento) seguido del test *post hoc* de Bonferroni; *** p<0.001 vs. control.

Tabla 16. Número de núcleos inmunorreactivos para Fos B-ΔFos B por mm² en niveles rostrales, medios y caudales del caudado putamen a distintos tiempos (½, 2, 4, 6 horas) después del tratamiento agudo con PD168,077.

Tiempo (horas)	Tratamiento	Niveles rostrales	Niveles medios	Niveles caudales
½	Control	100.0 ± 3.2	100.0 ± 4.8	100.0 ± 3.2
	PD168,077	110.9 ± 4.3	115.0 ± 7.4	122.6 ± 5.4 **
2	Control	100.0 ± 2.4	100.0 ± 2.1	100.0 ± 2.3
	PD168,077	109.0 ± 5.5	95.7 ± 5.3	93.1 ± 5.1
4	Control	100.0 ± 3.3	100.0 ± 4.1	100.0 ± 2.6
	PD168,077	102.7 ± 6.8	95.9 ± 5.9	95.0 ± 8.4
6	Control	100.0 ± 3.8	100.0 ± 4.0	100.0 ± 2.7
	PD168,077	98.0 ± 6.1	105.5 ± 10.1	80.8 ± 4.6

Los valores representan porcentajes respecto al grupo control y se expresan como media ± EEM. ANOVA de dos vías (tratamiento x nivel del CPu) para cada punto de la curva de tiempo seguido del test *post hoc* de Bonferroni; ** p<0.01 vs. control.

Para comprobar si este efecto se reproducía a lo largo del eje rostro-caudal del CPu, se cuantificó el número de núcleos Fos B-ΔFos B positivos en los niveles rostrales, medios y caudales (**tabla 16**). A la ½ hora, la inducción de Fos B-ΔFos B por PD168,077 sólo se produjo de manera significativa en los niveles caudales

(+22.6%, p<0.01) (F=14.0, p<0.001). En los animales tratados y sacrificados a las 2 horas no se observaron diferencias en la expresión de estos factores de transcripción asociadas al tratamiento (F=0.03, n.s.) o al nivel del CPu estudiado (F=2.9, n.s.). En los animales sacrificados 4 horas después de la administración de PD168,077 tampoco se

hallaron diferencias significativas asociadas al tratamiento ($F=0.02$, n.s.) en ninguno de los tres niveles del CPu ($F=0.6$, n.s.). De igual manera, a las 6 horas del tratamiento agudo con PD168,077 no se observaron cambios significativos asociados al tratamiento ($F=1.3$, n.s.) o a los distintos niveles del CPu ($F=2.5$, n.s.).

La activación de los receptores dopaminérgicos D_4 no modifica el patrón de inducción de las proteínas Fos B- Δ Fos B 4 horas después del tratamiento con morfina

Dado que el tratamiento agudo con morfina produjo un incremento del número de núcleos IR para Fos B- Δ Fos B en el CPu a las 4 horas, se analizó la influencia de los receptores D_4 sobre este efecto. Para llevar a cabo este estudio, se trataron animales

conjuntamente con PD168,077 y morfina y se sacrificaron a las 4 horas.

El análisis cualitativo de secciones del CPu inmunoteñidas para Fos B- Δ Fos B (**Fig. 54**) reveló que los animales tratados con PD168,077 + morfina presentaban un número mayor de núcleos IR que los animales control y que los tratados sólo con PD168,077, pero similar al de los animales tratados con morfina.

El estudio cuantitativo y el posterior análisis estadístico de los datos, confirmaron que en los animales tratados con PD168,077 + morfina el número de núcleos IR para Fos B- Δ Fos B era similar al observado en los animales tratados sólo con morfina (**Fig. 55**), pero mayor (+24.7%, $p<0.05$) al del grupo control. Por tanto, la inducción de estas proteínas por morfina no se vio afectada por la activación previa de los receptores D_4 .

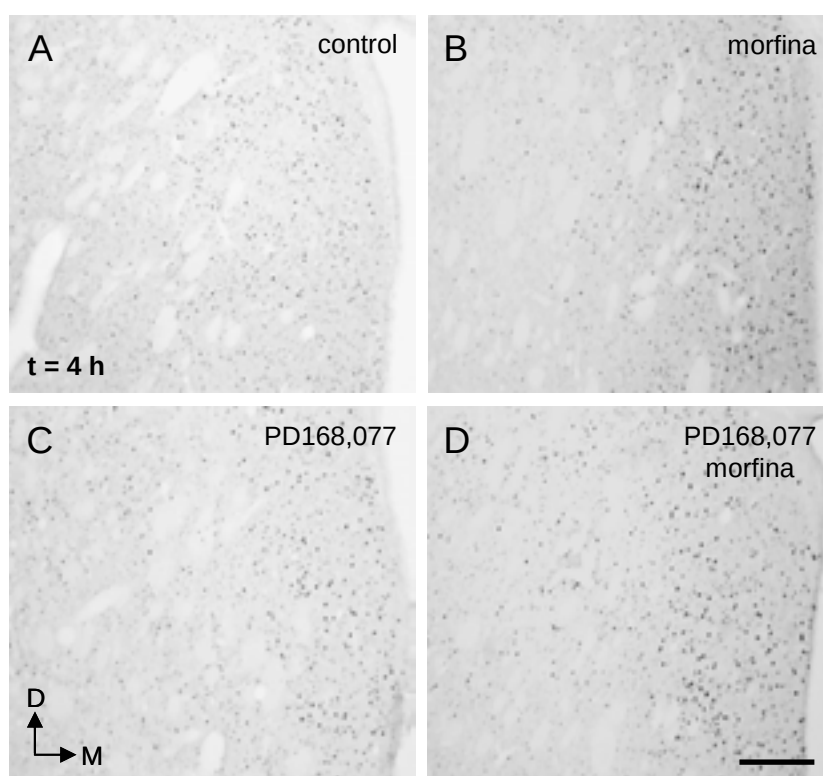


Figura 54. Microfotografías representativas de secciones coronales de cerebros de rata inmunoteñidas con anti-Fos B que muestran núcleos inmunorreactivos para Fos B- Δ Fos B en el caudado putamen en animales control (**A**) y tratados con morfina (**B**), PD168,077 (**C**) y PD168,077 + morfina (**D**) 4 horas después de la administración de los fármacos.

Barra: 200 μ m

Abreviaturas: D, dorsal; M, medial

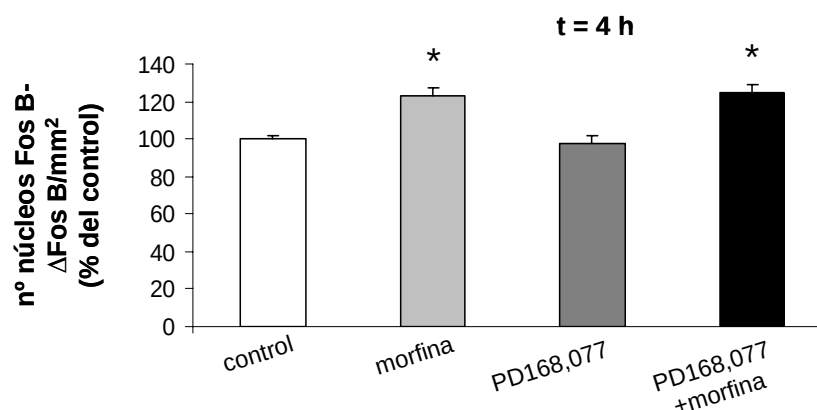


Figura 55. Número de núcleos inmunorreactivos para Fos B-ΔFos B por mm² en el caudado putamen de rata en animales sacrificados 4 horas después del tratamiento agudo con morfina precedido o no de la administración de PD168,077. Los valores representan porcentajes respecto al grupo control y se expresan como media ± EEM. ANOVA no paramétrica de una vía seguida del test *post hoc* de Dunn; * $p < 0.05$ vs. control, PD168,077.

A lo largo del eje rostro-caudal del CPU (**Fig. 56**) se encontraron diferencias significativas asociadas al tratamiento ($F=13.3$, $p < 0.001$) en los distintos niveles de este núcleo ($F=4.5$, $p < 0.05$). En los niveles rostrales la administración del agonista dopaminérgico no bloqueó el efecto de la morfina sobre la expresión de estos factores de transcripción, ya que ambos tratamientos provocaron un incremento similar del número de núcleos Fos B-ΔFos B positivos respecto al grupo control (+39.0% en el caso de PD168,077 + morfina y +29.8% en el caso de morfina). En cambio, en los niveles medios la administración de PD168,077 sí bloqueó el efecto del fármaco opioide. En los niveles caudales, donde ya se había descrito que la morfina no tenía efectos sobre la expresión de Fos B-ΔFos B, la coadministración con morfina tampoco modificó el número de núcleos IR.

La morfina potencia el efecto de PD168,077 sobre la inducción de las proteínas Fos B-ΔFos B 30 minutos después de los tratamientos

Para completar el estudio, se analizó el efecto de la coadministración de PD168,077 y morfina sobre el número de núcleos IR para Fos B-ΔFos B a lo largo del tiempo (½, 2, 4 y 6 horas). En las secciones

inmunoteñidas de ratas cotratadas y sacrificadas a los 30 minutos (**Fig. 57**) el número de núcleos IR para Fos B-ΔFos B era mayor que en las secciones de animales tratados con PD168,077 y del grupo control. Como se describió anteriormente, a las 4 horas, los animales a los que se les administró PD168,077 + morfina presentaban un número de núcleos IR similar a los tratados con morfina y mayor que en los animales del grupo control y de los tratados con PD168,077. No se observaron diferencias entre las secciones de animales tratados con las distintas drogas y sacrificadas 2 y 6 horas.

Como recoge la **figura 58**, a los 30 minutos del tratamiento con PD168,077 + morfina el número de núcleos Fos B-ΔFos B positivos incrementó respecto al grupo control (+41.4%, $p < 0.001$), siendo este aumento mayor ($p < 0.001$) que el producido por la administración de PD168,077 (+15.5%, $p < 0.05$). Dos horas después de la administración de los distintos fármacos, ninguno de ellos tuvo un efecto significativo sobre la expresión de Fos B-ΔFos B. Sin embargo, como se mencionó con anterioridad, el tratamiento con PD168,077 + morfina no modificó el patrón de inducción por morfina de Fos B-ΔFos B después de 4 horas ya que no se observaron diferencias significativas entre ambos grupos. Los

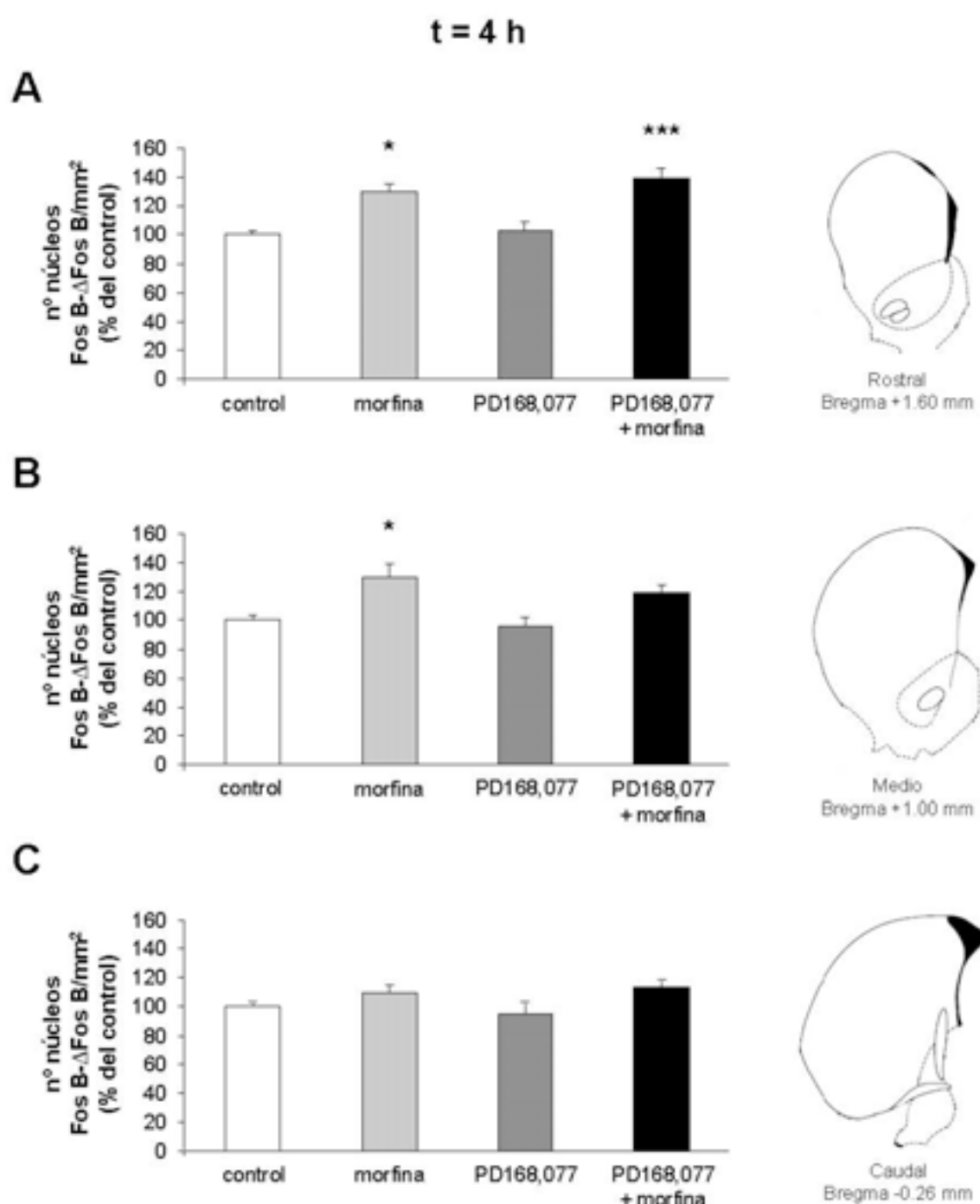


Figura 56. Número de núcleos Fos B-ΔFos B IR en el caudado putamen en los niveles rostrales (A), medios (B) y caudales (C) en animales sacrificados 4 horas después del tratamiento con morfina precedido o no de la administración del agonista PD168,077. Los valores representan porcentajes respecto al grupo control y se expresan como media $\pm$ EEM. ANOVA de dos vías (tratamiento $\times$ nivel del CPu) seguida del test *post hoc* de Bonferroni; * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ vs. control, PD168,077.

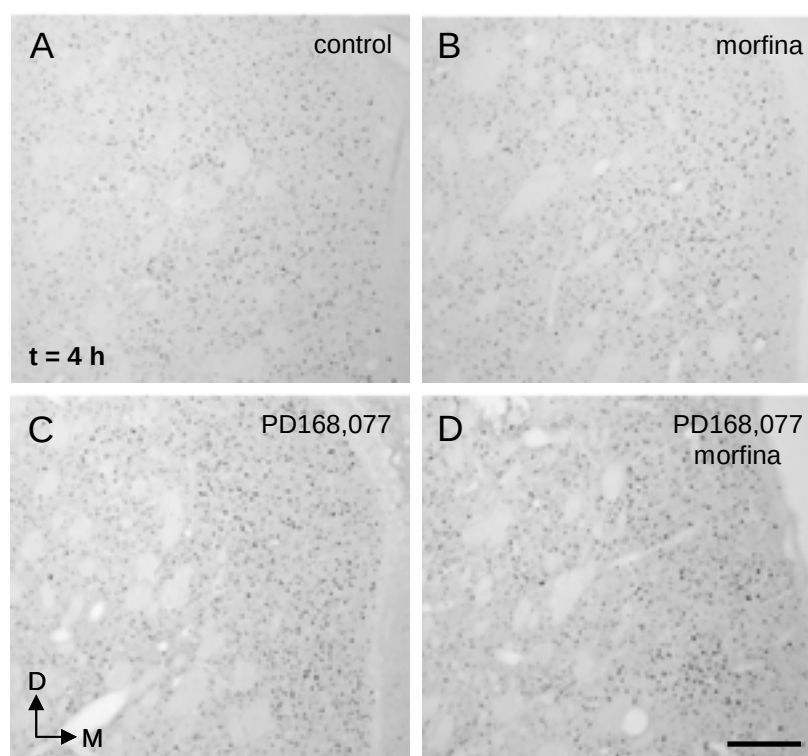


Figura 57. Microfotografías representativas de secciones coronales de cerebro de rata inmunoteñidas con anti-Fos B que muestran núcleos inmunorreactivos para Fos B-ΔFos B en el caudado putamen en animales control (A) y tratados con morfina (B), PD168,077 (C) y PD168,077 + morfina (D) ½ hora después de la administración de los fármacos.

Barra: 200 μm

Abreviaturas: D, dorsal; M, medial

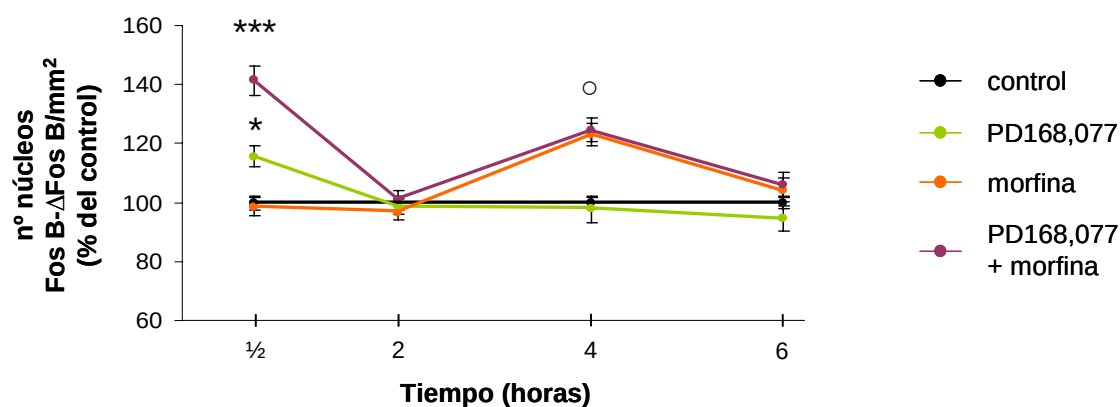


Figura 58. Número de núcleos inmunorreactivos para Fos B-ΔFos B en el caudado putamen de rata a distintos tiempos (½, 2, 4, 6 horas) después del tratamiento con morfina precedido o no de la administración del agonista PD168,077. Los valores representan porcentajes respecto al grupo control y se expresan como media ± EEM. ANOVA de dos vías (tiempo de supervivencia x tratamiento) seguida del test *post hoc* de Bonferroni, *** $p < 0.001$ PD168,077 + morfina vs. control, morfina, PD168,077, * $p < 0.05$ PD168,077 vs. control, morfina, PD168,077 + morfina; ○ $p < 0.001$ PD168,077 + morfina o morfina vs. control, PD168,077.

niveles de expresión de estos factores de transcripción en las ratas que recibieron los distintos tratamientos fueron similares a los del grupo control 6 horas después de la administración.

El análisis estadístico mediante un ANOVA de dos vías confirmó que estas modificaciones en la expresión de Fos B- Δ Fos B estaban asociadas tanto a la interacción de los factores tiempo de supervivencia y tratamiento ($F=9.5$, $p<0.001$), como a cada uno de ellos de manera independiente (tiempo de supervivencia $F=18.9$, $p<0.001$; tratamiento administrado $F=22.8$, $p<0.001$) (**Fig. 58**).

También se evaluó el efecto del cotratamiento de ambos fármacos a distintos tiempos en los niveles rostrales, medios y caudales del CPu. La inducción de la expresión de Fos B- Δ Fos B $\frac{1}{2}$ hora después del cotratamiento de PD168,077 y morfina se produjo de forma significativa tanto en los niveles mediales (41.4%, $p<0.05$) como en los caudales (75.1%, $p<0.001$), existiendo un gradiente a lo largo del eje rostro-caudal ($F=9.2$, $p<0.001$) (**Fig. 59**). A las 2 horas (**Fig. 60**), el número de núcleos IR para Fos B- Δ Fos B en los animales tratados con PD168,077, morfina ó PD168,077 + morfina fue similar al del grupo control en los tres niveles del CPu. Como ya se mostró anteriormente en la **figura 56**, la administración de morfina indujo la expresión de Fos B- Δ Fos B a las 4 horas tanto en los niveles rostrales ($p<0.05$) como en los medios ($p<0.05$), sin que se modificaran en los niveles caudales. Además, el cotratamiento de PD168,077 y morfina incrementó la expresión de Fos B- Δ Fos B sólo en los niveles rostrales ($p<0.001$), por lo que el agonista dopaminérgico bloquea el efecto de la morfina en los niveles medios. Seis horas después de la administración de los distintos tratamientos (**Fig. 61**), no se observaron diferencias significativas en los niveles de expresión de Fos B- Δ Fos B entre el grupo control y los animales tratados con los diferentes fármacos en ninguno de los niveles del CPu.

1.3. p-CREB

La morfina tiene un efecto doble y contrapuesto a lo largo del tiempo sobre la expresión de la proteína p-CREB en el caudado putamen de rata

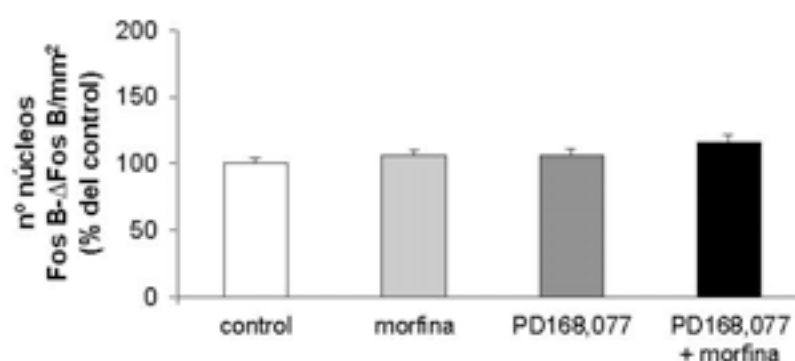
En secciones inmunoteñidas con un anticuerpo anti-p-CREB, la distribución de los núcleos IR para esta proteína en el CPu fue homogénea en todo el núcleo (**Fig. 62A-C**). Así, al cuantificar los núcleos IR para p-CREB, el número total era el promedio del número de núcleos de la región medial y de la región lateral (ver material y métodos). Al analizar el efecto de la administración de morfina, se observó que los núcleos IR también se distribuyeron de forma homogénea a lo largo del eje rostro-caudal del CPu. Sin embargo, sí se apreció un ligero descenso del número de núcleos IR 30 minutos después del tratamiento (**Fig. 62A'-C'**) y un aumento a las 4 horas (**Fig. 62A''-C''**). A las 2 y 6 horas del tratamiento con morfina no se apreciaron cambios respecto al grupo control.

El análisis cuantitativo (**Fig. 63**) confirmó que el número de núcleos p-CREB positivos se redujo (-22.7%) $\frac{1}{2}$ hora después de la administración del fármaco respecto al grupo control, mientras que a las 4 horas se produjo un incremento (+28.4%). A las 2 y 6 horas los valores eran similares a los del grupo control.

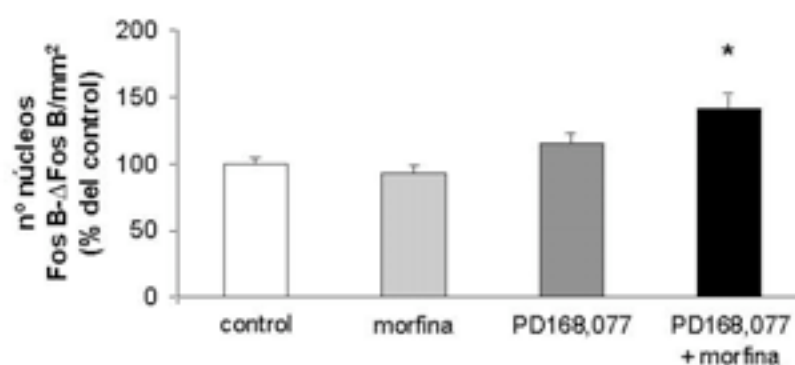
El análisis estadístico mediante un ANOVA de dos vías mostró que tanto el tiempo de supervivencia ($F=15.9$, $p<0.001$) como la interacción de este factor con el tratamiento ($F=15.6$, $p<0.001$) influyeron de manera significativa sobre la expresión de p-CREB en el CPu. Los cambios no estaban asociados al tratamiento recibido por las ratas ($F=0.9$, n.s.). El test *post hoc* de Bonferroni confirmó que el tratamiento agudo de morfina disminuyó de manera significativa los niveles de p-CREB a los 30 minutos ($p<0.001$) y provocó un incremento a las 4 horas ($p<0.001$) sin que se modificara el número de núcleos IR para p-CREB a las 2 y 6 horas (**Fig. 63**).

t = ½ h

A

Rostral
Bregma +1.60 mm

B

Medio
Bregma +1.00 mm

C

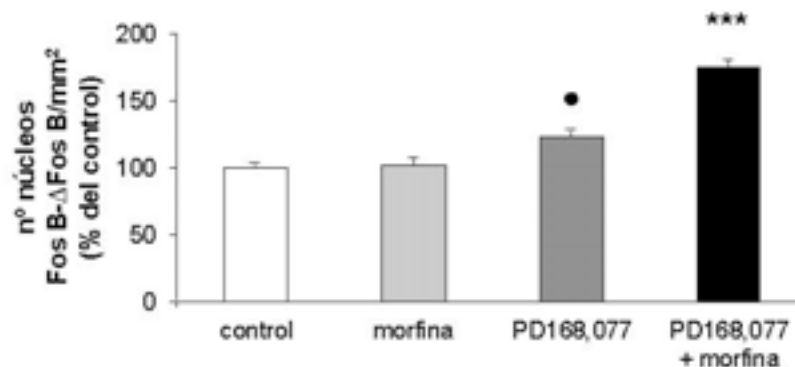
Caudal
Bregma -0.26 mm

Figura 59. Expresión de Fos B-ΔFos B en la región dorso-medial del caudado putamen en los niveles rostrales (A), medios (B) y caudales (C) en animales sacrificados ½ hora después del tratamiento con morfina precedido o no de la administración de PD168,077. Los valores representan porcentajes respecto al grupo control y se expresan como media ± EEM. ANOVA de dos vías (tratamiento x nivel del CPu) seguida del test *post hoc* de Bonferroni; + p<0.05 vs. control, morfina, PD168,077; • p<0.05 vs. control, morfina, PD168,077 + morfina, *** p<0.001 vs. control, morfina, p<0.05 vs. PD168,077.

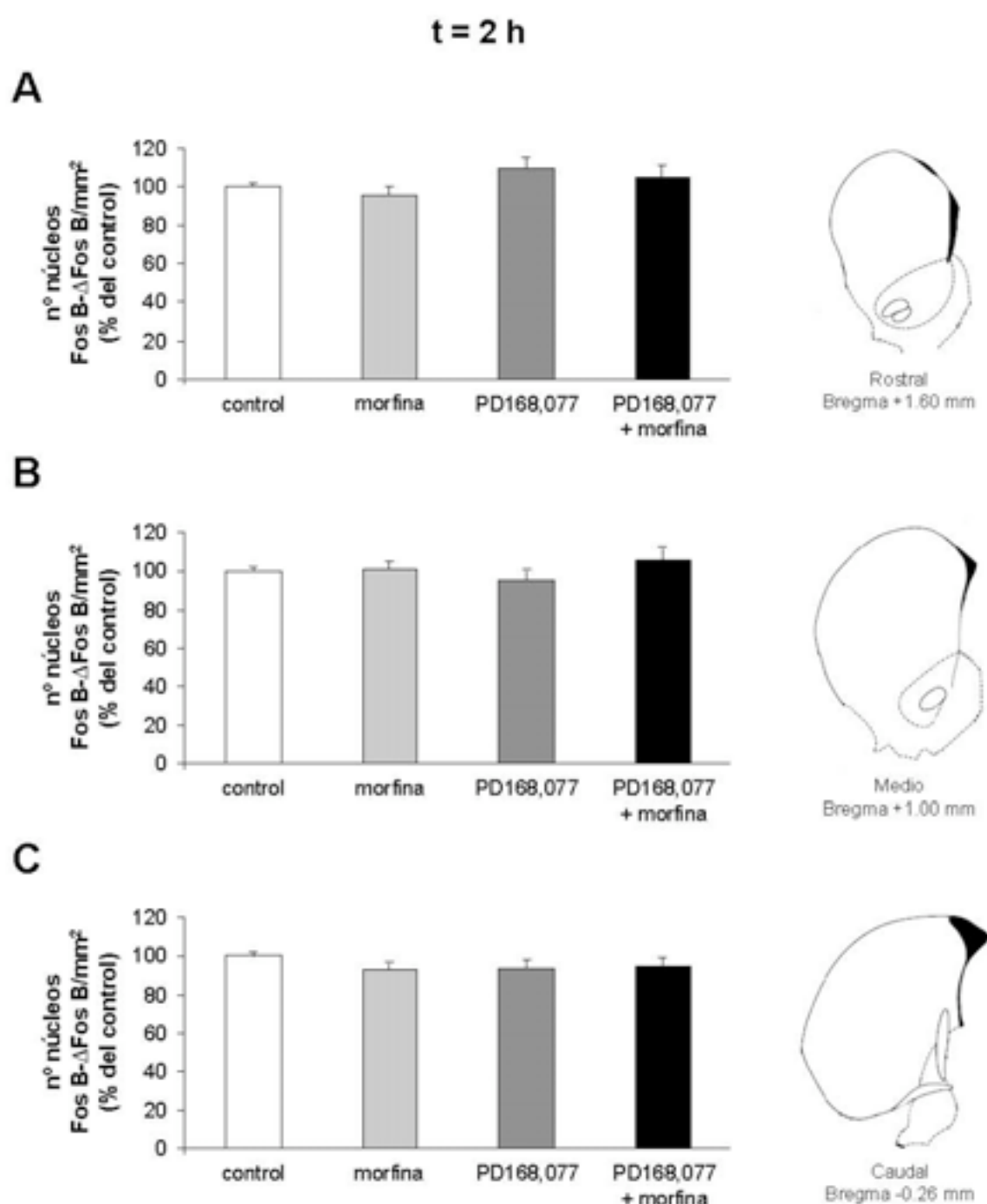
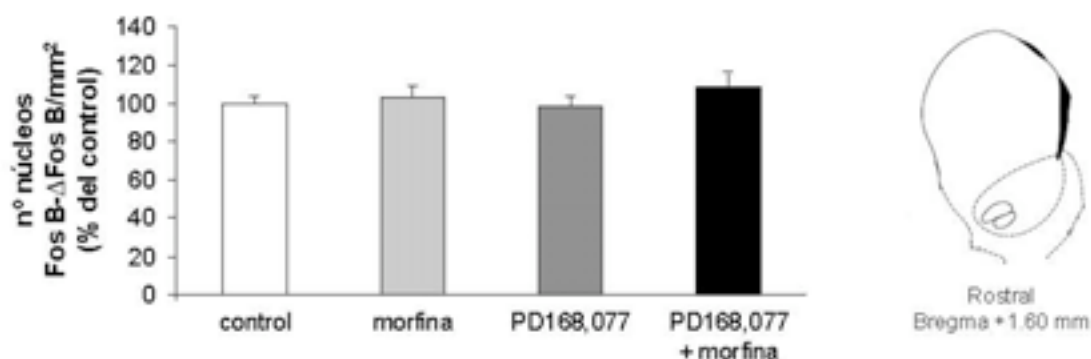


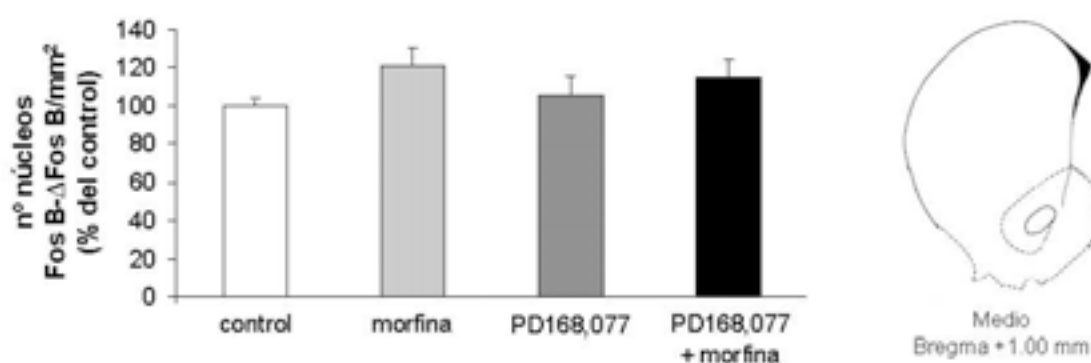
Figura 60. Número de núcleos Fos B-ΔFos B IR en la región dorso-medial del caudado putamen en los niveles rostrales (A), medios (B) y caudales (C) en animales sacrificados 2 horas después del tratamiento con morfina precedido o no de la administración de PD168,077. Los valores representan porcentajes respecto al grupo control y se expresan como media $\pm$ EEM. ANOVA de dos vías (tratamiento $\times$ nivel del CPu) seguida del test *post hoc* de Bonferroni.

t = 6 h

A



B



C

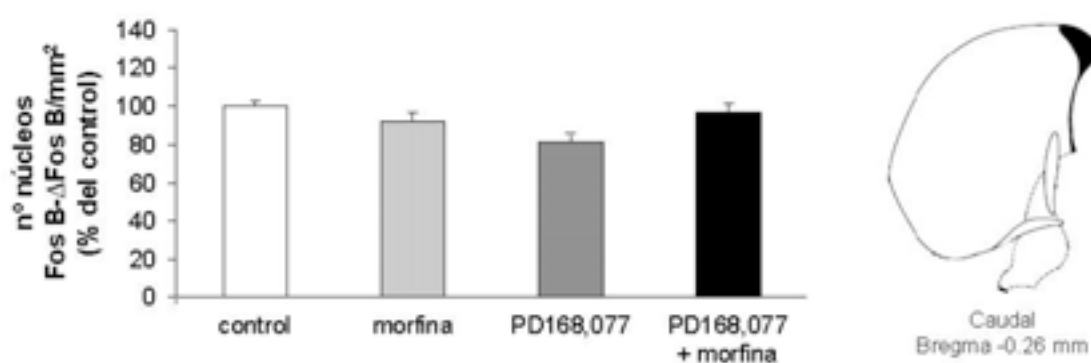


Figura 61. Número de núcleos de Fos B-ΔFos B IR en el caudado putamen en los niveles rostrales (A), medios (B) y caudales (C) en animales sacrificados 6 horas después del tratamiento con morfina precedido o no de la administración de PD168,077. Los valores representan porcentajes respecto al grupo control y se expresan como media $\pm$ EEM. ANOVA de dos vías (tratamiento $\times$ nivel del CPu) seguida del test *post hoc* de Bonferroni.

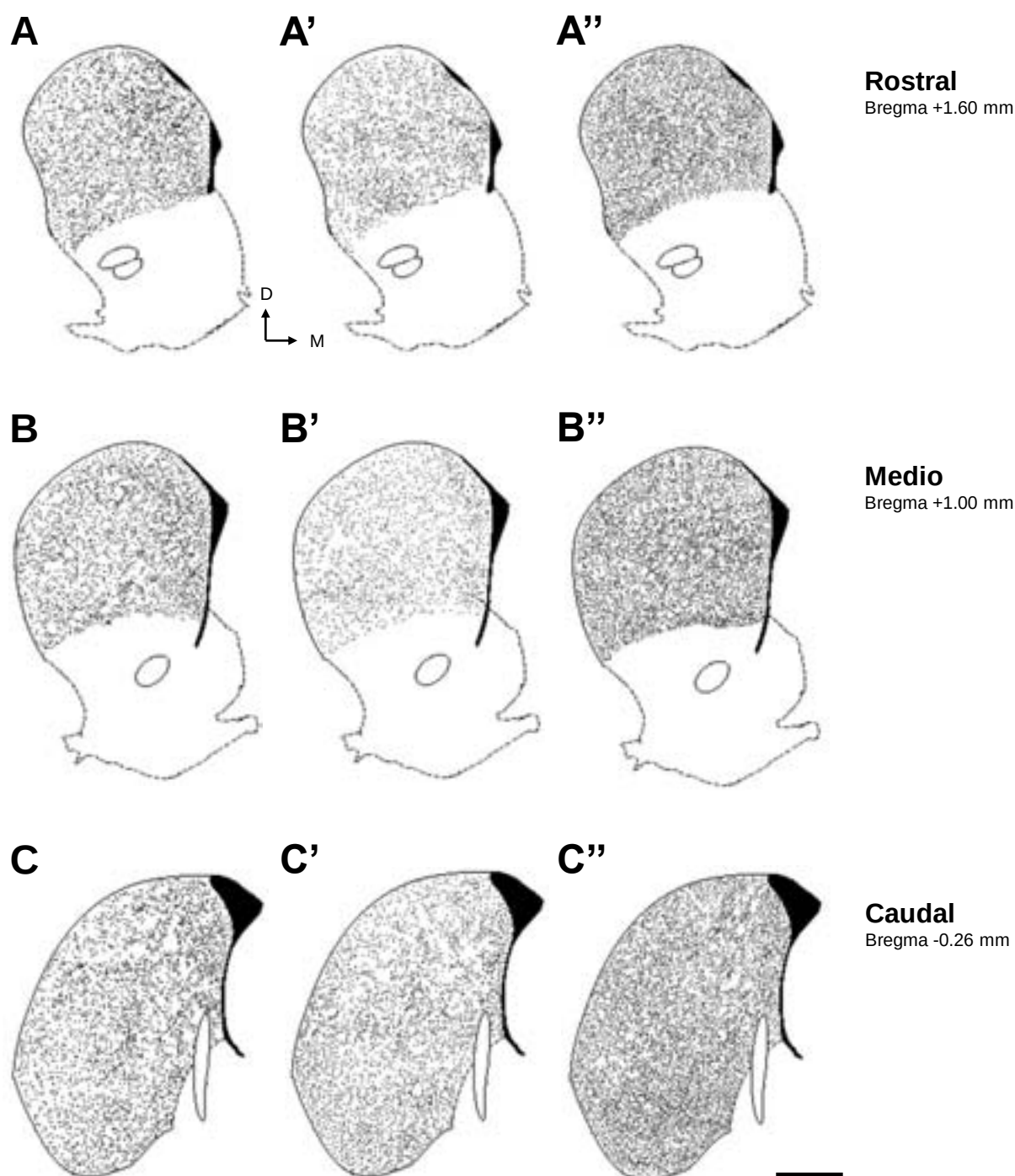


Figura 62. Patrón de expresión de la proteína p-CREB en el caudado putamen de rata tras la administración aguda de morfina.

A- C Esquemas representativos de la expresión de p-CREB en animales control en los niveles rostrales (**A**), medios (**B**) y caudales (**C**) del caudado putamen.

A'-C' Esquemas representativos de la expresión de p-CREB en animales tratados con morfina y sacrificados a la ½ hora en los niveles rostrales (**A'**), medios (**B'**) y caudales (**C'**) del caudado putamen.

A''-C'' Esquemas representativos de la expresión de p-CREB en animales tratados con morfina y sacrificados a las 4 horas en los niveles rostrales (**A''**), medios (**B''**) y caudales (**C''**) del caudado putamen.

Barra: 1mm

Abreviaturas: D, dorsal; M, medial

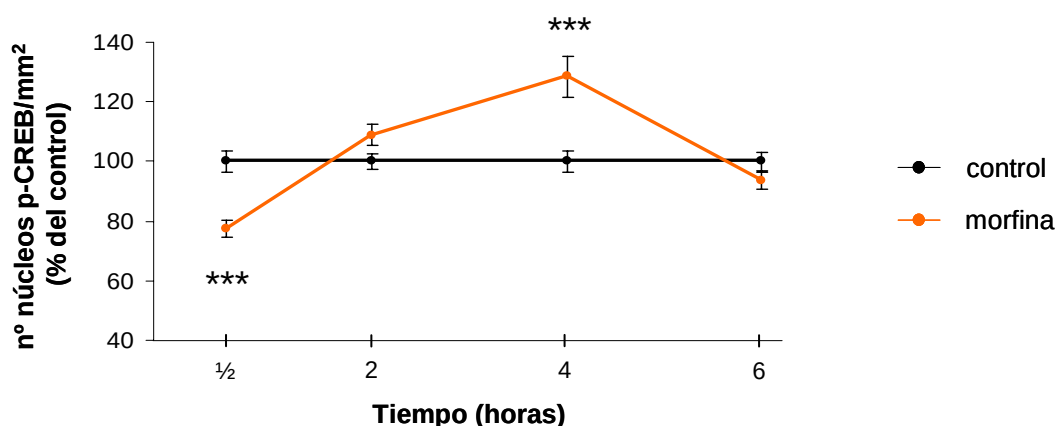


Figura 63. Número de núcleos inmunorreactivos para p-CREB por mm^2 en el caudado putamen a distintos tiempos ($\frac{1}{2}$, 2, 4, 6 horas) después del tratamiento agudo con morfina. Los valores representan porcentajes respecto al grupo control y se expresan como media $\pm$ EEM. ANOVA de dos vías (tiempo de supervivencia $\times$ tratamiento) seguida del test *post hoc* de Bonferroni, *** $p < 0.001$ vs. control.

Tabla 17. Número de núcleos inmunorreactivos para p-CREB por mm^2 en niveles rostrales, medios y caudales del caudado putamen a distintos tiempos ($\frac{1}{2}$, 2, 4, 6 horas) después del tratamiento agudo con morfina.

Tiempo (horas)	Tratamiento	Niveles rostrales	Niveles medios	Niveles caudales
$\frac{1}{2}$	Control	100.0 $\pm$ 7.3	100.0 $\pm$ 7.3	100.0 $\pm$ 5.3
	Morfina	88.5 $\pm$ 3.9	76.3 $\pm$ 5.6 **	70.9 $\pm$ 4.1 ***
2	Control	100.0 $\pm$ 4.5	100.0 $\pm$ 4.0	100.0 $\pm$ 4.5
	Morfina	111.0 $\pm$ 4.7	95.0 $\pm$ 5.8	116.8 $\pm$ 6.3
4	Control	100.0 $\pm$ 6.4	100.0 $\pm$ 5.2	100.0 $\pm$ 6.2
	Morfina	131.3 $\pm$ 12.8 *	126.8 $\pm$ 13.0 *	127.2 $\pm$ 10.4 *
6	Control	100.0 $\pm$ 3.9	100.0 $\pm$ 5.4	100.0 $\pm$ 5.8
	Morfina	91.9 $\pm$ 4.1	99.4 $\pm$ 6.1	91.2 $\pm$ 4.4

Los valores representan porcentajes respecto al grupo control y se expresan como media $\pm$ EEM. ANOVA de dos vías (tratamiento $\times$ nivel del CPu) para cada punto de la curva de tiempo seguido del test *post hoc* de Bonferroni; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. control.

Al igual que se hizo para c-Fos y Fos B- Δ Fos B, se analizó el efecto del tratamiento a lo largo del eje rostro-caudal para cada punto de la curva de tiempo (tabla 17). A la $\frac{1}{2}$ hora, la administración de morfina redujo la expresión de p-CREB de manera significativa ($F=18.3$, $p < 0.001$) en los niveles medios (-23.7%, $p < 0.01$) y en los

caudales (-29.1%, $p < 0.001$), pero no hubo diferencias en la intensidad del efecto entre estos dos niveles. A las 2 horas, no se observaron cambios significativos asociados al tratamiento con morfina ($F=3.3$, n.s.) ni al nivel del CPu estudiado ($F=2.4$, n.s.). A las 4 horas del tratamiento ($F=16.1$, n.s.), los niveles de p-CREB

incrementaron en los niveles rostrales (+31.3%, $p<0.05$), medios (+26.7%, $p<0.05$) y caudales (+27.2%, $p<0.05$) de igual manera. Tras 6 horas, el tratamiento con morfina ($F=1.5$, n.s.) tampoco modificó la expresión de p-CREB en ninguno de los niveles del CPu ($F=0.3$, n.s.).

La activación de los receptores dopaminérgicos D_4 no modifica la expresión de la proteína p-CREB en el caudado putamen de rata

El estudio cualitativo de secciones inmunoteñidas con el anticuerpo anti-p-CREB mostró que la distribución de los núcleos IR tras el tratamiento agudo con PD168,077 fue homogénea en los niveles rostrales, medios y caudales (**Fig. 64A'-C'**), de manera similar al grupo control (**Fig. 64A-C**).

Al cuantificar y comparar el número de núcleos IR para p-CREB en el CPu de animales tratados con PD168,077 y control, no se observó ningún cambio a lo largo del tiempo ($\frac{1}{2}$, 2, 4 y 6 horas) (**Fig. 65**). El ANOVA de dos vías (tiempo de supervivencia x tratamiento) confirmó que no había efectos significativos sobre la expresión de p-CREB asociados al tiempo de supervivencia ($F=0.9$, n.s.), al tratamiento ($F=0.03$, n.s.) y a la interacción de ambos factores ($F=0.9$, n.s.) (**Fig. 65**).

El análisis realizado a lo largo del eje rostro-caudal se refleja en la **tabla 18**. Media hora después de la administración del agonista dopaminérgico no se observaron cambios significativos en el número de núcleos IR para p-CREB debidos al tratamiento ($F=1.6$, n.s.) en ninguno de los niveles del CPu ($F=0.8$, n.s.). A las 2 horas sin embargo, sí se observó un descenso significativo en los niveles caudales (-25.6%, $p<0.01$) debido al tratamiento. Tras 4 y 6 horas, la administración del fármaco no provocó cambios significativos respecto a los grupos control en el número de núcleos IR asociadas al tratamiento ($F=0.3$, n.s. a las 4

horas; $F=0.1$, n.s. a las 6 horas) o al nivel del eje rostro-caudal del CPu analizado ($F=0.8$, n.s. a las 4 horas; $F=0.6$, n.s. a las 6 horas).

La activación de los receptores dopaminérgicos D_4 tiene un efecto doble y contrapuesto a lo largo del tiempo sobre la expresión de p-CREB mediada por morfina

Puesto que el tratamiento agudo con morfina modificó la expresión de p-CREB en el CPu a los 30 minutos y a las 4 horas, se analizó si la activación previa de los receptores D_4 era capaz de alterar este efecto.

Al analizar de manera cualitativa las secciones del CPu inmunoteñidas con anti-p-CREB se observó que a la $\frac{1}{2}$ hora de la coadministración de PD168,077 + morfina disminuye la expresión de p-CREB respecto al grupo control, pero el número de núcleos IR es similar al observado en los animales tratados con morfina (**Fig. 66A, B, D**). A las 4 horas, sin embargo, el número de núcleos IR para p-CREB era similar en los animales tratados con los dos agonistas y sólo con la morfina, aunque en ambos la expresión era mayor que en los animales control (**Fig. 66A', B', D'**). No se apreciaron diferencias aparentes en las secciones de los animales sacrificados a las 2 y 6 horas.

La cuantificación del número de núcleos IR para p-CREB (**Fig. 67**) confirmó que la expresión de este factor de transcripción a la $\frac{1}{2}$ hora era menor (-10.1%) en el grupo de ratas tratadas con PD168,077 + morfina que en el grupo control. Cuatro horas después de la administración de los dos agonistas se produjo un incremento del número de núcleos IR (+16.6%), aunque la intensidad del efecto fue menor que la provocada por la administración de morfina (+28.4%). A las 2 y 6 horas, los niveles de expresión de p-CREB en los animales tratados con los diferentes fármacos eran similares a los del grupo control.

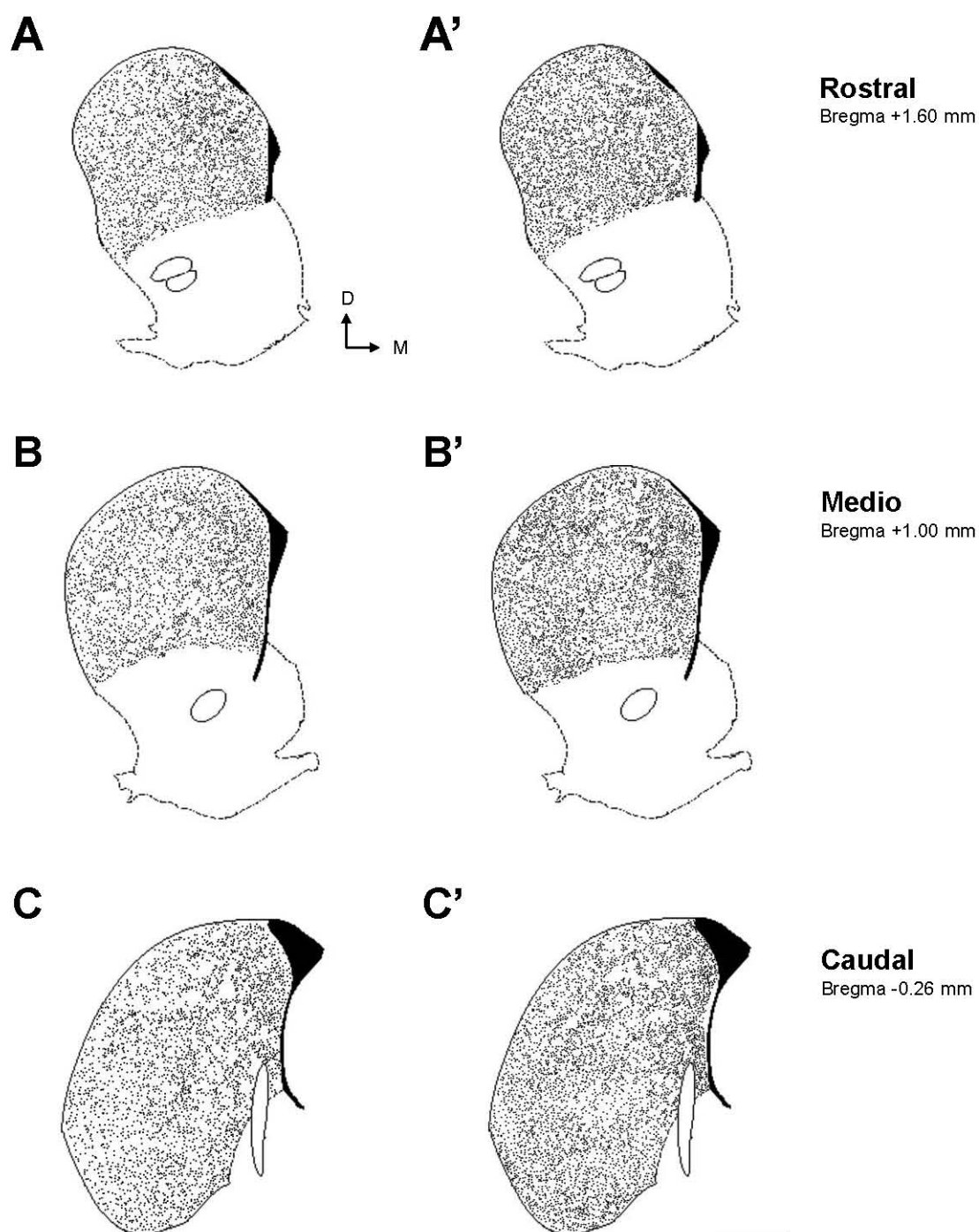


Figura 64. Patrón de expresión de la proteína p-CREB en el caudado putamen de rata tras la administración aguda de PD168,077.

A-C Esquemas representativos de la expresión de p-CREB en animales control en los niveles rostrales (**A**), medios (**B**) y caudales (**C**) del caudado putamen.

A'-C' Esquemas representativos de la expresión de p-CREB en animales tratados con PD168,077 y sacrificados a la ½ hora en los niveles rostrales (**A'**), medios (**B'**) y caudales (**C'**) del caudado putamen.

Barra: 1mm

Abreviaturas: D, dorsal; M, medial

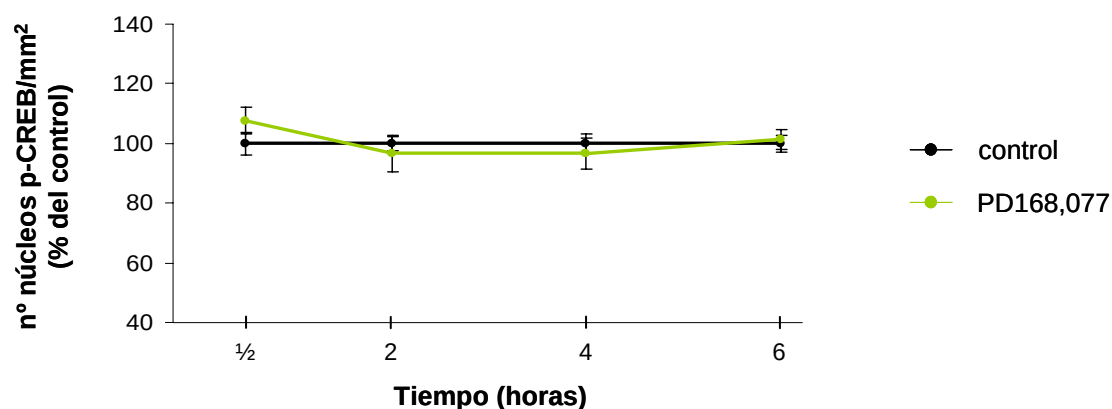


Figura 65. Número de núcleos inmunorreactivos para p-CREB por mm^2 en el caudado putamen a distintos tiempos ($\frac{1}{2}$, 2, 4, 6 horas) después del tratamiento agudo con PD168,077. Los valores representan porcentajes respecto al grupo control y se expresan como media $\pm$ EEM. ANOVA de dos vías (tiempo de supervivencia x tratamiento) seguido del test *post hoc* de Bonferroni.

Tabla 18. Número de núcleos inmunorreactivos para p-CREB por mm^2 en niveles rostrales, medios y caudales del caudado putamen a distintos tiempos ($\frac{1}{2}$, 2, 4, 6 horas) después del tratamiento agudo con PD168,077.

Tiempo (horas)	Tratamiento	Niveles rostrales	Niveles medios	Niveles caudales
$\frac{1}{2}$	Control	100.0 $\pm$ 7.3	100.0 $\pm$ 7.3	100.0 $\pm$ 5.3
	PD168,077	103.2 $\pm$ 7.4	108.1 $\pm$ 7.1	111.2 $\pm$ 8.2
2	Control	100.0 $\pm$ 4.5	100.0 $\pm$ 4.0	100.0 $\pm$ 4.5
	PD168,077	112.4 $\pm$ 10.0	109.7 $\pm$ 8.2	74.4 $\pm$ 10.0 **
4	Control	100.0 $\pm$ 6.4	100.0 $\pm$ 5.2	100.0 $\pm$ 6.2
	PD168,077	107.0 $\pm$ 11.0	93.7 $\pm$ 7.4	79.8 $\pm$ 8.3
6	Control	100.0 $\pm$ 3.9	100.0 $\pm$ 5.4	100.0 $\pm$ 5.8
	PD168,077	103.6 $\pm$ 6.2	105.6 $\pm$ 6.0	94.8 $\pm$ 5.2

Los valores representan porcentajes respecto al grupo control y se expresan como media $\pm$ EEM. ANOVA de dos vías (tratamiento x nivel del CPu) seguida del test *post hoc* de Bonferroni para cada punto de la curva de tiempo.

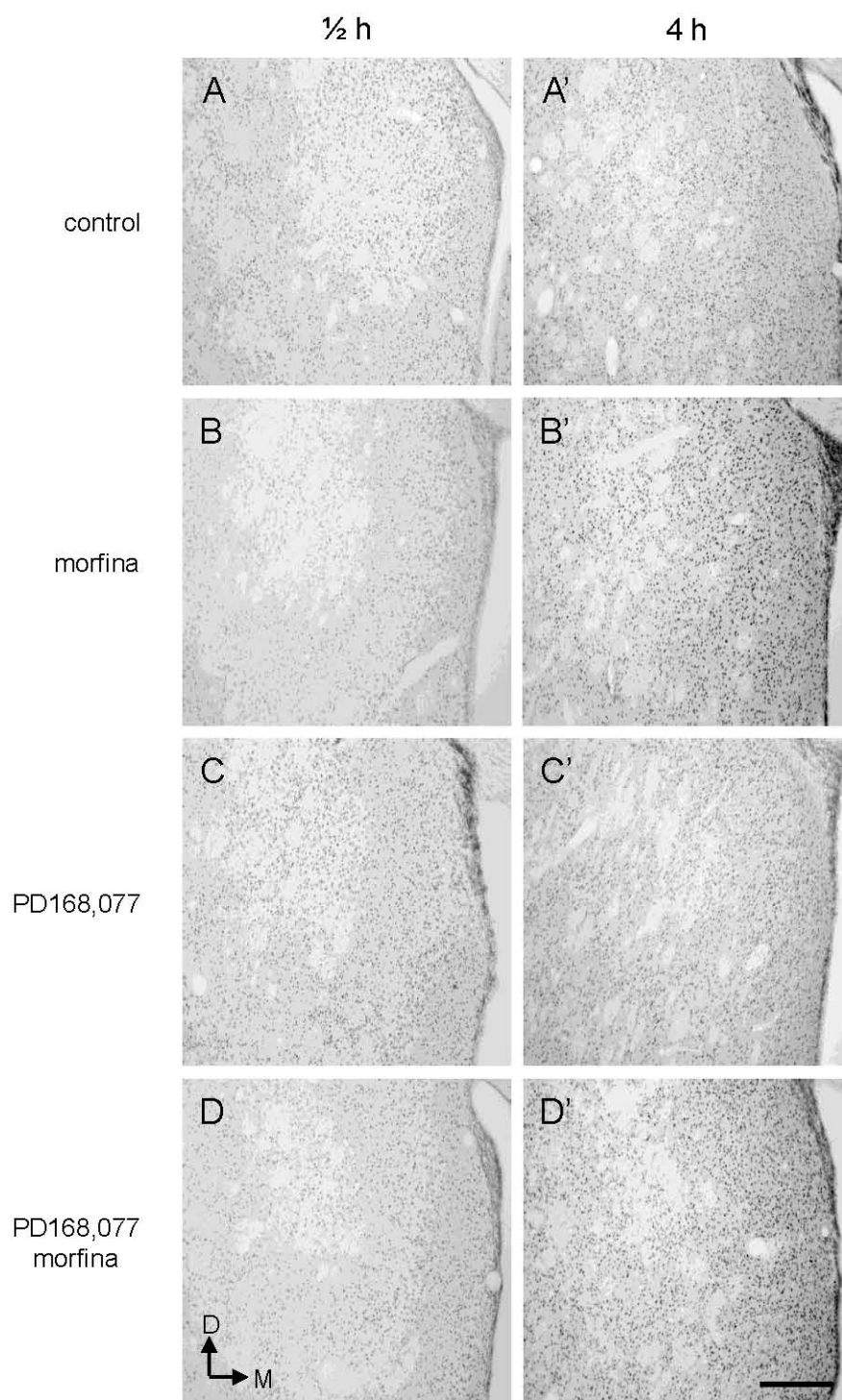


Figura 66. Microfotografías representativas de secciones coronales de cerebro de rata inmunoteñidas con anti-p-CREB que muestran el marcaje en la región dorsomedial del CPu en ratas control (**A-A'**) y tratadas con morfina (**B-B'**), PD168,077 (**C-C'**) y PD168,077 + morfina (**D-D'**) 1/2 y 4 horas después de la administración de los fármacos.

Barra: 200 μ m

Abreviaturas: D, dorsal; M, medial

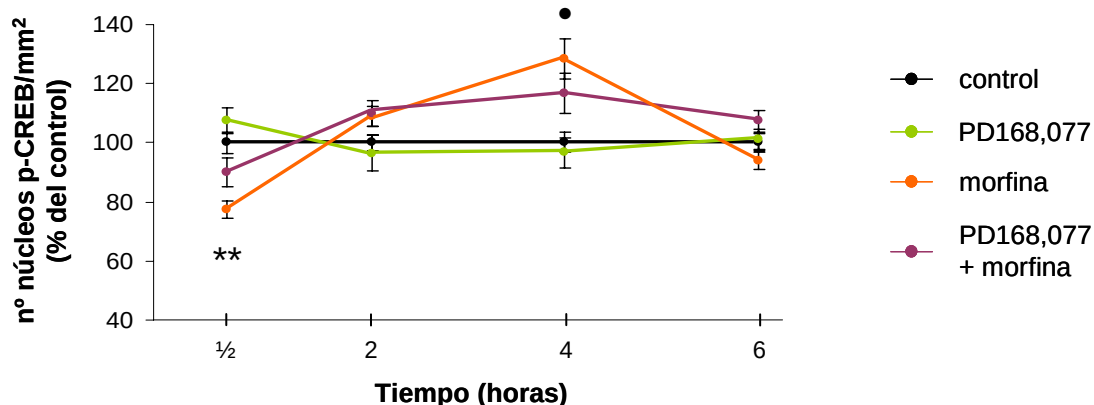


Figura 67. Número de núcleos inmunorreactivos para p-CREB en el caudado putamen de rata a distintos tiempos (1/2, 2, 4, 6 horas) después del tratamiento con morfina precedido o no de la administración del agonista PD168,077. Los valores representan porcentaje respecto al grupo control y se expresan como media $\pm$ EEM. ANOVA de dos vías (tratamiento $\times$ tiempo de supervivencia) seguida del test *post hoc* de Bonferroni, ** $p < 0.01$ morfina vs. control, PD168,077; • $p < 0.001$ morfina vs. control, PD168,077, $p < 0.05$ PD168,077 + morfina vs. control, PD168,077.

El posterior análisis estadístico de los datos mediante un ANOVA de dos vías indicó que los efectos sobre la expresión de p-CREB estaban asociados de forma significativa a la interacción de los factores tiempo de supervivencia y tratamiento ($F=7.3$, $p < 0.001$) y al factor tiempo de supervivencia de manera independiente ($F=10.1$, $p < 0.001$) pero no al tratamiento administrado ($F=1.7$, n.s.) de forma individual.

El test *post hoc* de Bonferroni confirmó que 1/2 hora después del tratamiento de PD168,077 + morfina no se modificó el número de núcleos IR para p-CREB respecto al grupo control ni respecto a los animales tratados sólo con morfina. También confirmó que 4 horas después de la administración de los fármacos el cotratamiento incrementó de forma significativa el número de núcleos IR para p-CREB respecto al grupo control ($p < 0.05$), al igual que la administración de morfina ($p < 0.001$), sin que hubiera diferencias significativas en el efecto de ambos tratamientos. A las 2 y 6 horas ningún tratamiento tuvo efectos significativos sobre la expresión de este factor de transcripción (Fig. 67).

Para completar el estudio de la expresión de p-CREB a lo largo del eje rostro-caudal

se analizó el efecto del cotratamiento en cada punto de la curva de tiempo. Para ello, el número de núcleos IR para p-CREB se cuantificó en los niveles rostrales, medios y caudales y analizando estadísticamente el efecto mediante un ANOVA de dos vías.

Treinta minutos después de la administración de los agonistas PD168,077 y morfina (Fig. 68), no se redujeron los niveles de expresión de p-CREB de forma significativa en los niveles rostrales ni en los medios respecto al grupo control, pero sí en los caudales (-32.0% , $p < 0.05$), siendo la disminución similar a la provocada por el tratamiento con morfina (-29.1% , $p < 0.001$). En los animales sacrificados a las 2 horas (Fig. 69), no se observaron diferencias significativas causadas por los fármacos en los niveles rostrales y medios. Sin embargo, como se describió anteriormente, en los niveles caudales el tratamiento con PD168,077 redujo de forma significativa el número de núcleos IR para p-CREB (-25.6% , $p < 0.05$), mientras que en los animales tratados sólo con morfina o ambos fármacos conjuntamente era similar al del grupo control. En la figura 70 se recoge que 4 horas después de la administración de los fármacos sólo la morfina incrementó el número de núcleos IR en los niveles rostrales, medios o caudales ($p < 0.05$ en los

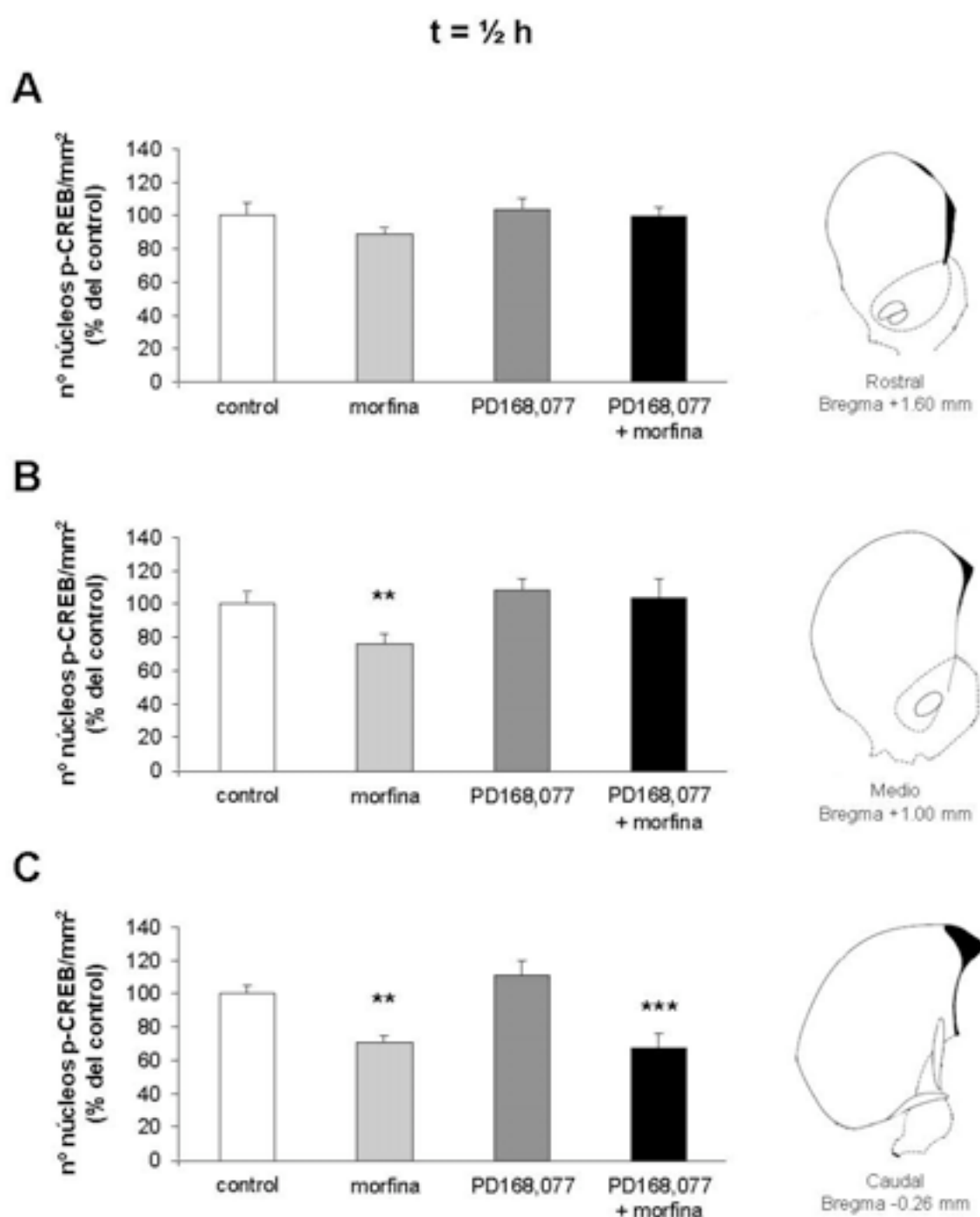


Figura 68. Número de núcleos p-CREB IR por mm² en el caudado putamen en los niveles rostrales (A), medios (B) y caudales (C) en animales sacrificados $\frac{1}{2}$ hora después del tratamiento con morfina precedido o no de la administración de PD168,077. Los valores representan porcentajes respecto al grupo control y se expresan como media $\pm$ EEM. ANOVA de dos vías (tratamiento $\times$ nivel del CPu) seguido del test *post hoc* de Bonferroni; ** $p < 0.01$ vs. control, PD168,077; *** $p < 0.001$ vs. control, PD168,077).

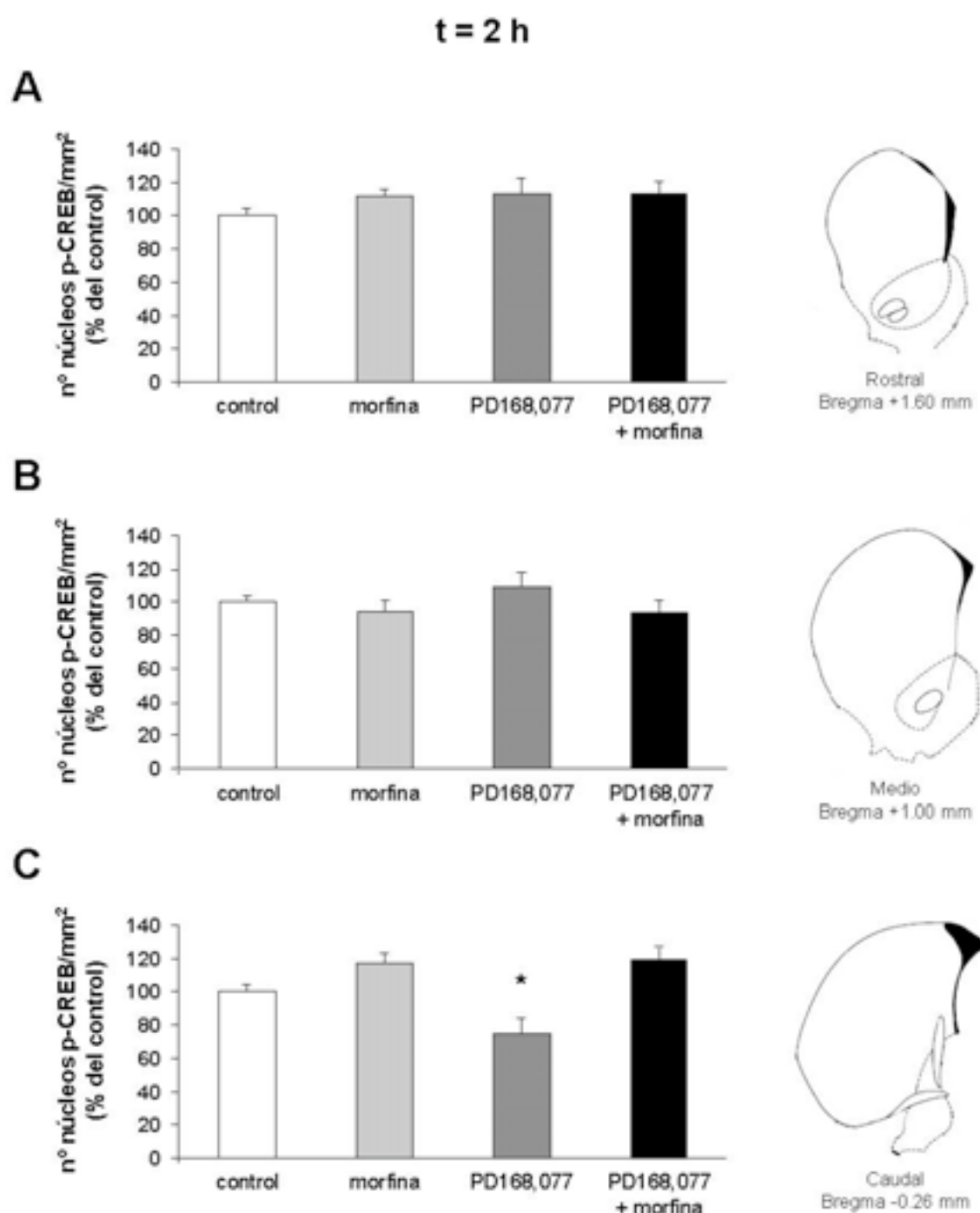


Figura 69. Número de núcleos p-CREB positivos por mm² en el caudado putamen en los niveles rostrales (A), medios (B) y caudales (C) en animales sacrificados 2 horas después del tratamiento con morfina precedido no de la administración de PD168,077. Los valores representan porcentajes respecto al grupo control y se expresan como media $\pm$ EEM. ANOVA de dos vías (tratamiento $\times$ nivel del CPu) seguido del test *post hoc* de Bonferroni; * $p < 0.05$ vs. control, morfina, PD168,077 + morfina.

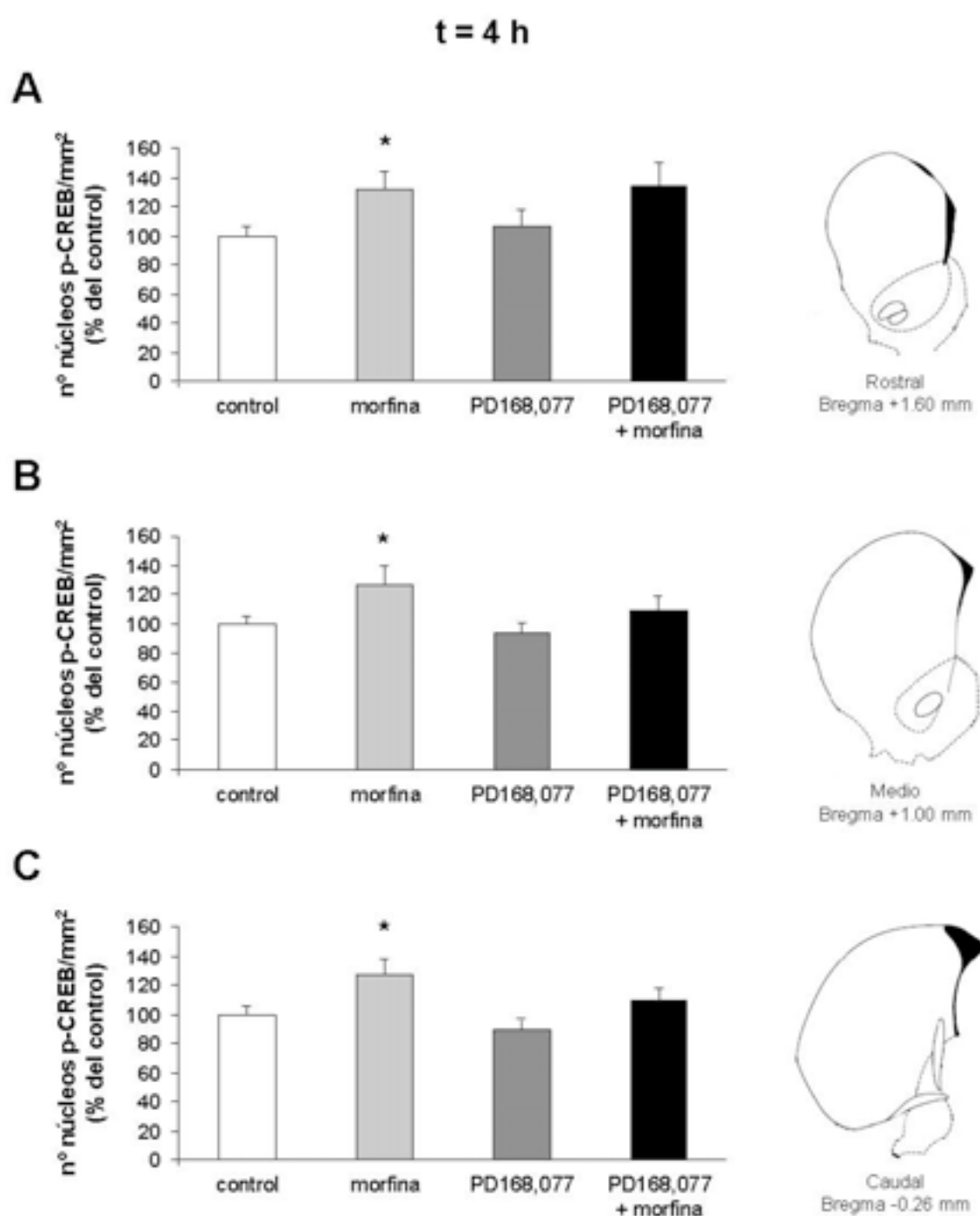


Figura 70. Número de núcleos p-CREB positivos por mm² en el caudado putamen en los niveles rostrales (A), medios (B) y caudales (C) en animales sacrificados 4 horas después del tratamiento con morfina precedido o no de la administración de PD168,077. Los valores representan porcentajes respecto al grupo control y se expresan como media $\pm$ EEM. ANOVA de dos vías (tratamiento $\times$ nivel del CPu) seguido del test *post hoc* de Bonferroni; * $p < 0.05$ vs. control.

3 niveles) del CPu. A las 6 horas (**Fig. 71**) no hubo cambios significativos en el número de núcleos IR debido a los tratamientos ($F=2.2$, n.s.) respecto al grupo control en los distintos niveles del eje rostro-caudal del CPu ($F=0.5$, n.s.).

2. Estudio de los Niveles de Expresión de Encefalina y Dinorfina en el Caudado Putamen de Rata después del Tratamiento Agudo con Morfina y/o un Agonista de los Receptores Dopaminérgicos D₄

En este estudio se evaluó el efecto de la administración aguda de morfina y el agonista de los receptores D₄ PD168,077, de forma separada o conjunta, sobre el patrón de expresión de los ARNm para los opioides endógenos encefalina y dinorfina en el CPu de rata a lo largo del tiempo.

Para llevar a cabo este análisis se cuantificaron los niveles de ARNm para encefalina y dinorfina mediante técnicas de hibridación *in situ*, en la totalidad del CPu y en sus regiones lateral y medial.

2.1. Encefalina

La morfina reduce los niveles de expresión del ARNm para encefalina en el caudado putamen de rata ½ hora después de su administración

Como muestran los autorradiogramas de la **figura 72**, en los animales control se observó una distribución homogénea del ARNm para encefalina en el CPu. En los animales tratados de forma aguda con morfina se mantuvo este patrón de expresión. Sin embargo, la densidad de los autorradiogramas fue menor en los animales

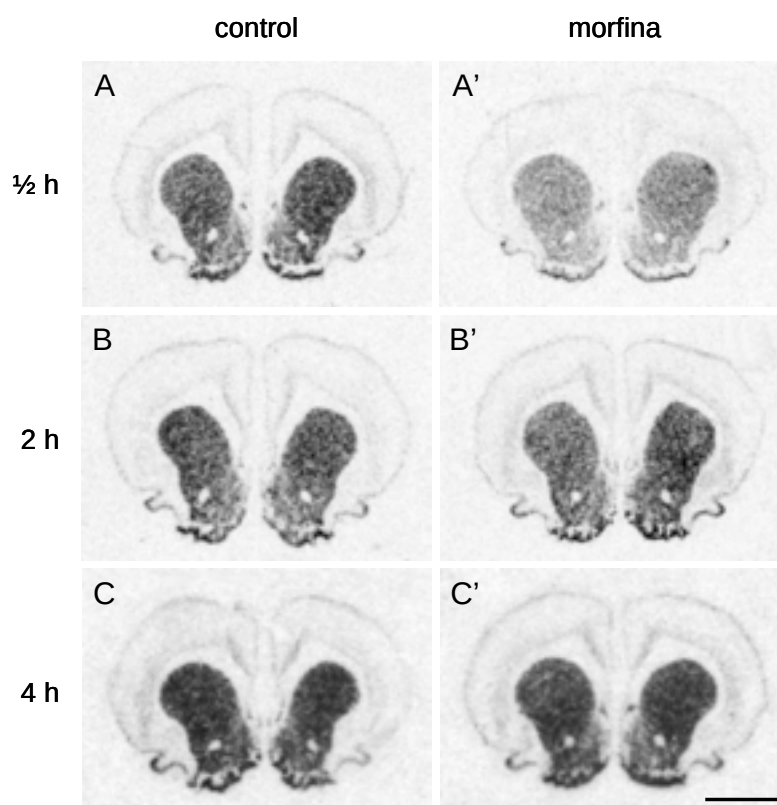


Figura 72. Autorradiogramas representativos del marcaje del ARNm para encefalina en el caudado putamen obtenido mediante hibridación *in situ* en ratas control (A-C) y ratas tratadas de forma aguda con morfina (A'-C') y sacrificadas a distintos tiempos (½, 2 y 4 horas).

Barra: 500 mm

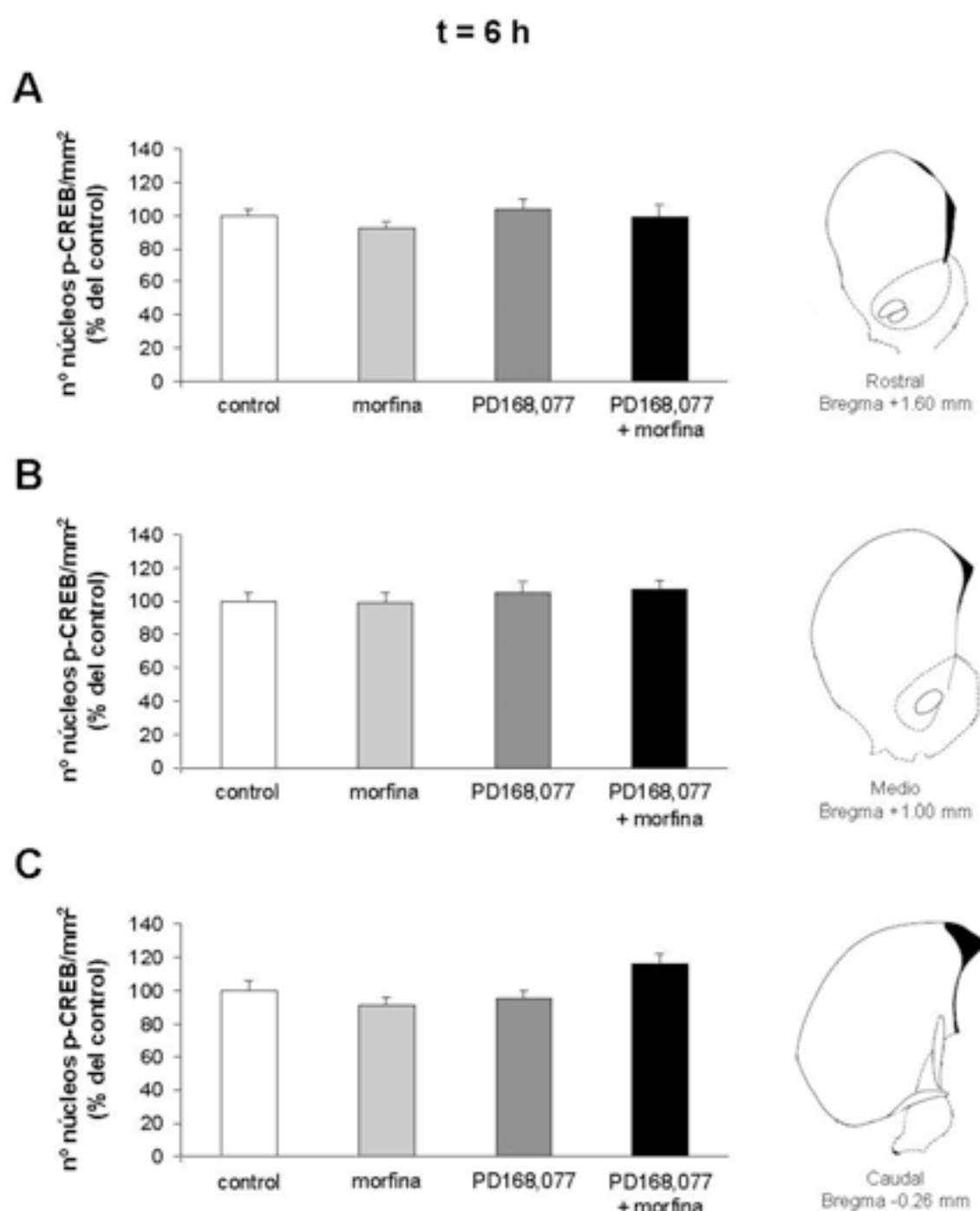


Figura 71. Número de núcleos p-CREB positivos por mm² en el caudado putamen en los niveles rostrales (A), medios (B) y caudales (C) en animales sacrificados 6 horas después del tratamiento con morfina precedido o no de la administración de PD168,077. Los valores representan porcentajes respecto al grupo control y se expresan como media $\pm$ EEM. ANOVA de dos vías (tratamiento $\times$ nivel del CPu) seguido del test *post hoc* de Bonferroni.

que recibieron morfina de forma aguda y que fueron sacrificados a los 30 minutos. A las 2 y 4 horas no se observaron diferencias.

La cuantificación de la densidad del marcaje del ARNm para encefalina indicó que el descenso a la ½ hora fue del 24.3% (**Fig. 73A**). A las 2 y 4 horas los niveles de ARNm eran similares a los del grupo control.

El análisis estadístico de los datos obtenidos se realizó mediante un ANOVA de dos vías (tiempo de supervivencia x tratamiento). Los cambios observados en los niveles de ARNm de encefalina estaban asociados de forma significativa a la interacción de los factores tratamiento y tiempo de supervivencia ($F=6.1$, $p<0.01$) y a este factor de forma independiente ($F=6.1$, $p<0.01$), pero no al tratamiento ($F=0.3$, n.s.). El test *post hoc* de Bonferroni confirmó que el descenso de la expresión de ARNm de encefalina a la ½ hora fue significativo ($p<0.01$) (**Fig. 73A**).

Debido a la complejidad estructural del CPu, se analizaron las regiones medial y lateral del núcleo. El tratamiento agudo con morfina redujo los niveles de ARNm para encefalina a los 30 minutos en la región lateral (-25.2%) (**Fig. 73B**) y en la medial (-22.1%) (**Fig. 73C**). No se observaron cambios a las 2 ó 4 horas en ninguna de las 2 regiones del CPu.

En ambas regiones, el ANOVA de dos vías (tiempo de supervivencia x tratamiento) indicó que los cambios en los niveles de ARNm para encefalina estaban asociados de forma significativa al tiempo de supervivencia (región lateral $F=5.2$, $p<0.01$; región medial $F=5.6$, $p<0.01$) y a la

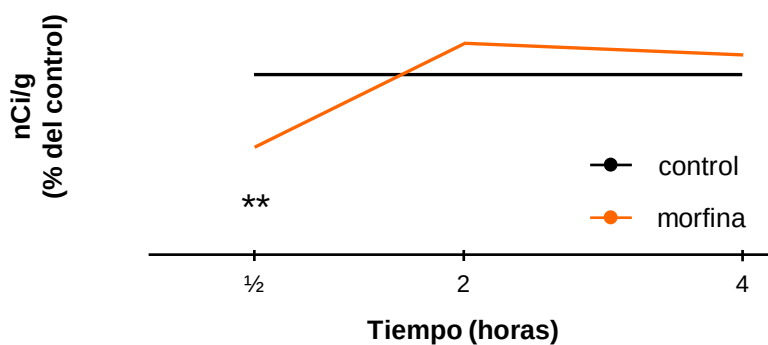
interacción de este factor con el tratamiento (región lateral $F=5.2$, $p<0.01$; región medial $F=5.6$, $p<0.01$), pero no al factor tratamiento de forma independiente (región lateral $F=0.2$, n.s.; región medial $F=0.4$, n.s.). El test *post hoc* de Bonferroni confirmó que la disminución ½ hora después del tratamiento fue significativa ($p<0.01$) (**Fig. 73B-C**) en ambas regiones y que el tratamiento no tuvo efecto ni a las 2 ni a las 4 horas.

Al comparar la intensidad del efecto del tratamiento con morfina en la región medial y lateral no se encontraron diferencias significativas ($F=0.08$, n.s.).

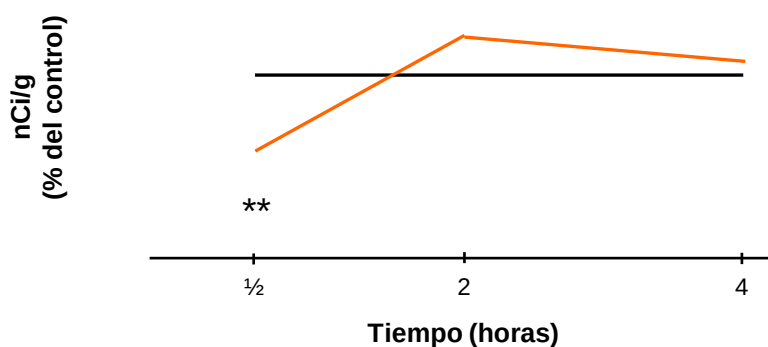
La activación aguda de los receptores dopaminérgicos D₄ tiene un efecto doble y opuesto sobre la expresión de ARNm para encefalina en el caudado putamen de rata

Los autorradiogramas obtenidos de animales tratados de forma aguda con PD168,077 (**Fig. 74**) mostraron que el patrón de distribución del ARNm para encefalina era homogéneo en el CPu. No se apreciaron diferencias a simple vista en la densidad del marcaje en los autorradiogramas de los animales tratados con el agonista dopaminérgico respecto al grupo control.

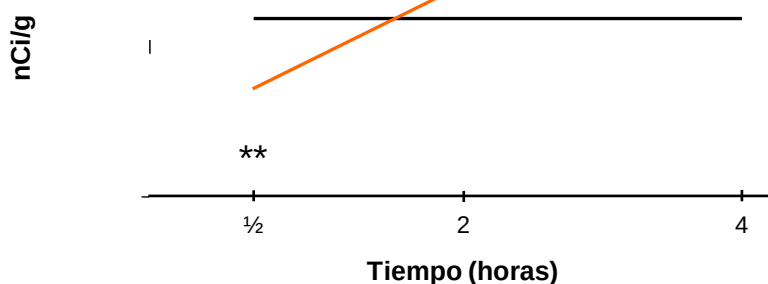
Sin embargo, el estudio cuantitativo de los niveles de ARNm para encefalina indicó que el tratamiento agudo con PD168,077 tuvo un efecto doble sobre la expresión de este ARNm en el CPu a lo largo del tiempo. A los 30 minutos se produjo una disminución del 12.7% mientras que a las 2 horas se observó un incremento (+11.7%). A las 4

A

CPu

B

CPuL

C

CPuM

73. Niveles de expresión del ARNm para encefalina (unidades relativas de radiactividad (nCi/g)) en el caudado putamen de rata (**A**) y en sus regiones lateral (**B**) y medial (**C**) a distintos tiempos (½, 2, 4 horas) después del tratamiento agudo con morfina. Los valores representan porcentajes respecto al grupo control y se expresan como media $\pm$ EEM. ANOVA de dos vías (tratamiento administrado x tiempo de supervivencia) seguido del test *post hoc* de Bonferroni; ** $p < 0.01$ vs. control.

Abreviaturas: CPu, caudado putamen; CPuL, caudado putamen lateral; CPuM, caudado putamen medial

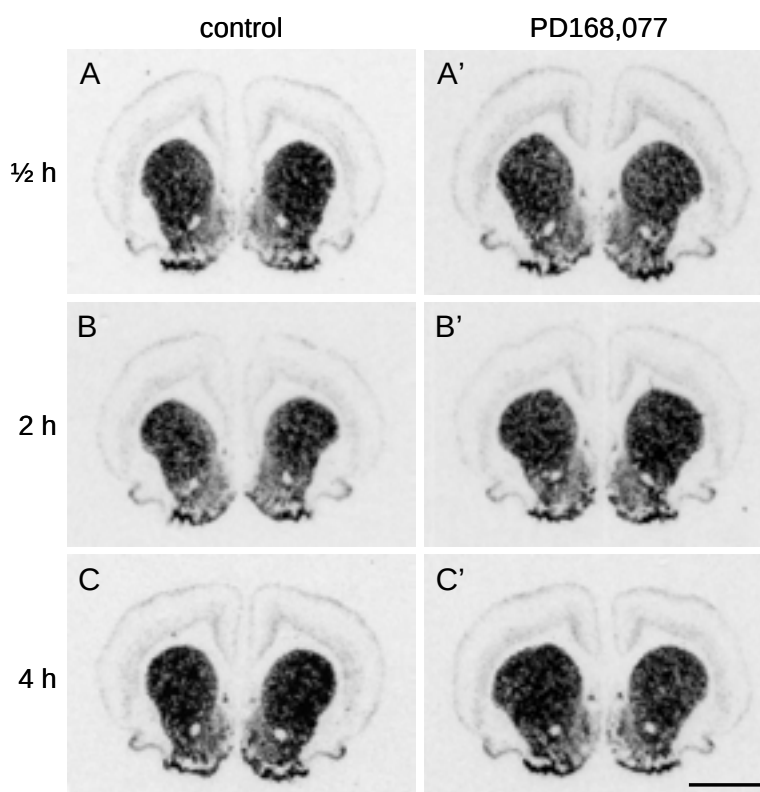


Figura 74. Autorradiogramas representativos del marcaje del ARNm para encefalina en el caudado putamen obtenido mediante hibridación *in situ* en ratas control (A-C) y ratas tratadas de forma aguda con PD168,077 (A'-C') y sacrificadas a distintos tiempos ($\frac{1}{2}$, 2 y 4 horas).

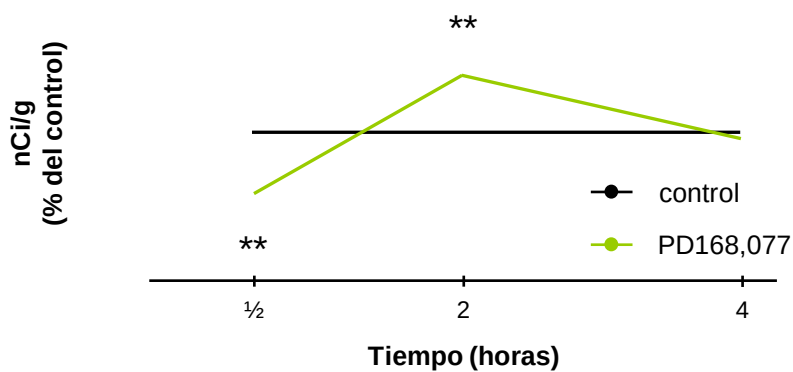
Barra: 500 mm

horas los niveles eran similares a los del grupo control (**Fig. 75A**).

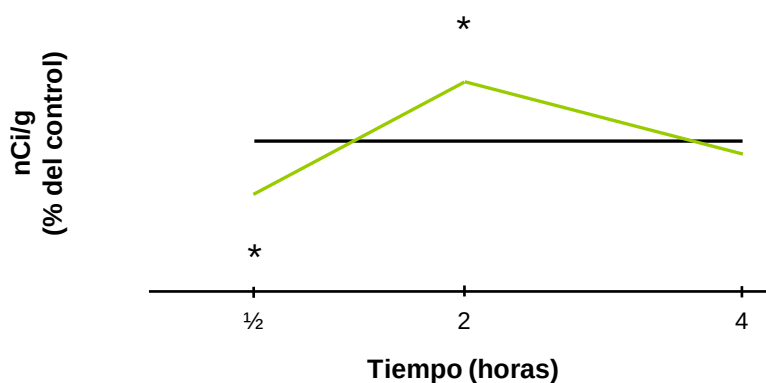
El análisis estadístico mediante un ANOVA de dos vías indicó que los cambios observados estaban asociados tanto al tiempo de supervivencia ($F=8.2$, $p<0.001$) como a su interacción con el tratamiento recibido ($F=8.2$, $p<0.001$), pero no a éste segundo factor de forma independiente ($F=0.1$, n.s.). El test *post hoc* de Bonferroni confirmó que el efecto observado a los 30 minutos fue significativo al igual que a las 2 horas ($p<0.01$ para ambos tiempos) (**Fig. 75A**).

El tratamiento agudo con PD168,077 redujo los niveles de ARNm para encefalina a la $\frac{1}{2}$ hora en la región lateral del Cpu (-10.7%) y en la medial (-9.9 %). A las 2 horas, se observó un aumento del 12.2% en la región lateral y de un 12.8% en la región medial. A las 4 horas del tratamiento los niveles de ARNm retornaron a los niveles basales en ambas regiones (**Fig. 75B-C**).

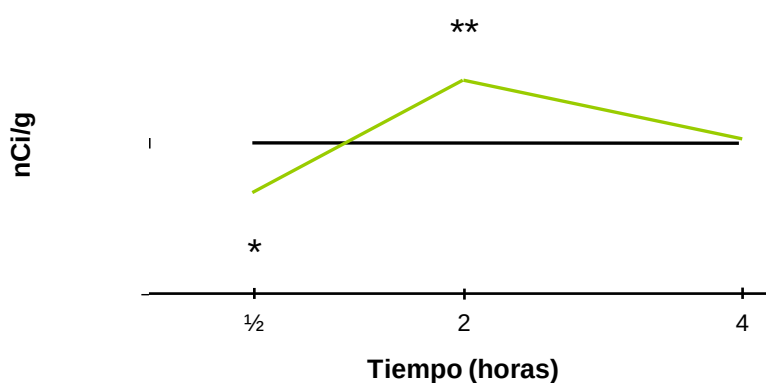
Tras analizar estadísticamente los datos obtenidos en la región lateral, se encontró que el efecto de PD168,077 observado estaba asociado de forma significativa tanto al tiempo de supervivencia ($F=4.5$, $p<0.05$) como a la interacción (tiempo de supervivencia x tratamiento recibido) ($F=4.5$, $p<0.05$) pero no al tratamiento que recibieron los animales ($F=0.1$, n.s.) (**Fig. 75B**). En la región medial, el ANOVA de dos vías indicó que los cambios observados estaban asociados al tiempo de supervivencia ($F=6.3$, $p<0.01$) y a su interacción con el tratamiento recibido ($F=6.3$, $p<0.01$), aunque no estaban asociados a la influencia de este factor de forma independiente ($F=0.2$, n.s.) (**Fig. 75C**). En ambos casos, el test *post hoc* de Bonferroni indicó que los cambios a la $\frac{1}{2}$ y 2 horas de la administración de PD168,077 fueron significativos tanto en la región lateral ($p<0.05$) como en la medial ($\frac{1}{2}$ hora, $p<0.05$; 2 horas, $p<0.01$) (**Fig. 75B-C**).

A

CPu

B

CPuL

C

CPuM

75. Niveles de expresión del ARNm para encefalina (unidades relativas de radiactividad (nCi/g)) en el caudado putamen de rata (**A**) y en sus regiones lateral (**B**) y medial (**C**) a distintos tiempos (½, 2, 4 horas) después de la administración de PD168,077. Los valores representan porcentajes respecto al grupo control y se expresan como media $\pm$ EEM. ANOVA de dos vías (tratamiento x tiempo de supervivencia) seguido del test *post hoc* de Bonferroni; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. control.

Abreviaturas: CPu, caudado putamen; CPuL, caudado putamen lateral; CPuM, caudado putamen medial

Al comparar los efectos debido al tratamiento en ambas regiones del CPu, se observó que la administración de PD168,077 modificó los niveles de ARNm para encefalina con la misma intensidad en las dos regiones a la ½ hora ($F=0.01$, n.s.) y las 2 horas ($F=0.01$, n.s.).

El tratamiento conjunto de PD168,077 y morfina tiene un efecto doble sobre la expresión del ARNm para encefalina en el caudado putamen de rata a lo largo del tiempo

La densidad del marcaje para el ARNm para encefalina en los animales tratados con PD168,077 + morfina y sacrificados a la ½ hora fue similar al observado en las ratas del grupo control (**Fig. 76**) y mayor que en los animales a lo que se les administró sólo morfina. A las 2 y 4 horas de la administración de los fármacos, no se apreciaron cambios en la densidad de los autorradiogramas en los animales cotratados con PD168,077 y morfina respecto a los otros grupos experimentales.

Al analizar cuantitativamente los niveles de expresión del ARNm para encefalina se

observó un incremento del 24.4% a la ½ hora de la administración de PD168,077 + morfina (**Fig. 77A**). Sin embargo, a las 2 y 4 horas, la coadministración de los fármacos redujo los niveles de ARNm en relación al grupo control (-18.3% y -13.3% respectivamente).

El ANOVA de dos vías con el que se analizaron los datos, indicó que los cambios en la expresión de ARNm para encefalina estaban asociados a la interacción de los factores tiempo de supervivencia y tratamiento ($F=9.7$, $p<0.001$) y no a éstos de forma independiente (tratamiento $F=0.8$, n.s.; tiempo de supervivencia $F=0.3$, n.s.). El test *post hoc* de Bonferroni indicó que sólo el aumento de los niveles de ARNm a los 30 minutos era significativo ($p<0.05$) (**Fig. 77A**).

El efecto de la administración conjunta de PD168,077+ morfina que se observó al considerar la totalidad del CPu se reprodujo en las regiones lateral y medial del mismo. Así, en la región lateral el tratamiento con PD168,077 + morfina incrementó (+26.8%) la expresión de ARNm para encefalina a los 30 minutos (**Fig. 77B**), mientras que la redujo a las 2 (-14.4%) y 4 (-16.3%) horas. En la región medial también se observó el

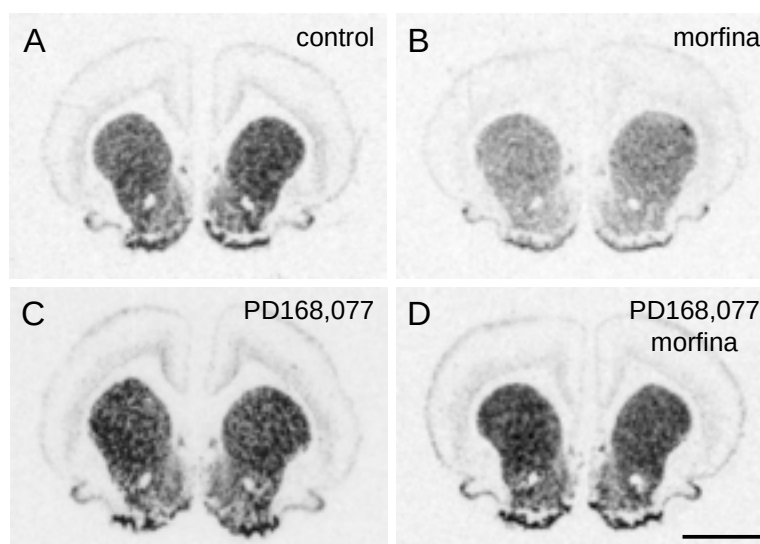


Figura 76. Autorradiogramas representativos del marcaje del ARNm para encefalina en el caudado putamen obtenido mediante hibridación *in situ* en ratas control (**A**) y ratas tratadas de forma aguda con morfina (**B**), PD168,077 (**C**) y PD168,077 + morfina (**D**) y sacrificadas tras ½ hora.

Barra: 500 mm

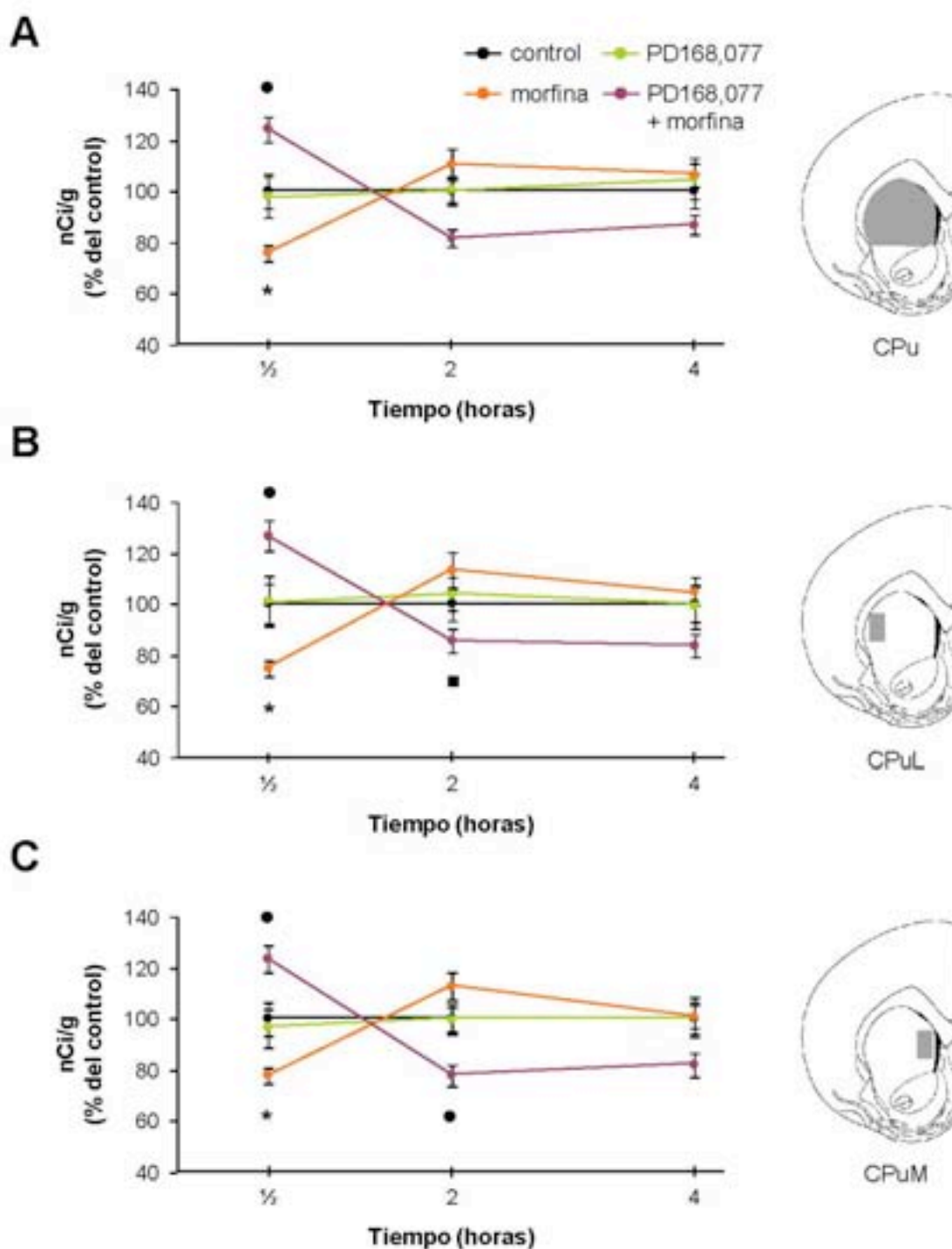


Figura 77. Niveles de expresión del ARNm para encefalina (unidades relativas de radiactividad (nCi/g)) en el caudado putamen de rata (**A**) y en sus regiones lateral (**B**) y medial (**C**) a distintos tiempos (1/2, 2 y 4 horas) después de la administración de morfina. Los valores representan porcentajes respecto al grupo control y se expresan como media $\pm$ EEM. ANOVA de dos vías (tiempo de supervivencia $\times$ tratamiento) seguido del test *post hoc* de Bonferroni; * $p < 0.05$ morfina vs. control, PD168,077, PD168,077 + morfina; ● $p < 0.05$ PD168,077 + morfina vs. control, PD168,077, morfina; ■ $p < 0.05$ PD168,077+morfina vs. morfina.

Abreviaturas: CPu, caudado putamen; CPuL, caudado putamen lateral; CPuM, caudado putamen medial

incremento de los niveles de ARNm para encefalina (+23.3%) a los 30 minutos y la reducción a las 2 (-22.3%) y 4 (-18.0%) horas del tratamiento con PD168,077 + morfina (**Fig. 77C**).

El análisis estadístico de los valores obtenidos mediante un ANOVA de dos vías en cada región mostró que los cambios observados estaban asociados de forma significativa solo a la interacción de los factores tiempo de supervivencia y tratamiento en ambos casos ($F=7.8$, $p<0.001$ para la región lateral; $F=10.45$, $p<0.001$ para la región medial). El test *post hoc* de Bonferroni (**Fig. 77B-C**) indicó que el incremento de los niveles a la media hora fue significativo en las dos regiones ($p<0.05$), mientras que el descenso de los niveles de ARNm para encefalina sólo fue significativo a las 2 horas en la región medial ($p<0.05$). A las 4 horas el

cotratamiento no tuvo efectos significativos en ninguna de las dos regiones del CPu.

2.2. Dinorfina

La morfina reduce la expresión del ARNm para dinorfina en el caudado putamen de rata $\frac{1}{2}$ hora después de su administración

El ARNm para dinorfina presentó un patrón de distribución en el CPu distinto al del ARNm para encefalina. Como muestran los autorradiogramas de los animales control (**Fig. 78 y 79**), el ARNm para dinorfina se expresó de manera heterogénea, siendo más abundante en los estriosomas que en la matriz, tal y como han descrito otros autores (Gerfen, 1992; Hurd y Herkenham, 1995).

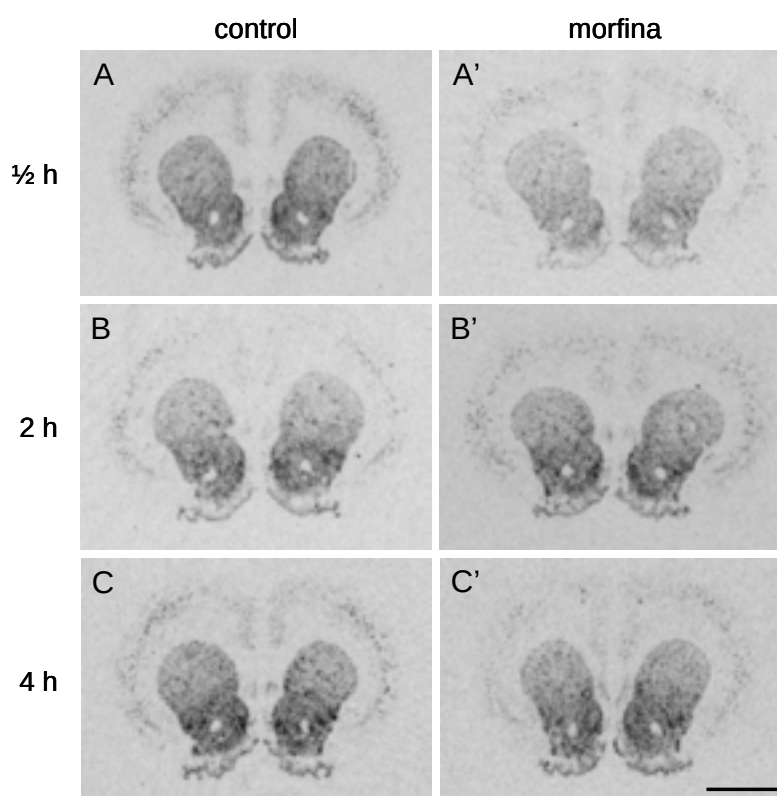


Figura 78. Autorradiogramas representativos del marcaje del ARNm para dinorfina en el caudado putamen obtenido mediante hibridación *in situ* en ratas control (**A-C**) y ratas tratadas de forma aguda con morfina (**A'-C'**) y sacrificadas a distintos tiempos ($\frac{1}{2}$, 2 y 4 horas).

Barra: 500 mm

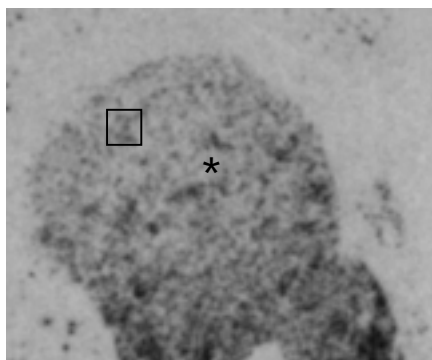


Figura 79. Detalle del marcaje del ARNm para dinorfina en el caudado putamen de rata en el que se aprecia una mayor abundancia en el compartimento estriosomal (enmarcado) que en la matriz (asterisco).

Al comparar la densidad del marcaje de los autorradiogramas obtenidos de las ratas tratadas con morfina y sacrificadas a distintos tiempos con los de los animales control, se observó claramente una disminución a los 30 minutos, sin que se apreciaran diferencias a las 2 ó 4 horas (**Fig. 78**).

Tras medir los niveles de expresión del ARNm para dinorfina en el CPu, se observó una reducción del 31.1% $\frac{1}{2}$ hora después del tratamiento respecto al grupo control, mientras que no hubo cambios a las 2 ó 4 horas (**Fig. 80A**). El ANOVA de dos vías indicó que los efectos observados estaban asociados de manera significativa al tiempo de supervivencia ($F=19.8$, $p<0.001$), al tratamiento ($F=16.3$, $p<0.001$) y a la interacción de estos dos factores ($F=19.9$, $p<0.001$) (**Fig. 80A**). El test *post hoc* de Bonferroni confirmó que la disminución de la expresión del ARNm para dinorfina a la $\frac{1}{2}$ hora fue significativa ($p<0.001$) (**Fig. 80A**).

Respecto a las regiones lateral y medial del CPu, los niveles de ARNm para dinorfina disminuyeron en ambas regiones a la $\frac{1}{2}$ hora del tratamiento con morfina (-28.6% en la región lateral y -38.8% en la región medial) (**Fig. 80B-C**).

Los cambios observados en la región lateral estaban asociados a la interacción de los factores tratamiento y tiempo de supervivencia ($F=14.3$, $p<0.001$) y a este último factor ($F=14.3$, $p<0.001$) pero no al

tratamiento ($F=2.9$, n.s.). Sin embargo, en la región medial los efectos estaban asociados al tiempo de supervivencia ($F=30.9$, $p<0.001$), al tratamiento ($F=16.9$, $p<0.001$) y a la interacción de ambos factores ($F=30.9$, $p<0.001$). El test *post hoc* de Bonferroni confirmó que los niveles de ARNm disminuyeron a los 30 minutos del tratamiento en ambas regiones ($p<0.001$) (**Fig. 80B-C**). La intensidad del efecto de la morfina fue similar en las regiones medial y lateral ya que se encontraron diferencias significativas ($F=2.4$, n.s.) al comparar los datos obtenidos en ambas regiones.

La activación aguda de los receptores dopaminérgicos D_4 no modifica la expresión de ARNm para dinorfina en el caudado putamen de rata

Como muestran los autorradiogramas recogidos en la **figura 81**, no se apreciaron cambios en la densidad del marcaje del ARNm para dinorfina en los animales a los que se administró PD168,077 comparados con el grupo control.

Al cuantificar los niveles de ARNm para dinorfina y comparar los valores obtenidos en animales tratados con PD168,077 con los del grupo control, no se encontraron diferencias en ninguno de los tiempos analizados ($\frac{1}{2}$, 2, 4 horas) (**tabla 19**).

El análisis estadístico mediante un ANOVA de dos vías confirmó que no existían cambios significativos asociados al tiempo de supervivencia ($F=0.01$, n.s.), al tratamiento recibido ($F=1.2$, n.s.) o a la interacción de ambos factores ($F=0.01$, n.s.) (**tabla 19**). Tanto en la región lateral como en la medial del CPu tampoco se observaron cambios en los niveles de ARNm para dinorfina (**tabla 19**). En ninguna de ellas se encontraron variaciones en la expresión de este ARNm asociadas al tratamiento (región lateral $F=0.1$, n.s.; región medial $F=1.0$, n.s.), al tiempo de supervivencia (región lateral $F=0.3$; n.s., región medial $F=1.2$, n.s.) o a la interacción de ambos factores (región lateral $F=0.3$, n.s.; región medial $F=1.2$, n.s.).

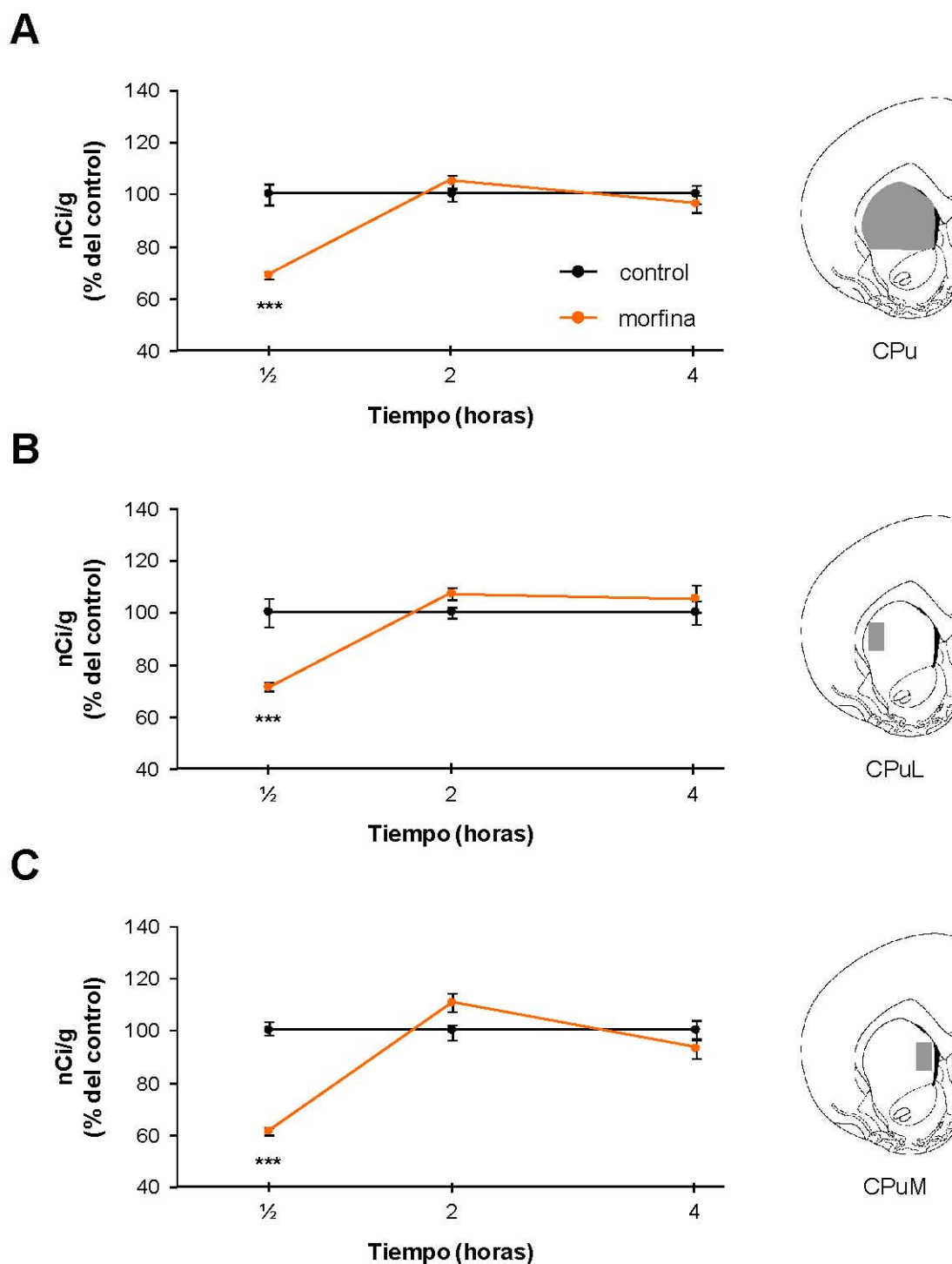


Figura 80. Niveles de expresión del ARNm para dinorfina (unidades relativas de radiactividad (nCi/g)) en el caudado putamen de rata (**A**) y en sus regiones lateral (**B**) y medial (**C**) a distintos tiempos (1/2, 2 y 4 horas) después de la administración de morfina. Los valores representan porcentajes respecto al grupo control y se expresan como media $\pm$ EEM. ANOVA de dos vías (tiempo de supervivencia x tratamiento) seguido del test *post hoc* de Bonferroni; *** $p < 0.001$ vs. control.

Abreviaturas: CPu, caudado putamen; CPuL, caudado putamen lateral; CPuM, caudado putamen medial

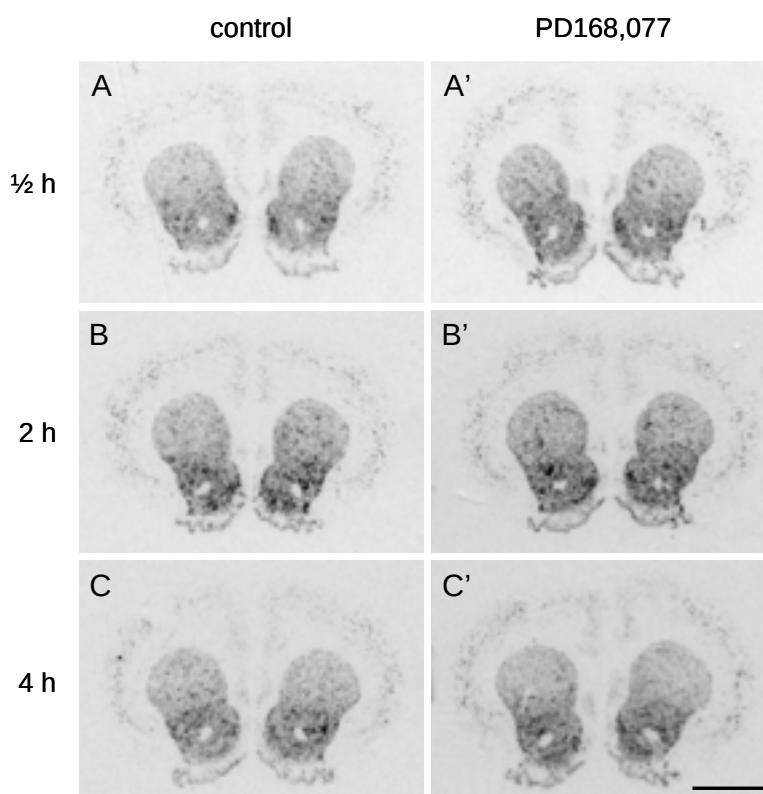


Figura 81. Autorradiogramas representativos del marcaje del ARNm para dinorfina en el caudado putamen obtenido mediante hibridación *in situ* en ratas control (A-C) y ratas tratadas de forma aguda con PD168,077 (A'-C') y sacrificadas a distintos tiempos (½, 2 y 4 horas). Barra: 500 mm

Tabla 19. Niveles de expresión del ARNm para dinorfina (unidades relativas de radiactividad (nCi/g) en el caudado putamen de rata y en sus regiones lateral y medial a distintos tiempos (½, 2 y 4 horas) después del tratamiento agudo con PD168,077.

	Tiempo (horas)	control	PD168,077
CPu	½	100.0 ± 4.4	103.8 ± 4.3
	2	100.0 ± 2.5	102.7 ± 3.8
	4	100.0 ± 3.2	103.9 ± 3.5
CPuL	½	100.0 ± 4.6	99.2 ± 4.5
	2	100.0 ± 3.2	99.7 ± 5.5
	4	100.0 ± 3.9	104.9 ± 2.9
CPuM	½	100.0 ± 3.7	96.9 ± 4.1
	2	100.0 ± 3.8	103.9 ± 5.1
	4	100.0 ± 4.0	109.2 ± 3.7

Los valores representan porcentajes respecto al grupo control y se expresan como media ± EEM. ANOVA de dos vías (tratamiento x nivel del CPu) seguida del test *post hoc* de Bonferroni para cada punto de la curva de tiempo.

La activación de los receptores dopaminérgicos D_4 previene la disminución de los niveles de ARNm para dinorfina que ocurre 30 minutos después del tratamiento agudo con morfina

Los niveles de ARNm para dinorfina también fueron analizados a lo largo del tiempo ($\frac{1}{2}$, 2 y 4 horas) tras la administración conjunta de PD168,077 + morfina.

El análisis de los autorradiogramas, junto con la obtención de los niveles de ARNm para dinorfina en el CPu, mostró que no existían diferencias entre los animales tratados con PD168,077 + morfina y los del grupo control a los 30 minutos, aunque la densidad del marcaje era mayor en los animales cotratados que en los animales tratados sólo con morfina (**Fig. 82 y 83A**). Por tanto, la activación de los receptores D_4 previno el efecto de la morfina sobre la expresión de este ARNm. El cotratamiento con ambos fármacos no tuvo efectos ni a las 2 ni a las 4 horas.

El ANOVA de dos vías indicó que los cambios observados en los niveles del

ARNm para dinorfina estaban asociados al tiempo de supervivencia ($F=3.3$, $p<0.05$), al tratamiento ($F=13.77$, $p<0.001$) y a la interacción de ambos factores ($F=7.4$, $p<0.001$). El test *post hoc* de Bonferroni confirmó que el efecto observado a los 30 minutos era significativo ($p<0.01$ PD168,077+ morfina vs. morfina) (**Fig. 83A**).

En la región lateral del CPu, el cotratamiento con PD168,077 + morfina incrementó la expresión del ARNm para dinorfina a la $\frac{1}{2}$ hora (+16.2%). No se observaron cambios a las 2 horas, pero sí un pequeño aumento (+18.7%) a las 4 horas respecto al grupo control (**Fig. 83B**). Los cambios en la expresión del ARNm estaban asociados de manera significativa al tiempo de supervivencia ($F=5.9$, $p<0.01$), al tratamiento ($F=14.4$, $p<0.001$) y a la interacción de ambos factores ($F=8.6$, $p<0.001$). El test *post hoc* de Bonferroni mostró que los niveles de ARNm para dinorfina eran significativamente mayores en los animales tratados con PD168,077 + morfina que en los tratados sólo con morfina o el grupo control ($p<0.05$) a los 30 minutos. A las 4 horas, el incremento sólo fue significativamente mayor respecto al grupo

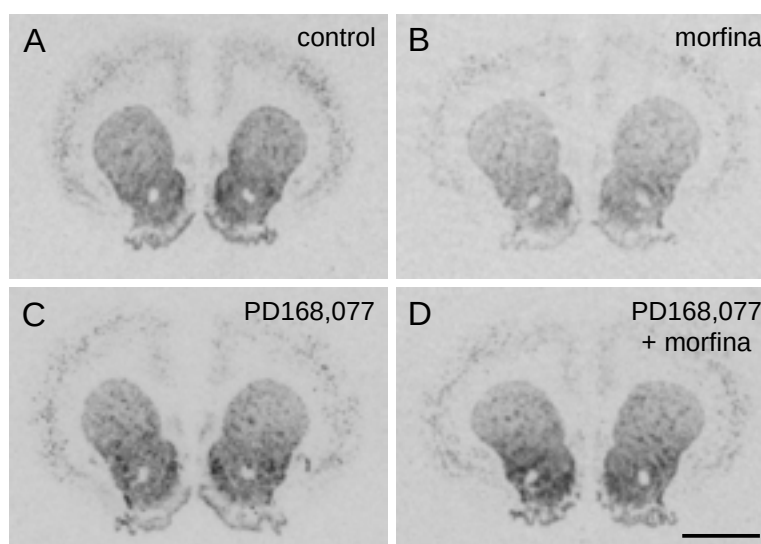


Figura 82. Autorradiogramas representativos del marcaje del ARNm para dinorfina en el caudado putamen obtenido mediante hibridación *in situ* en ratas control (A) y ratas tratadas de forma aguda con morfina (B), PD168,077 (C) y PD168,077 + morfina (D) y sacrificadas tras $\frac{1}{2}$ hora.

Barra: 500 mm

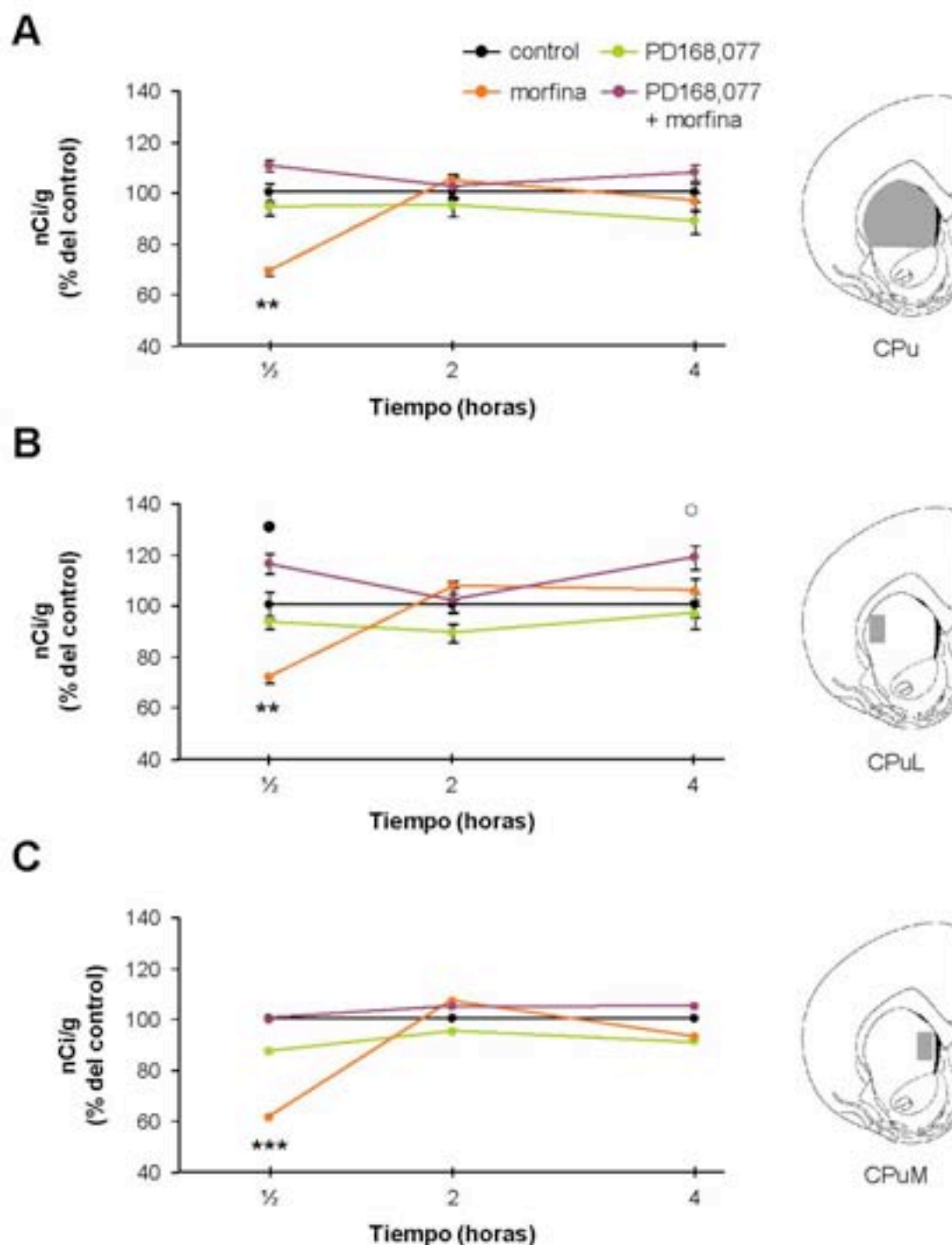


Figura 83. Niveles de expresión del ARNm para dinorfina (unidades relativas de radiactividad (nCi/g)) en el caudado putamen (CPu) de rata (**A**) y en sus regiones lateral (CPuL) (**B**) y medial (CPuM) (**C**) a distintos tiempos (1/2, 2 y 4 horas) después de la administración de PD168,077 y/o morfina. Los valores representan porcentajes respecto al grupo control y se expresan como media $\pm$ EEM. ANOVA de dos vías (tratamiento $\times$ tiempo de supervivencia) seguido del test *post hoc* de Bonferroni; ** $p < 0.01$ morfina vs. control, PD168,077, PD168,077 + morfina; *** $p < 0.001$ morfina vs. control, PD168,077, PD168,077 + morfina; • $p < 0.05$ PD168,077 + morfina vs. control, morfina, PD168,077; ○ $p < 0.05$ PD168,077 + morfina vs. control. Abreviaturas: CPu, caudado putamen; CPuL, caudado putamen lateral; CPuM, caudado putamen medial

control ($p < 0.05$) (**Fig. 83B**). En la región medial, la administración de PD168,077 + morfina no modificó los niveles de ARNm para dinorfina a los 30 minutos respecto al grupo control (**Fig. 83C**). No se observaron cambios debido a los tratamientos ni a las 2 ni a las 4 horas.

El análisis estadístico de los valores de ARNm para dinorfina indicó que los efectos sobre sus niveles de expresión estaban asociados al tiempo de supervivencia ($F=22.01$, $p < 0.001$), al tratamiento ($F=16.8$, $p < 0.001$) y a la interacción de ambos factores ($F=11.0$, $p < 0.001$). El test *post hoc* de Bonferroni confirmó que a los 30 minutos no hubo diferencias significativas entre los animales cotratados con PD168,077 + morfina y el grupo control, pero sí con el grupo de ratas tratadas sólo con morfina ($p < 0.001$) (**Fig. 83C**).

3. Influencia de los Receptores Dopaminérgicos D_4 sobre las Características Farmacológicas de los Receptores Opioides tipo μ en el Caudado Putamen de Rata

Mediante estudios de unión a ligandos en condiciones de saturación comprobaremos si la activación de los receptores D_4 mediante PD168,077 modifica las características farmacológicas (afinidad (K_D) y número de sitios de unión (B_{max})) de los receptores MOR en el CPu de rata. Para llevarlo a cabo, se realizó un estudio a lo largo del tiempo ($\frac{1}{2}$, 2, 4, 6 horas) y se evaluó el efecto de distintas dosis de el agonista PD168,077 (0.5, 1 y 3 mg/kg).

En los animales control, la unión específica de [^{3} H]DAMGO (agonista de los receptores MOR) en función de la concentración creciente de este radioligando permitió determinar, mediante un análisis de regresión no lineal de la curva

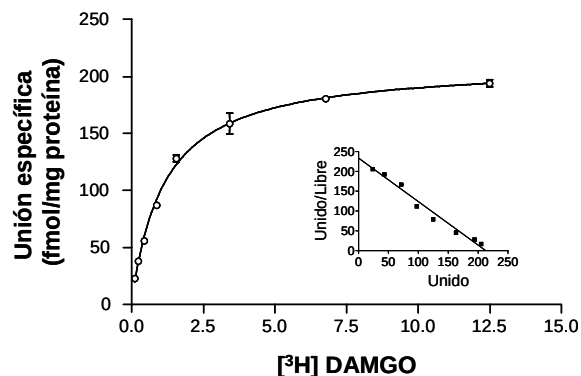


Figura 84. Curva de saturación representativa de la unión específica del agonista [^{3} H]DAMGO en el caudado putamen de rata.

obtenida, los parámetros de unión $K_D=1.7$ nM y $B_{max}=212.4$ fmol/mg proteína (**Fig. 84**). El análisis de Scatchard indicó la existencia de una sola población de sitios de alta afinidad (**Fig. 84, inserto**).

La activación aguda de los receptores dopaminérgicos D_4 disminuye la densidad de receptores opioide tipo μ pero no modifica su afinidad en el caudado putamen de rata

La activación de los receptores D_4 mediante PD168,077 (1 mg/kg) (**Fig. 85A y 86**) provocó un descenso (-23.7%) de la densidad de receptores MOR en membrana en el CPu 2 horas después del tratamiento. Sin embargo, el tratamiento agudo con el agonista dopaminérgico no modificó la afinidad de los receptores MOR en el CPu (**Fig. 85B y 86**). Los parámetros de unión obtenidos fueron $K_D=1.9$ nM y $B_{max}=221.28$ fmol/mg proteína para el grupo control y $K_D=1.6$ nM y $B_{max}=74.44$ fmol/mg proteína para el grupo de animales tratados con el agonista de los receptores D_4 . No se observaron diferencias $\frac{1}{2}$, 4 y 6 horas después del tratamiento para ninguno de los dos parámetros.

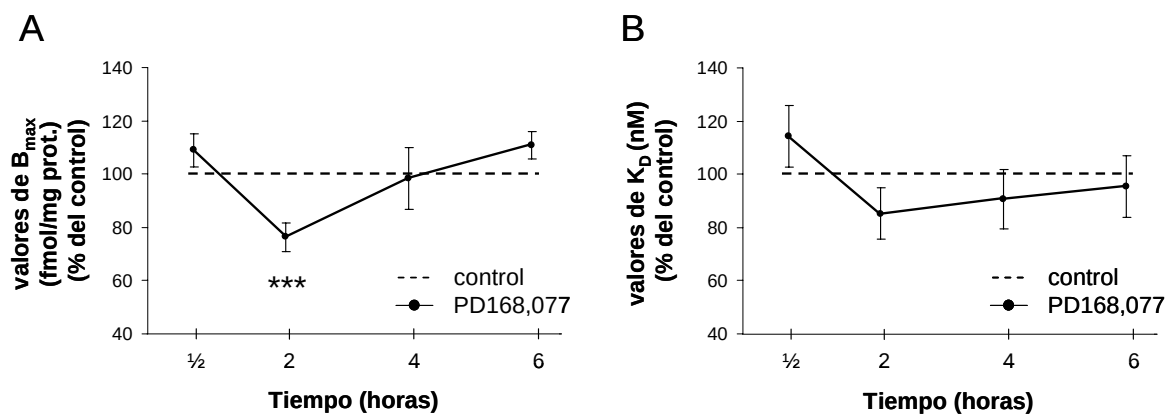


Figura 85. Densidad (B_{max}) (A) y afinidad (K_D) (B) de los receptores opioides tipo μ en el caudado después del tratamiento agudo con PD168,077 a lo largo del tiempo ($\frac{1}{2}$, 2, 4, 6 horas). Los valores representan porcentajes respecto al grupo control y se expresan como media $\pm$ EEM. ANOVA de dos vías (tiempo de supervivencia x tratamiento) seguida del test *post hoc* de Bonferroni; *** $p < 0.001$ vs. control.

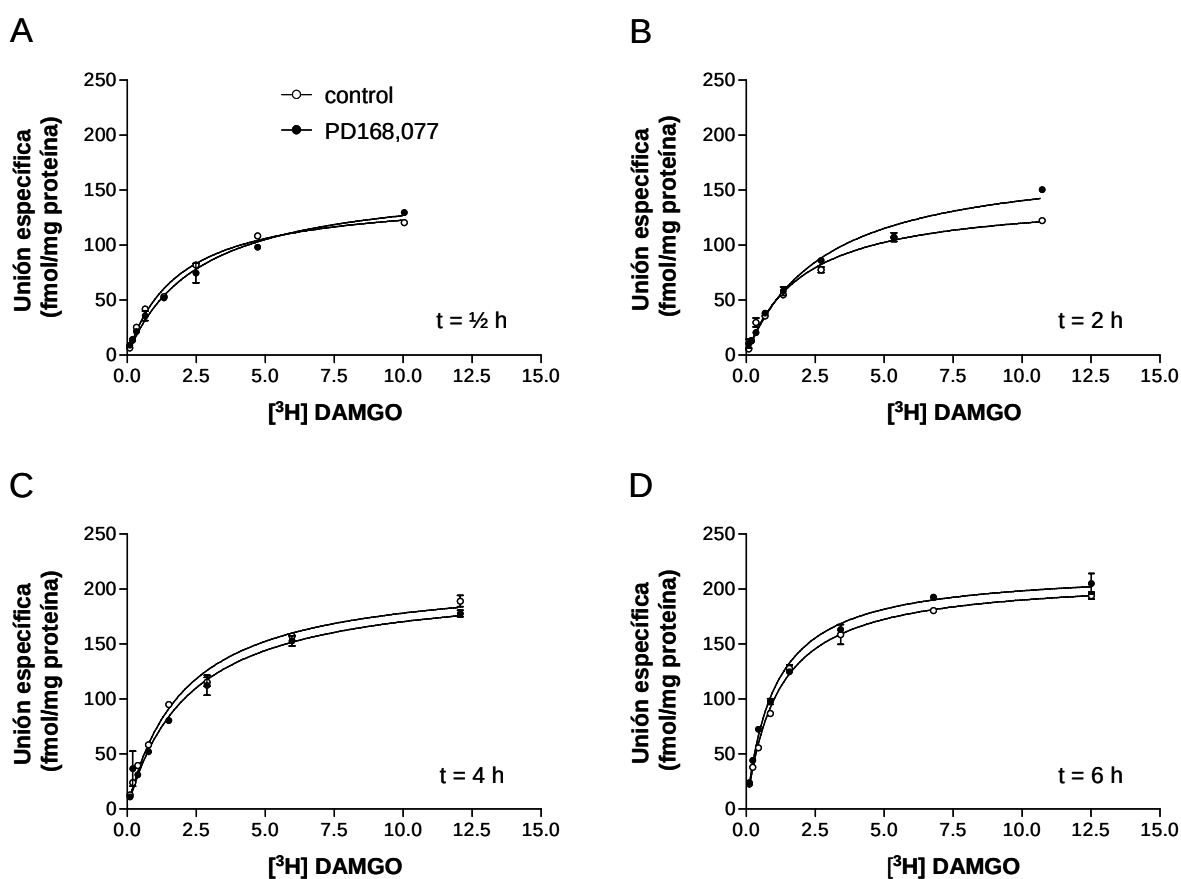


Figura 86. Curvas de saturación representativas de la unión específica de $[^3H]$ DAMGO en preparados de membranas del caudado putamen de rata tratadas de forma aguda con PD168,077 y sacrificadas $\frac{1}{2}$ (A), 2 (B), 4 (C) y 6 (D) horas después.

El análisis estadístico de los valores de $B_{\max}$ obtenidos mediante un ANOVA de dos vías indicó que los efectos observados estaban asociados de manera significativa al factor tiempo de supervivencia ($F=6.1$, $p<0.001$) y a su interacción con el tratamiento que recibieron los animales ($F=6.1$, $p<0.001$), pero no a este último factor independientemente ($F=0.1$, n.s.). El test *post hoc* de Bonferroni confirmó que la densidad de receptores MOR disminuyó de forma significativa ($p<0.001$) 2 horas después del tratamiento agudo con PD168,077 (1 mg/kg) (**Fig. 86A**). Respecto a los valores de afinidad (**Fig. 86B**), el análisis estadístico confirmó que no hubo cambios significativos asociados a los factores tratamiento administrado ($F=0.5$, n.s.) o tiempo de supervivencia ($F=1.8$, n.s.) ni a la interacción de ambos factores ($F=1.8$, n.s.).

Dado que la dosis de 1 mg/kg de PD168,077 modificó la densidad de los receptores MOR en el CPu 2 horas después de su administración, analizamos la

influencia de distintas dosis (0.5 y 3 mg/kg) del agonista de los receptores D_4 sobre los parámetros de unión bajo estudio.

Como muestran las **figuras 87A y 88**, sólo la activación aguda de los receptores D_4 con la dosis de 1mg/kg de PD168,077 redujo el valor de $B_{\max}$ para los receptores MOR respecto al grupo control a las 2 horas del tratamiento.

El análisis estadístico de los valores de $B_{\max}$ mediante un ANOVA de una vía no paramétrica ($H=16.4$; $p<0.001$) seguida del test *post hoc* de Dunn indicó que sólo la dosis de 1mg/kg del agonista de los receptores D_4 redujo de forma significativa ($p<0.05$) la densidad de los receptores MOR en membranas celulares del CPu respecto al grupo control (**Fig. 87A**).

Ninguna de las 3 dosis de PD168,077 modificó el valor de K_D de los receptores MOR (**Fig. 87B y 88**), lo cual fue confirmado por el análisis estadístico realizado mediante un ANOVA de una vía no paramétrica ($H=5.2$; n.s.).

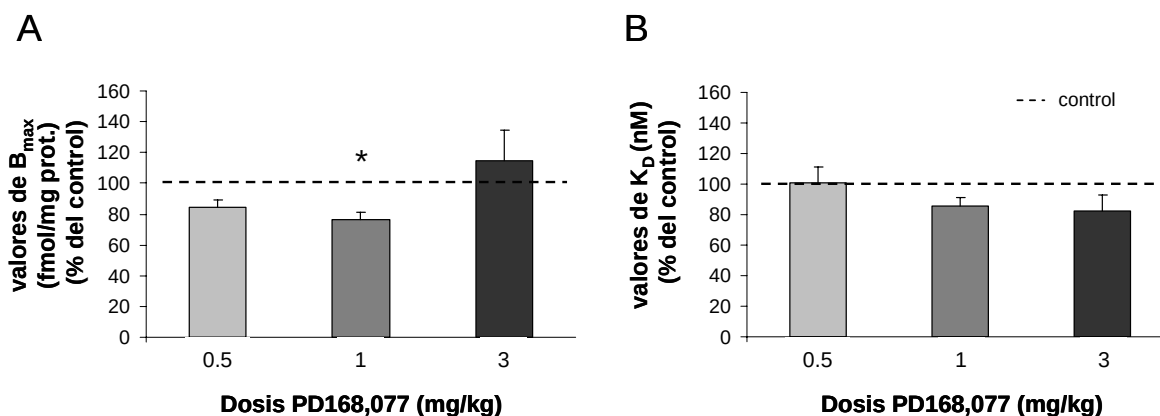


Figura 87. Densidad ($B_{\max}$) (A) y afinidad (K_D) (B) de los receptores MOR en el caudado putamen de rata 2 horas después del tratamiento agudo con distintas dosis de PD168,077 (0.5, 1, 3 mg/kg). Los valores representan porcentajes respecto al grupo control y se expresan como media $\pm$ EEM. ANOVA de una vía no paramétrica seguida del test *post hoc* de Dunn; * $p<0.05$ vs. control.

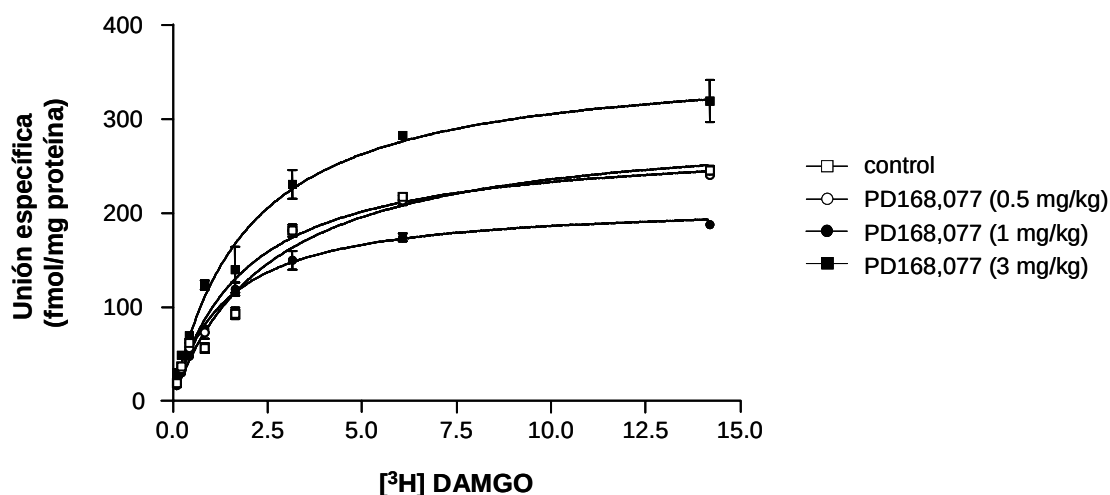


Figura 88. Curva de saturación representativa de la unión específica de [³H]DAMGO en preparados de membranas del caudado putamen de rata 2 horas después del tratamiento agudo con distintas dosis de PD168,077 (0.5, 1, 3 mg/kg).

4. Estudio de la Implicación de los Receptores Dopaminérgicos D₄ en la Hiperactividad Locomotora Inducida por Morfina

En este estudio se evaluó el efecto dependiente de dosis del agonista de los receptores D₄ PD168,077 (0.06, 0.2, 1 mg/kg) sobre la hiperlocomoción inducida de forma aguda por morfina en ratones.

Para ello, los ratones recibieron una única inyección de PD168,077 (0.06, 0.2, 1 mg/kg, según el grupo experimental) previa a la administración de morfina y fueron introducidos en el campo abierto para medir la actividad locomotora durante 30 minutos.

La administración aguda de morfina, pero no la de PD168,077, incrementa la actividad locomotora en ratón

Como muestra la **figura 89**, la administración aguda de morfina indujo un incremento (+257.6%) de la distancia total recorrida por los animales durante 30

minutos en el campo abierto respecto al grupo control (**Fig. 89**). Sin embargo, ninguna de las dosis del agonista dopaminérgico PD168,077 alteró la actividad locomotora de los animales.

El análisis estadístico de los datos mediante un ANOVA de una vía ($F=38.60$, $p<0.001$) seguido del test de comparación múltiple de Bonferroni confirmó que los cambios en la actividad locomotora (**Fig. 89**) mediados por el tratamiento agudo con morfina eran significativos ($p<0.001$).

El tratamiento agudo con PD168,077 modula el incremento de la actividad locomotora inducido por el tratamiento agudo con morfina

A continuación se analizó si existía un efecto dosis-dependiente de PD168,077 sobre el efecto en la actividad locomotora de los ratones tratados con morfina, analizando la distancia total recorrida por los animales a lo que se les administró ambos fármacos según los distintos grupo experimentales.

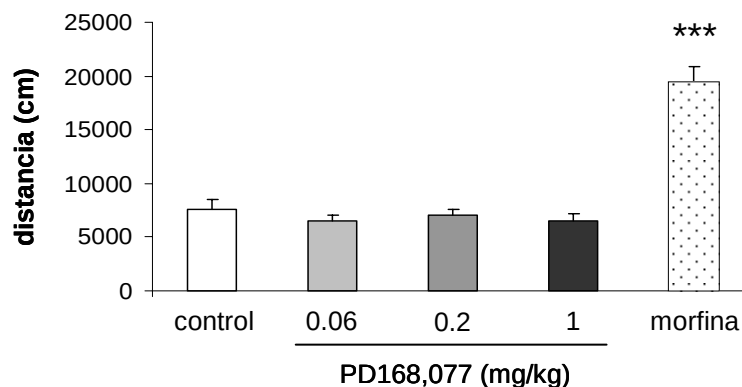


Figura 89. Actividad locomotora (distancia total recorrida (cm)) de ratones durante 30 minutos después del tratamiento agudo con PD168,077 (0.06, 0.2, 1 mg/kg) o morfina (10 mg/kg). ANOVA de una vía paramétrico seguida del test *post hoc* de Bonferroni; *** $p < 0.001$ vs. control, PD168,077 (0.06 mg/kg), PD168,077 (0.2 mg/kg), PD168,077 (0.1 mg/kg).

Como muestra la **figura 90**, sólo la dosis intermedia (0.2 mg/kg) del agonista de los receptores D_4 bloqueó la actividad locomotora inducida por morfina, puesto que la distancia total recorrida por estos animales era similar a la del grupo control y menor que la observada en los animales a los que sólo se les administró morfina. Las dosis de 0.06 y 1 mg/kg no tuvieron un efecto claro.

El ANOVA de una vía paramétrico ($F=8.657$, $p < 0.001$) seguido del test *post hoc* de Bonferroni confirmó que la actividad locomotora de los animales tratados con

PD168,077 0.2 mg/kg y morfina era similar a la del grupo control y menor significativamente que la de los animales tratados con morfina sola ($p < 0.05$) (**Fig. 90**). Los animales tratados con las dosis mayor y menor de PD168,077 junto con morfina mostraron una mayor locomoción que los animales del grupo control (PD168,077 0.06 mg/kg + morfina $p < 0.01$, PD168,077 1 mg/kg + morfina $p < 0.05$), pero no había diferencias significativas entre estos animales y los del grupo que fueron tratados sólo con morfina (**Fig. 90**).

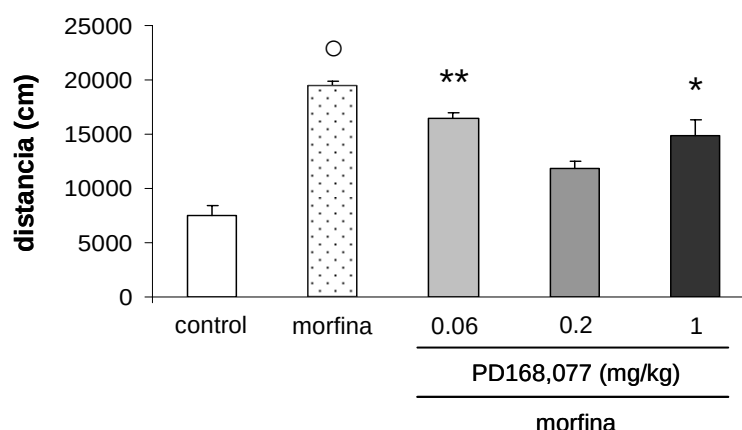


Figura 90. Actividad locomotora (distancia total recorrida (cm)) de ratones durante 30 minutos en el campo abierto tras la administración aguda con PD168,077 (0.06, 0.2, 1 mg/kg) y morfina (10 mg/kg). ANOVA de una vía paramétrico seguida del test *post hoc* de Bonferroni; ○ $p < 0.001$ vs. control, $p < 0.05$ vs. PD168,077 0.2 mg/kg; ** $p < 0.01$ vs. control; * $p < 0.05$ vs. control.

Para completar el estudio se analizó el efecto del agonista dopaminérgico sobre el incremento de la locomoción inducida por morfina durante tres intervalos de 10 minutos.

Como muestra la **figura 91**, en el primer intervalo no hubo diferencias entre los grupos. En el segundo intervalo de tiempo, se apreció que sólo la administración aguda de morfina indujo un incremento de la locomoción de los ratones, por lo que la activación de los receptores D_4 mediante PD168,077 bloquea la acción del agonista opioide en los animales tratados con ambos fármacos. Sin embargo en el intervalo desde el minuto 20 al 30, tanto los animales tratados con morfina como con PD168,077 (2 mg/kg) + morfina mostraron un incremento en su actividad locomotora respecto al grupo control. El ANOVA de dos vías seguido del test *post hoc* de Bonferroni

mostró que los efectos observados estaban asociados de forma significativa a los factores intervalo de tiempo ($F=22.1$, $p<0.001$) y tratamiento ($F=51.8$, $p<0.001$) y también a la interacción de ambos ($F=9.2$, $p<0.001$). Ningún tratamiento tuvo efectos significativos en los primeros 10 minutos del test. Sin embargo, en el intervalo de tiempo entre el minuto 11 y el 20, los animales tratados con morfina mostraron una mayor actividad locomotora respecto al grupo control ($p<0.001$), sin que el resto de tratamientos tuvieran efectos significativos. En el tercer intervalo, tanto la administración de morfina sola o junto con la dosis de 0.2 mg/kg de PD168,077 incrementaron la locomoción de los ratones de manera significativa respecto al grupo control ($p<0.001$ en ambos casos), aunque el efecto del tratamiento con morfina sola fue mayor ($p<0.001$).

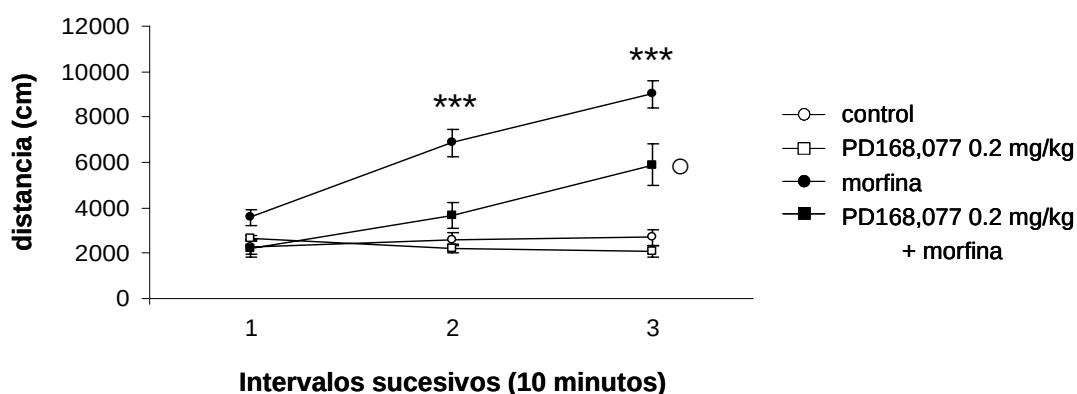


Figura 91. Actividad locomotora (distancia recorrida) de ratones durante 30 minutos en el campo abierto tras la administración aguda con PD168,077 (0.2 mg/kg) y morfina (10 mg/kg). ANOVA de una vía paramétrico seguida del test *post hoc* de Bonferroni; *** $p<0.001$ vs. control, PD168,077 0.2 mg/kg, PD168,077 0.2 mg/kg + morfina; ○ $p<0.001$ vs. control, PD168,077 0.2 mg/kg, morfina.

Discusión

1. Consideraciones Metodológicas

Fármacos

El estudio funcional de los diferentes subtipos de receptores dopaminérgicos ha estado condicionado por el reducido número de sustancias específicas que existen para cada uno de ellos. En la última década se han desarrollado diversos ligandos agonistas y antagonistas específicos para los receptores D₄ (Glase *et al.*, 1997; Kulagowski *et al.*, 1996), cuyas características farmacológicas, así como su posible aplicación en estudios de detección de receptores mediante técnicas autoradiográficas (Huang *et al.*, 2001; Kula *et al.*, 1999) y en estudios de comportamiento (Bernaerts y Tirelli, 2003; Bristow *et al.*, 1997; Cavas y Navarro, 2006; Clifford y Waddington, 2000; Nayak y Cassaday, 2003; Zhang *et al.*, 2001, 2002a,b), están siendo valoradas.

Debido a la escasa disponibilidad comercial de estos ligandos, y en función de sus características farmacológicas, se seleccionó el agonista PD168,077 *maleate* (PD168,077) y el antagonista L745,870 *trihydrochloride* (L745,870) para llevar a cabo los experimentos recogidos en la presente tesis doctoral.

El agonista PD168,077 es específico para los receptores D₄, con una selectividad por este subtipo de receptor 300 veces mayor que para los receptores D₂ y D₃ (Glase *et al.*, 1997). Las dosis empleadas en rata (1 mg/kg) y ratones (0.06, 0.2 y 1 mg/kg) se determinaron a partir de la bibliografía existente (Gago *et al.*, 2007; Nayak y Cassaday, 2003).

El antagonista L745,870 tiene una afinidad por los receptores D₄ significativamente más alta que por los receptores D₂ y D₃, así como por los receptores 5-HT₂, D₁ y D₅ (1000 veces mayor) (Kulagowski *et al.*, 1996). Estudios realizados en otros laboratorios (Glase *et al.*, 1997; Hernandez *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2003) y por nuestro grupo (Gago *et al.*, 2007) han demostrado que este antagonista

es capaz de revertir los efectos producidos por la administración de PD168,077, lo que indica que ambas sustancias son selectivas para el mismo subtipo de receptor dopaminérgico. La dosis empleada en este trabajo se determinó mediante la bibliografía existente (Bristow *et al.*, 1997; Gago *et al.*, 2007; Patel *et al.*, 1997).

La morfina se considera un agonista general de los receptores opioides, pero Raynor y colaboradores (1994) demostraron que presenta mayor afinidad por los receptores MOR que por los receptores KOR y DOR. Además, numerosos estudios indican que los receptores MOR son los que median los efectos analgésicos y de refuerzo de esta sustancia opiácea (Becker *et al.*, 2000; Matthes *et al.*, 1996; Ribeiro *et al.*, 2005; Sora *et al.*, 1997; Uhl *et al.*, 1999).

Modelo animal de experimentación

Para inducir la expresión de c-Fos en el CPU de manera aguda con morfina, se eligió el modelo experimental utilizado por Liu y colaboradores (1994). Estos autores observaron que la inducción de c-Fos por morfina en el estriado se producía a las 2 horas y que el efecto era mayor administrando cuatro dosis de 10 mg/kg (i.p.) de esta sustancia, una cada 30 minutos, que inyectando una única dosis equivalente (40 mg/kg). Este fenómeno puede estar relacionado con el hecho de que la vida media de la morfina en el cerebro es de 30-40 minutos (Bhargava *et al.*, 1992). Para analizar la expresión de los factores de transcripción Fos B-ΔFos B y p-CREB y de los péptidos opioides dinorfina y encefalina se usó el mismo modelo experimental. Los animales de los grupos experimentales tratados sólo con el agonista dopaminérgico recibieron una inyección de PD168,077 30 minutos antes de las cuatro inyecciones del vehículo de morfina, de manera que estos animales fueron sacrificados 1, 2½, 4½ y 6½ horas después de la administración del agonista dopaminérgico. A la hora de comparar los efectos de los distintos tratamientos y

expresar los resultados, se asumió que fueron sacrificados a las ½, 2, 4 ó 6 horas, como los animales que recibieron únicamente morfina.

Anticuerpos

Para el estudio de la expresión de los factores de transcripción c-Fos, Fos B-ΔFos B y p-CREB, se utilizaron anticuerpos cuya especificidad y distribución de marcaje está ampliamente descrita en la bibliografía, como se ha detallado en el apartado de Material y Métodos. Cabe destacar que Grande y colaboradores (2004) han demostrado que el anticuerpo anti-Fos B de la casa comercial *Santa Cruz Biotechnology* (sc-7203) detecta tanto la proteína Fos B como su isoforma ΔFos B. Actualmente, no hay disponibilidad de anticuerpos que reconozcan a cada una de estas proteínas de forma selectiva.

Cuantificación y análisis de imagen

El tratamiento con morfina indujo la expresión de c-Fos principalmente en la región DM del CPu. Por tanto, para poder comparar los efectos de los distintos fármacos limitamos la cuantificación y el análisis estadístico del número de núcleos IR para c-Fos a esta región. Fos B-ΔFos B y p-CREB presentan una distribución mayor y más homogénea en el CPu. La administración de morfina y de PD168,077 no modificó este patrón de distribución, por lo que el número total de núcleos IR de ambos factores fue el resultado de la suma de las muestras tomadas en las regiones medial y lateral del CPu.

Tanto los receptores MOR como los D₄ presentan un gradiente de expresión a lo largo del eje rostro-caudal del CPu (Arvidsson *et al.*, 1995; Rivera *et al.*, 2002a; Svingos *et al.*, 1996), lo que justifica el análisis de la expresión de los factores de transcripción en los niveles rostrales, medios y caudales del núcleo.

Estudios de unión a ligandos

Los estudios de unión a ligando se han realizado en condiciones de saturación para el ligando [³H]DAMGO, agonista selectivo de los receptores MOR, lo que ha permitido conocer los valores de afinidad (K_D) y densidad (B_{max}) de estos receptores opioides en el CPu. Para conocer si la activación de los receptores D₄ modifica estas características farmacológicas, la experimentación se llevó a cabo en condiciones *in vivo*, administrando PD168,077 a los animales antes de ser sacrificados. Al realizar los experimentos en condiciones *in vitro*, añadiendo el fármaco a los preparados de membranas celulares, no se observaron los cambios descritos para los experimentos *in vivo* (datos no mostrados). Este hecho indicó que la integridad de la célula es esencial para que se produzca la interacción D₄-MOR, ya que puede ocurrir a nivel intracelular influyendo en los mecanismos de transducción de señal, aunque no se puede descartar que se produzca también a nivel de membrana mediante la formación de un heterodímero (Fuxe *et al.*, 2007).

Estudios de comportamiento

El estudio del papel de los receptores D₄ en la inducción de la hiperlocomoción por morfina se realizó en ratones de la cepa C57BL/6J. La elección de este animal vino determinada por el hecho de que la administración aguda de morfina provoca una respuesta locomotora diferente en ratas que en ratones. En las ratas, la morfina provoca una respuesta bifásica, consistente en una primera fase inhibitoria, que refleja los efectos sedativos de la morfina, seguida (60 minutos tras la inyección) de una fase de hiperactividad en la que la actividad locomotora se incrementa gradualmente (Vanderschuren *et al.*, 1997; Walter y Kuschinsky, 1989). En ratones, sin embargo, aunque la magnitud del efecto

depende de la cepa, la morfina sólo provoca un incremento en la locomoción (Belknap *et al.*, 1989, 1998; Brase *et al.*, 1977; Cadoni *et al.*, 2000; Coudereau *et al.*, 1996; Kuribara, 1995; Murphy *et al.*, 2001; Oliverio y Castellano 1981), lo que facilita el estudio de los efectos sobre la actividad locomotora de distintos fármacos. Los experimentos presentados en este trabajo constituyen una primera aproximación que tendrán que completarse en el futuro utilizando ratas como animales de experimentación.

2. Implicación del Caudado Putamen en el Proceso de Drogadicción

El CPu tiene un papel fundamental en el control de las funciones motoras, así como en la integración de la información motora con la sensorial (Graybiel, 1998; Graybiel *et al.*, 2000; Hikosaka *et al.*, 1999).

Como se ha mencionado anteriormente, el CPu se encuentra compartimentalizado en dos regiones, los estriosomes y la matriz, que difieren en sus conexiones aferentes y eferentes (Gerfen, 1984, 1992; Graybiel y Ragsdale, 1978). En virtud de estas conexiones, los estriosomes están relacionados con el control de las emociones, los refuerzos y los procesos cognitivos (Courtney *et al.*, 1998; Eblen y Graybiel, 1995; Kunishio y Haber, 1994; White e Hiroi, 1998), mientras que la matriz está implicada en el procesamiento de la información sensorial y motora (Kunishio y Haber, 1994; White e Hiroi, 1998).

Los trabajos realizados para determinar la base anatómica del proceso de drogadicción han estado centrados durante muchos años en el Acb y la vía mesolímbica, que son los responsables de la aparición de comportamientos asociados a las propiedades de refuerzo de diversas drogas, entre las que se encuentran las sustancias derivadas del opio (Wise, 2002).

Sin embargo, se ha demostrado que el CPu y la vía nigroestriatal participan en la aparición de estereotipias (Morelli *et al.*, 1989) y en la generación de respuestas y la consolidación de hábitos asociados al

consumo de drogas (Graybiel, 1995, 1998; White, 1997; White, 1989). Recientemente, se ha sugerido que la vía dopaminérgica nigroestriatal funciona como una espiral que facilita la transferencia de información desde el Acb hacia el CPu (Haber *et al.*, 2000), de manera que se produce una transferencia del control sobre las acciones que inicialmente estaban bajo control del Acb y la vía dopaminérgica mesolímbica hacia la región más dorso-lateral del CPu.

El desarrollo y expresión de alteraciones locomotoras y estereotipias tras la exposición crónica a sustancias psicoestimulantes como la cocaína y las anfetaminas, se ha asociado a cambios en el patrón de expresión de genes de expresión temprana en los compartimentos de la región lateral del CPu (Canales y Graybiel, 2000; Capper-Loup *et al.*, 2002), pero no en el Acb (Vanderschuren *et al.*, 2002). La administración de estas drogas incrementa la expresión de genes de las familias Fos/Jun en las neuronas localizadas en los estriosomes y la reduce en las neuronas de la matriz, provocando la inhibición de éstas (Canales y Graybiel, 2000; Capper-Loup *et al.*, 2002).

El aprendizaje gradual de ciertos hábitos constituye un punto importante en el desarrollo del proceso de drogadicción, ya que los individuos desarrollan secuencias de comportamiento o conductas tras la aparición de uno o varios estímulos apropiados (Zola-Morgan y Squire, 1993). Ciertas pautas comportamentales que se aprenden, desarrollan y afianzan durante la drogadicción, como son acciones llevadas a cabo de forma compulsiva o la consolidación de la búsqueda de la droga, se explican con mayor consistencia involucrando al CPu y los circuitos en los que participa y no sólo por la acción del Acb. Las evidencias obtenidas en estudios de conexiones, ensayos de comportamiento y análisis de la expresión de genes tras la administración de una droga sugieren que los estriosomes podrían tener un papel crítico en los procesos de aprendizaje y de adquisición de hábitos durante la

drogadicción (Canales, 2005; White e Hiroi, 1998). White e Hiroi (1998) comprobaron que animales a los que implantaron electrodos de autoestimulación en el compartimento estriosomal del CPu mostraron una mayor respuesta y una mayor velocidad de aprendizaje de comportamientos que los animales en los que los electrodos estaban implantados en la matriz. Los estudios de Brown y colaboradores (2002) sobre la actividad metabólica de los dos compartimentos usando [^{14}C]deoxiglucosa mostraron que durante la ejecución de acciones neutras, en los que no se ven implicados estímulos con propiedades de refuerzo, se produce un balance de la actividad a favor de la matriz, sugiriendo que en el caso de la ejecución de comportamientos asociados a la presencia de refuerzos o a acciones dirigidas hacia una meta los estriosomas tendrían una mayor actividad.

El receptor MOR, que juega un papel fundamental en la mediación de los efectos de la morfina (Matthes *et al.*, 1996; Sora *et al.*, 1997), se expresa en el CPu en dendritas de neuronas estriatopalidales y estriatonigrales localizadas en los estriosomas (Guttenberg *et al.*, 1996; Mansour *et al.*, 1995; Moriwaki *et al.*, 1996), por lo que este compartimento podría mediar la aparición de algunos de los efectos de las sustancias opiáceas.

Los receptores dopaminérgicos D_4 también se expresan en los dos tipos de neuronas de proyección del estriado (Rivera *et al.*, 2003). Las funciones de este receptor no están bien definidas en la actualidad, pero existen trabajos que indican que estos receptores juegan un papel importante en la esquizofrenia (Wong y Van Tol, 2003; Wong *et al.*, 2003), el trastorno por déficit de atención e hiperactividad (ADHD, *Attention-deficit hyperactivity disorder*) (Carrasco *et al.*, 2006; Faraone *et al.*, 2000, 2001; Grady *et al.*, 2003; LaHoste *et al.*, 1996; Swanson *et al.*, 1998), comportamientos relacionados con la búsqueda de novedad (Dulawa *et al.*, 1999; Ebstein *et al.*, 1996; Powell *et al.*, 2003) y en procesos cognitivos (Browman *et*

al., 2005; Zhang *et al.*, 2004). Su localización en neuronas del compartimento estriosomal (Rivera *et al.*, 2002a) sugiere que este receptor dopaminérgico puede jugar un papel importante en el componente límbico del estriado.

3. Interacción de los Receptores Opioides tipo μ y los Receptores Dopaminérgicos D_4 en el Caudado Putamen

Aunque la colocalización regional de los receptores D_4 y MOR en los estriosomas está demostrada (Rivera *et al.*, 2002a), la colocalización celular es sólo una posibilidad puesto que no existen evidencias directas de que ambos receptores se expresen en las mismas neuronas estriatonigrales y estriatopalidales del CPu (Arvidsson *et al.*, 1995; Guttenberg *et al.*, 1996; Mansour *et al.*, 1995; Moriwaki *et al.*, 1996; Rivera *et al.*, 2002a, 2003).

La colocalización regional sugiere que ambos tipos de receptores podrían interactuar, ya sea físicamente a nivel de membrana si se encuentran en la misma célula (Bouvier, 2001; Fuxe *et al.*, 2007; Milligan, 2004), o regulando la expresión de genes a través de alteraciones de los niveles de expresión de factores de transcripción (Fuxe *et al.*, 2007).

Los resultados presentados en este trabajo demuestran por primera vez que existe una interacción entre los receptores D_4 y MOR en el CPu:

a) a nivel de membrana celular, ya que la activación de los receptores dopaminérgicos D_4 reduce la densidad de receptores MOR en membranas celulares en el CPu.

b) a nivel de expresión de los factores de transcripción c-Fos, Fos B- Δ Fos B y p-CREB, pues la activación de los receptores D_4 regula los cambios que la morfina produce en el patrón de expresión de estos factores de transcripción en el CPu.

c) a nivel de expresión de los neuropéptidos endógenos encefalina y dinorfina. La activación de los receptores D_4 bloquea el efecto que la morfina tiene sobre

los niveles de ARNm para cada uno de estos péptidos en el CPU.

d) a nivel comportamental, puesto que la activación de los receptores D_4 previene el incremento de la actividad locomotora inducido por morfina.

Los experimentos de unión a ligando permiten obtener evidencias de la interacción entre receptores a nivel de membrana, que implica cambios en sus características farmacológicas asociadas al reconocimiento de ligandos (K_D y B_{max}). En este trabajo hemos descrito una disminución de la densidad de receptores MOR en membranas celulares de CPU de rata 2 horas después del tratamiento con PD168,077, sin que se modifique la afinidad. Como ya se mencionó anteriormente, estos cambios en el número de sitios de unión se obtuvieron en condiciones *in vivo* y no *in vitro*, lo que sugiere la implicación de mecanismos intracelulares, aunque no se puede descartar la interacción física entre los receptores D_4 y MOR.

Son varios los procesos, sin ser excluyentes entre ellos, que pueden ocurrir en las neuronas estriatales que explicarían la disminución de la expresión de receptores MOR en membranas celulares:

a) La interacción física entre los receptores podría inducir la internalización de los receptores MOR tras la activación de los receptores D_4 .

El concepto de interacción receptor-receptor en la membrana plasmática de neuronas fue introducido por Luigi Agnati y Kjell Fuxe hace más de dos décadas (Agnati *et al.*, 1980; Fuxe *et al.*, 1981). Desde entonces se han descrito numerosos ejemplos que demuestran la existencia de cooperación, tanto positiva como negativa, entre receptores y la formación de dímeros compuestos por un mismo tipo de receptor o varios de sus subtipos o de heterodímeros constituidos por receptores que pertenecen a distintas familias (Angers *et al.*, 2002; Franco *et al.*, 2000; Fuxe *et al.*, 2007; Marshall *et al.*, 1999; Milligan, 2004).

Los receptores D_4 y MOR podrían encontrarse en la misma célula e interactuar entre sí. La activación de los receptores D_4 por dopamina induce su internalización (Cho *et al.*, 2006). Esta activación podría además provocar de forma paralela la desensibilización de los receptores MOR mediante una fosforilación por kinasas seguida de la internalización (desensibilización heteróloga) (El Kouhen *et al.*, 2001).

Nuestros resultados muestran un descenso de la densidad de receptores MOR en membranas celulares 2 horas después de la activación de los receptores D_4 por PD168,077. En un trabajo previo (Gago *et al.*, 2007) mostramos, mediante técnicas inmunohistoquímicas, que la administración de PD168,077 redujo los niveles de expresión de los receptores MOR en los estriosomes del CPU a los 30 minutos. Tomando estos datos en conjunto, podríamos sugerir que como consecuencia de la activación de los receptores D_4 , los receptores MOR son internalizados y degradados rápidamente (ya que mediante las técnicas inmunohistoquímicas se detectan tanto los receptores activos en membrana como los inactivos en el citosol) reduciéndose la reserva intracelular, por lo que los receptores desensibilizados no pueden ser reemplazados y disminuye la densidad en membrana. La ausencia de efectos sobre el número de sitios de unión 4 y 6 horas después de la activación de los receptores D_4 podría indicar que receptores MOR de nueva síntesis se han incorporado a las membranas citoplasmáticas.

Se ha descrito que en el proceso de desensibilización de los receptores dopaminérgicos D_1 , D_2 , D_3 y D_4 están involucradas, en mayor o menos medida, las proteínas GRK y β -arrestinas (Cho *et al.*, 2006; Ito *et al.*, 1999; Itokawa *et al.*, 1996; Iwata *et al.*, 1999; Jiang y Sibley, 1999; Kabani *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2001), siendo los receptores D_3 y D_4 los más dependientes de los niveles celulares de las

GRKs (Cho *et al.*, 2006). La internalización de los receptores MOR también está regulada por éstas proteínas (Beaulieu, 2005; Oakley *et al.*, 2000; Raehal y Bohn, 2005; Zhang *et al.*, 1998). Así, estudios realizados en animales deficientes para β -arrestina 2 (Bohn *et al.*, 1999, 2000) y en líneas celulares estriatales que expresan altos niveles de GRK2 (Habershtock-Debic *et al.*, 2005) confirman la importancia de ambas proteínas en el proceso de internalización de los receptores MOR. Por tanto, como en el proceso de desensibilización de ambos tipos de receptores están involucrados los mismos tipos de proteínas, la activación de los receptores D₄ podría mediar cambios en los niveles de expresión de las GRKs y β -arrestinas promoviendo la internalización de los receptores opioides.

Los mecanismos que regulan la internalización de los receptores acoplados a proteína G no están definidos totalmente debido a su complejidad. Las diferencias entre receptores podrían residir en la combinación específica de las proteínas del complejo de internalización para cada uno de ellos. La identificación de estas proteínas y la manera de combinarse ayudaría a determinar el origen de diferencias funcionales entre receptores de una misma familia. Algunas de las proteínas que podrían ser estudiadas son GAIP (*G α interacting protein*,) y GIPC (*GAIP interacting protein C terminus*) (De Vries *et al.*, 1995, 1996, 1998). GIPC interacciona específicamente con GAIP, un regulador de la proteína G que sirve como activador de GTPasa de las subunidades α i y α q de las proteínas G, que se localiza en las vesículas recubiertas de clatrina (De Vries *et al.*, 1995, 1996, 1998), por lo que ambas están implicadas en la regulación de la señal intracelular de los receptores y de los mecanismos de internalización por endocitosis (Ogier-Denis *et al.*, 1997). Experimentos de Jeanneteau y colaboradores (2004) han mostrado que los receptores D₂ y D₃, pero no los receptores D₄, interaccionan con la proteína GIPC, lo que sugiere un mecanismo de regulación

diferencial entre estos receptores. Además, Garzon y colaboradores (2004) han descrito recientemente que los receptores MOR también están regulados por GAIP y GIPC. Por tanto, sería interesante estudiar con mayor detalle cambios en la expresión de estas proteínas provocadas por PD168,077.

Como mencionamos anteriormente, la tolerancia aguda es un proceso que involucra cambios a nivel de receptores y de segundos mensajeros y que es consecuencia de la desensibilización de los receptores (Bilecki *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2003; Horner y Zadina, 2004; Narita *et al.*, 1995, 2006). Se ha sugerido que el reciclaje lento de los receptores MOR tras su activación por morfina podría contribuir al desarrollo de la tolerancia y de la adicción a éste fármaco opioide (Borgland *et al.*, 2003; Keith *et al.*, 1996, 1998; Koch *et al.*, 2001, 2005). El hecho de que la activación de los receptores D₄ pueda modificar los niveles de receptores MOR en membrana, podría indicar que estos receptores dopaminérgicos están implicados en el proceso de tolerancia a la administración de morfina y que podrían jugar un papel importante en la regulación del proceso de adicción a opiáceos.

b) La regulación de la expresión de los receptores MOR estaría mediada por los receptores D₄.

La activación de los receptores D₄ podría generar cambios en la regulación de la transcripción y traducción del receptor MOR de manera que su expresión se vea inhibida. El gen del receptor MOR está regulado por dos promotores en roedores (Ko *et al.*, 1997; Liang *et al.*, 1995; Liang y Carr, 1997; Min *et al.*, 1994), por lo que la regulación de su expresión es compleja. Se ha descrito que la administración crónica de cocaína y haloperidol regula los niveles de expresión del ARNm para MOR en el Acb y en GP, lo que sugiere que la dopamina está implicada en la regulación de su expresión (Azaryan *et al.*, 1998; Delfs *et al.*, 1994). Resultados previos de nuestro laboratorio (Gago *et al.*, 2007) muestran que la administración de PD168,077 también

reduce la expresión de los receptores MOR en los estriosomes a las 6 horas. Este efecto es específico de los receptores D_4 ya que es bloqueado por el antagonista L745,870. Además, los receptores D_4 serían el único subtipo de la familia D2 implicada en la regulación de la expresión de MOR, puesto que la administración de quinpirol (agonista D_2/D_3) o raclopride (antagonista D_2/D_3) no modifica la expresión de estos receptores opioide (Gago *et al.*, 2007) quizás debido a la baja expresión de los receptores D_2 y D_3 en los estriosomes (Fuxe *et al.*, 2006; Levesque *et al.*, 1992).

Sin embargo, los resultados de los experimentos de unión a ligandos indican que la densidad de receptores MOR en membranas celulares en el CPu no se ve alterada a las 6 horas de la activación de los receptores D_4 . Puede que la transcripción y la traducción del receptor MOR estén bloqueadas, pero que los receptores que se encontraban en membrana no se ven afectados por esta regulación.

c) La internalización de MOR puede estar inducida por la unión de péptidos opioides endógenos.

Se ha descrito que la dopamina regula la expresión de los neuropéptidos en el CPu de manera opuesta en los dos subtipos de neuronas de proyección en consonancia con la distribución diferencial de los receptores dopaminérgicos D_1 y D_2 (Angulo y McEwen, 1994; Gerfen, 1992; Gerfen y Wilson, 1996). En este trabajo hemos observado que la activación de los receptores D_4 provoca un incremento de la expresión de encefalina en el CPu a las 2 horas, que al unirse a los receptores MOR provocarían su internalización y degradación.

El principal ligando de los receptores MOR es la β -endorfina, pero también posee alta afinidad por las encefalinas (Gerrits *et al.*, 2003; Monory *et al.*, 2000; Raynor *et al.*, 1994). Wang y colaboradores (1997) han sugerido que la encefalina sería el principal ligando de estos receptores opioides en el CPu, puesto que las dendritas de neuronas de proyección estriatales que expresan

MOR reciben conexiones de terminales que contienen encefalina (Wang *et al.*, 1996). Esta idea se ve reforzada por los estudios de Kowalski y colaboradores (1992) que indican que los niveles de encefalina son aproximadamente 10 veces más altos que los de β -endorfina en el CPu.

Las neuronas de proyección estriatopalidales pueden liberar encefalina por sus axones colaterales en el CPu (Park *et al.*, 1980; Wilson y Groves, 1980), que se uniría a los receptores MOR. La encefalina y su derivado DAMGO inducen una rápida y robusta internalización de estos receptores a diferencia de la morfina (Arden *et al.*, 1995; Keith *et al.*, 1998). Por tanto, el incremento de la expresión de encefalina tras la activación de los receptores D_4 podría provocar la activación e internalización de los receptores MOR, efecto que se ve reflejado en la disminución de la B_{max} a las 2 horas.

El hecho de que los receptores MOR se expresen principalmente en dendritas y espinas dendríticas (Arvidsson *et al.*, 1995; Moriwaki *et al.*, 1996) y los receptores D_4 en somas, dendritas y espinas dendríticas (Rivera *et al.*, 2003) sugiere una compartimentalización en la regulación de las funciones celulares mediante estos receptores que podría explicar la interacción entre ambos a varios niveles: a nivel de membrana, como indican los resultados obtenidos mediante experimentos de unión a ligando y los obtenidos previamente mediante inmunohistoquímica (Gago *et al.*, 2007), y a nivel de mecanismos intracelulares de señalización mediante la regulación de la expresión de MOR vía factores de transcripción o péptidos endógenos como muestran los resultados recogidos en este trabajo.

3.1. Efectos de la activación de los receptores opioides tipo μ

Se han identificado diversos factores de transcripción que ejercen un papel importante en el desarrollo de la sintomatología a corto y largo plazo de la

drogadicción y cuya expresión se ve modificada en el CPu y Acb (Nestler, 2004a,b). Entre ellos destacan c-Fos, Fos B, Δ Fos B y CREB (Guitart *et al.*, 1992; Gutstein *et al.*, 1998; Liu *et al.*, 1994; Nye *et al.*, 1995; Nye y Nestler, 1996; Widnell *et al.*, 1996).

El factor de transcripción c-Fos es el más estudiado puesto que está asociado a procesos generales de activación neuronal (Dragunow y Faull, 1989; Morgan y Curran, 1991; Sagar *et al.*, 1988) y a la regulación y aparición de multitud de fenómenos como el estrés (Watanabe *et al.*, 1994; Umemoto *et al.*, 1994), el movimiento (Szucs *et al.*, 2005), el desarrollo del cáncer (Milde-Langosch, 2005), el proceso de drogadicción (Georges *et al.*, 2000), entre otras.

Hasta la fecha, los mecanismos celulares y moleculares que se desencadenan tras la administración aguda de morfina han sido poco estudiados. Nuestros resultados muestran que el tratamiento agudo con morfina incrementa de forma rápida y transitoria la expresión de c-Fos en el CPu de ratas, encontrándose el máximo 2 horas después de su administración (**Fig. 92**) y principalmente en la región dorsomedial. Estos resultados coinciden con los trabajos publicados anteriormente por otros grupos de investigación (Chang *et al.*, 1988; Curran *et al.*, 1996; Garcia *et al.*, 1995; Gutstein *et al.*, 1998; Liu *et al.*, 1994; Sharp *et al.*, 1995). Por el contrario, no se observaron cambios en los niveles de ARNm para el gen c-fos en ninguno de los tiempos analizados ($\frac{1}{2}$, 2 y 4 horas). Otros autores (Ferguson *et al.*, 2004; Gutstein *et al.*, 1998) sin embargo, describen un incremento en la expresión del ARNm para este factor de transcripción 1 hora después de la administración de una única inyección de morfina. Sería necesario

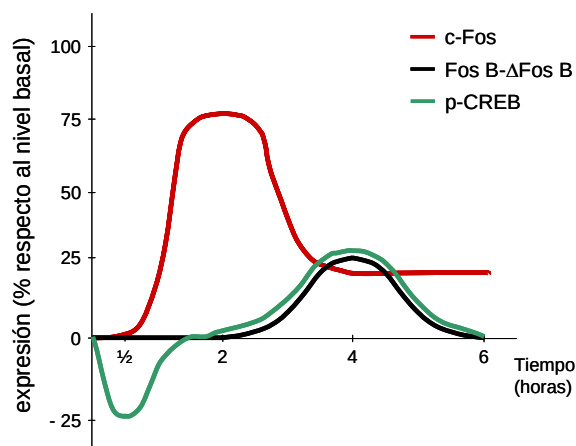


Figura 92. Diagrama temporal de la expresión de los distintos factores de transcripción en el caudado putamen tras la activación aguda de los receptores opioides tipo μ .

realizar más experimentos para verificar que 1 hora después del tratamiento con morfina, y siguiendo el modelo de administración presentado en este trabajo, aumenta los niveles de ARNm para c-fos.

En el promotor de c-fos existen dos regiones AP-1 (Cochran, 1993). El factor c-Fos puede formar complejos AP-1 junto con otras proteínas de las familias Fos/Jun, por lo que puede autorregular su propia expresión (**Fig. 93**). Se ha descrito que la administración aguda de morfina incrementa la unión de factores de transcripción a la secuencia AP-1 en el CPu y Acb (Liu *et al.*, 1994), y además incrementa la transcripción dependiente de AP-1 (Bilecki *et al.*, 2004) por lo que la magnitud de la inducción observada podría deberse a una regulación positiva de su propia expresión. Sería necesario realizar experimentos complementarios para analizar la expresión de elementos de la familia Jun con la que forman los complejos AP-1 heterodiméricos y estudiar su papel en la inducción de c-Fos por morfina.

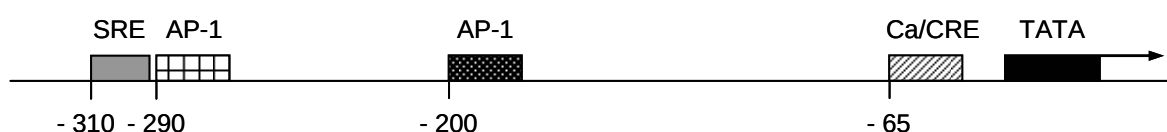


Figura 93. Elementos reguladores en el promotor del gen c-fos (Modificado de Cochran, 1993).

Aunque se han realizado numerosos estudios sobre el efecto de la morfina sobre la expresión de c-Fos, es poco conocida su influencia sobre la expresión de Fos B y sus isoformas. Nuestros resultados muestran un incremento de la expresión de Fos B y Δ Fos B en el CPu 4 horas después de la administración de morfina (**Fig. 92**). Sin embargo, Muller y Unterwald (2005) han mostrado que una única inyección de morfina (50 mg/kg; s.c.) no modifica la expresión de Fos B y Δ Fos B en el CPu de rata. La diferencia en los resultados podría deberse a las diferencias en la metodología empleada en la administración de morfina.

Debido a que la inducción de Fos B y Δ Fos B por morfina es posterior en el tiempo a la de c-Fos (**Fig. 92**), habría que estudiar si éste factor de transcripción está involucrado en la regulación de la expresión de Fos B y su isoforma.

Tanto el gen c-fos (Kovacs, 1998; Sheng *et al.*, 1990) como el gen fos B (Levine *et al.*, 2005) están regulados por CREB, por lo que las variaciones en su actividad provocarían cambios en la regulación de la expresión de ambos genes.

Nuestros estudios muestran que la activación de los receptores MOR tuvo un efecto doble y opuesto sobre los niveles de expresión de la proteína CREB fosforilada en el residuo Serina-133 (Ser-133) en el

CPu, ya que provoca su disminución a los 30 minutos y la aumenta a las 4 horas (**Fig. 92**). Debido a que el anticuerpo utilizado en este estudio reconoce específicamente a esta forma fosforilada de CREB, las variaciones observadas en su expresión pueden deberse a cambios en el mecanismo de fosforilación, aunque no hay que descartar variaciones en los niveles totales de la proteína.

Guitart y colaboradores (1992) han demostrado que la morfina provoca un descenso de p-CREB a los 30 minutos en el LC, que coincide con las observaciones de este trabajo, sugiriendo que este descenso se produce por una disminución de la fosforilación. La morfina podría modificar la fosforilación de CREB en Ser-133 por varios mecanismos:

a) se ha descrito que la activación aguda de los receptores MOR por morfina disminuye los niveles de PKA (Guitart y Nestler, 1989; Nestler, 1992), lo que podría provocar una disminución de la fosforilación de CREB (**Fig. 94**).

b) En el CPu y Acb, las neuronas donde se localizan los receptores MOR expresan la proteína quinasa CaMKIV implicada en la fosforilación de CREB (Ohmstede *et al.*, 1989). Se ha descrito que el tratamiento crónico con morfina provoca un descenso de la expresión de CaMKIV y p-CREB en el

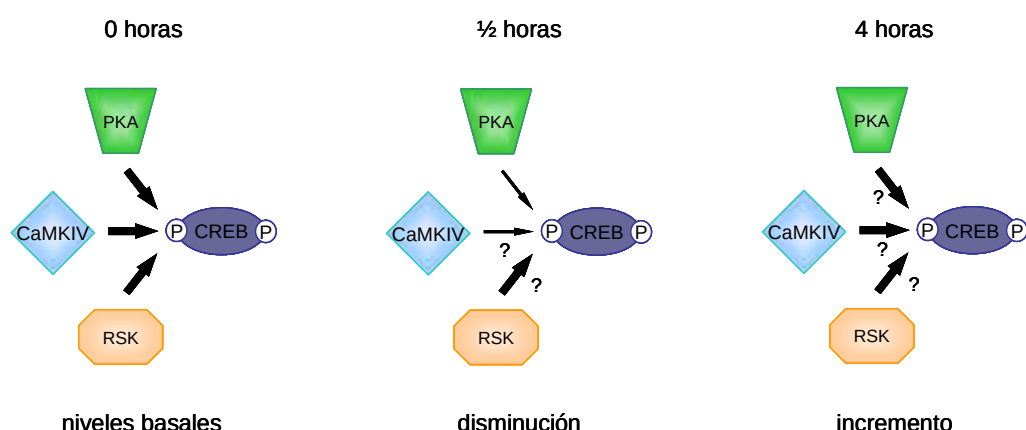


Figura 94. Posibles efectos a lo largo del tiempo de la activación de los receptores MOR sobre los mecanismos que regulan la fosforilación de CREB en el residuo Serina-133 en el caudado putamen de rata.

Abreviaturas: CaMK, quinasa dependiente de Ca^{2+} /Calmodulina; PKA, proteína quinasa A; RSK, quinasa S6 ribosomal activada por MAPK

CPu, mientras que en el Acb aumentan los niveles de ambas proteínas, sin que se observaran cambios en los niveles totales de CREB (Nemmani *et al.*, 2005). Esto sugiere que el tratamiento agudo con morfina también podría disminuir en el CPu la expresión de CaMKIV y por tanto la de p-CREB (**Fig. 94**). El incremento de p-CREB 4 horas después de la administración de morfina podría deberse a un mecanismo de compensación para contrarrestar el efecto del fármaco opioide a los 30 minutos. Quizás la desensibilización de los receptores MOR que se ha sugerido anteriormente en este trabajo provoca que los niveles de PKA retornen a los niveles basales y que aumente la fosforilación de CREB (**Fig. 94**).

Se ha sugerido que la inducción de c-Fos es dependiente de la fosforilación de CREB (Berkowitz *et al.*, 1989; Fisch *et al.*, 1989; Ginty *et al.*, 1994; Sassone-Corsi *et al.*, 1988; Sheng *et al.*, 1990). En este sentido, Guitart y colaboradores (1992) describieron que la administración aguda de morfina inhibe la fosforilación de CREB en el LC y disminuye la expresión de c-Fos. Esta relación también se observó en el LC tras la administración crónica de morfina y la inducción de abstinencia (Guitart *et al.*, 1992; Hayward *et al.*, 1990; Widnell *et al.*, 1994).

Sin embargo, esta correspondencia no está tan clara en el CPu y Acb, en parte debido a los escasos estudios que se han llevado a cabo. Los resultados presentados muestran que la inducción de c-Fos por morfina en el CPu es independiente de p-CREB puesto que la disminución de la expresión de éste a los 30 minutos no impide el incremento de la expresión de c-Fos que alcanza su máxima expresión a las 2 horas. Lonze y Ginty (2002) han sugerido que aunque p-CREB es necesario para la regulación del gen de c-fos, existe una falta de correspondencia entre la actividad transcripcional de p-CREB activo y la expresión de c-Fos, ya que en presencia de estímulos que producen una fosforilación prolongada de CREB la inducción de c-Fos

es transitoria. De acuerdo con esto, Bilecki y colaboradores (2004) han observado que la administración aguda de morfina incrementa la unión de factores de transcripción a la secuencia CRE de manera más lenta y con menos intensidad que a la secuencia AP-1, lo que sugiere que la inducción de c-Fos podría deberse en mayor medida a la regulación por AP-1 que por CREB. La unión de todas estas evidencias indica que CREB no sería el regulador principal de la expresión de c-Fos en el CPu tras la administración aguda de morfina, lo que apoya la idea de que CREB está involucrado en cambios a largo plazo mientras que c-Fos está implicado en efectos transitorios. Sería necesario complementar nuestros estudios para comprobar si la administración aguda de morfina modifica los niveles totales de la proteína CREB, de las proteínas quinasas implicadas en la regulación de CREB y de los otros elementos de la familia CREB (CREM y ATF-1) que podría también estar implicados en la inducción de c-Fos y de otros genes.

Por otro lado, se ha observado que el incremento de los niveles de p-CREB se produce de forma paralela al de FosB y Δ Fos B (**Fig. 92**), por lo que habría que estudiar con mayor detalle si están relacionados y conocer qué mecanismos de regulación se producen en este caso.

Otras drogas de abuso también provocan cambios en la expresión de estos factores de transcripción en el CPu. La anfetamina incrementa los niveles de c-Fos (Persico *et al.*, 1993) y la cocaína induce tanto c-Fos como Fos B (Chen *et al.*, 1995; Couceyro *et al.*, 1994; Moratalla *et al.*, 1993). Respecto a CREB, se ha descrito que las anfetaminas inducen su fosforilación en el CPu (Cole *et al.*, 1995), mientras que la cocaína incrementa los niveles de la proteína CREB en el Acb (Carlezon *et al.*, 1998) aunque su administración crónica disminuye los niveles de p-CREB en el CPu (Di Benedetto *et al.*, 2007).

La inducción de estos genes en el CPu y el Acb mediada por cocaína y anfetamina se debe a sus efectos directos sobre la

liberación y la recaptación de la dopamina y la acción de ésta a través de los receptores dopaminérgicos (Pierce y Kumaresan, 2006). La morfina induce un aumento de la tasa de disparo y de la liberación de dopamina en estos núcleos (Bontempi y Sharp, 1997; Di Chiara e Imperato, 1988a,b; Lacey *et al.*, 1989), pero no se conoce con exactitud qué receptores dopaminérgicos están involucrados, aunque se le ha dado gran importancia a los receptores D₁ (Chartoff *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 1994; Muller y Unterwald, 2005).

Tanto en la región promotora de los genes de los péptidos opioides dinorfina y encefalina como en el del enzima tirosina hidroxilasa (TH) existen secuencias AP-1 (Draisci e Iadarola 1989; Yoon y Chikaraishi, 1992) y CRE (Cambi *et al.*, 1989; Carlezon *et al.*, 1998; Cole *et al.*, 1995; Douglass *et al.*, 1994; Konradi *et al.*, 1993; Kumer y Vrana, 1996; Sakai *et al.*, 2002; Turgeon *et al.*, 1997). Por tanto, los cambios en la expresión de los factores de transcripción que estudiados podrían inducir variaciones en la expresión de estos genes diana (Abraham y Brewer, 2001; Bronstein *et al.*, 1994; Lonze y Ginty, 2002; Mayr y Montminy, 2001; Nestler *et al.*, 2001).

En este estudio se ha descrito que la administración de morfina produce un descenso de la expresión de los péptidos opioides encefalina y dinorfina. Sin embargo, trabajos llevados a cabo por otros autores no muestran que la morfina los modifique (Przewlocka *et al.*, 1996; Turchan *et al.*, 1997; Yukhananov y Handa, 1997). Las distintas dosis empleadas y los distintos protocolos de administración usados pueden ser la causa de estas diferencias.

El descenso se observó 30 minutos después del tratamiento con morfina, hecho que coincide con la disminución de p-CREB, por lo que este factor de transcripción podría estar involucrado en la regulación de su expresión.

Sin embargo, después de 2 y 4 horas del tratamiento con morfina no se observaron cambios en la expresión de los péptidos. Debido a que en estos tiempos sí se

produjeron variaciones en la expresión de los factores de transcripción no hay que descartar el papel regulador de otros factores, entre los que se podrían encontrar elementos de la familia Jun.

La regulación de la expresión de los receptores opioides en el CPu es más susceptible a la acción directa de los propios ligandos opioides mientras que la expresión de dinorfina y encefalina está regulada principalmente por acción de la dopamina (Mavridis y Besson, 1999). Sin embargo, la administración crónica de naloxona incrementa la expresión de los ARNm para encefalina y dinorfina en el CPu, lo que puede estar ocasionado por la acción directa de la naloxona sobre los receptores MOR y DOR localizados en las neuronas estriatales (Mavridis y Besson, 1999). Los receptores MOR se expresan tanto en las neuronas estriatopalidales como en las estriatonigrales, hecho que coincide con la modificación de la expresión de encefalina y dinorfina por su activación con morfina (Guttenberg *et al.*, 1996).

La administración aguda de cocaína y anfetamina también modifica la expresión de estos neuromoduladores en el CPu. La cocaína eleva los niveles de ARNm para encefalina y dinorfina (Adams *et al.*, 2003; Daunais y McGinty, 1994, 1995; Daunais *et al.*, 1995; Gonzalez-Nicolini *et al.*, 2003; Hurd y Herkenham, 1992; Moratalla *et al.*, 1996a; Steiner y Gerfen, 1993), al igual que la anfetamina (Adams *et al.*, 2003; Hanson *et al.*, 1987; Wang y McGinty, 1995a,b; Wang *et al.*, 1995).

3.2. Efectos de la activación de los receptores dopaminérgicos D₄

La dopamina, a través de su acción sobre los distintos subtipos de receptores, regula la expresión de los factores de transcripción bajo estudio, y por tanto su actividad (Berke *et al.*, 1998; Cole *et al.*, 1994; Doucet *et al.*, 1996; Konradi *et al.*, 1996).

La escasa disponibilidad de ligandos selectivos para los receptores D₄ ha

contribuido a que todavía hoy no se conozcan con exactitud sus efectos sobre las vías de señalización intracelulares y sobre la expresión de neuropéptidos en el cerebro y en concreto en el CPu. En este trabajo hemos mostrado que la activación de los receptores D₄ induce la expresión del factor de transcripción c-Fos en el CPu a los 30 minutos y la reduce a las 4 horas, mientras que induce la expresión de Fos B y Δ Fos B sólo a la media hora (**Fig. 95**).

Sin embargo, la activación de los receptores D₄ no modifica los niveles de ARNm para c-fos, por lo que los efectos en la expresión de la proteína deben ocurrir a nivel de traducción o se produce en tiempos diferentes a los estudiados.

Los receptores D₄ pertenecen a la familia de receptores D₂. Varios estudios han comparado los efectos de ligandos específicos de estos receptores sobre la expresión de c-Fos. Raclopride (antagonista de los receptores D₂/D₃) incrementa la expresión de c-Fos. Haloperidol (antagonista D₂) también lo incrementa pero con mayor intensidad, además de inducir la expresión de Fos B (Berke *et al.*, 1998; Dragunow *et al.*, 1990; MacGibbon *et al.*, 1995; Miller, 1990; Wan *et al.*, 1995). Sin embargo, la clozapina (antagonista no selectivo de los receptores D₄) no modifica la expresión de c-Fos (Nguyen *et al.*, 1992; Robertson y Fibiger, 1992). Además, el agonista D₂/D₃ quinolorane (Le Moine *et al.*, 1997) disminuye los niveles de ARNm para c-Fos en el CPu. Todas estas evidencias sugieren que los receptores D₄ tienen un efecto contrario al de los otros subtipos de receptores D₂, por lo que deben jugar un papel diferente a los receptores D₂ y D₃ en la regulación de la expresión de c-Fos en el CPu.

Se ha descrito que los receptores dopaminérgicos D₁ y D₂ regulan la expresión de los genes c-fos y fos b en el CPu de manera diferente ya que la administración aguda de SKF38393 (agonista de los receptores D₁) incrementa c-Fos y reduce los niveles de expresión de Fos B y que el eticlopride (antagonista de

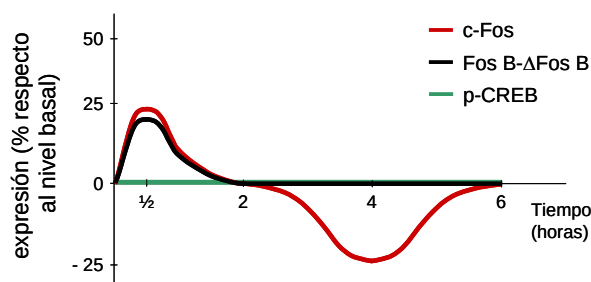


Figura 95. Diagrama temporal de la expresión de los distintos factores de transcripción en el caudado putamen tras la activación aguda de los receptores dopaminérgicos D₄.

los receptores D₂) induce c-Fos, mientras que el antagonista de los receptores D₂ eticlopride induce c-Fos (Berke *et al.*, 1998; Robertson *et al.*, 1990, 1992). Estas diferencias podrían deberse a las propiedades farmacológicas de estas dos clases de receptores (Missale *et al.*, 1998; Seeman y Van Tol, 1994) y a su localización diferencial en las neuronas de proyección estriatales (Robertson *et al.*, 1989; 1992).

Respecto a p-CREB, la activación de los receptores D₄ no modifica su expresión en ninguno de los tiempos analizados (½, 2, 4 y 6 horas) (**Fig. 95**). Se ha observado que en animales lesionados con 6-OHDA, en los que se provocó una depleción de dopamina en el CPu por lesión de las neuronas dopaminérgicas nigroestriatales, la administración de L-DOPA induce los niveles de p-CREB, efecto que es bloqueado por SCH23390 (antagonista de los receptores D₁), pero no por eticlopride (Cole *et al.*, 1994). Además, el agonista de los receptores D₁ SKF38393, pero no quinpirol, reproduce este efecto (Cole *et al.*, 1994), lo que sugiere que la expresión de p-CREB en el estriado está regulada principalmente por los receptores D₁. Sin embargo, la clozapina disminuye la fosforilación de CREB en el CPu (Pozzi *et al.*, 2003), por lo que no se puede descartar la posibilidad de que los receptores D₂, y entre ellos los receptores D₄, tengan un papel regulador de la expresión de este factor de transcripción.

Los estudios realizados hasta ahora se han llevado a cabo con ligandos no selectivos de un único receptor de las

familias D1 y D2. Por tanto, serían necesarios nuevos experimentos para comparar el efecto de PD168,077 con agonistas específicos para otros receptores dopaminérgicos y determinar con más exactitud que papel juegan los receptores D₄.

La expresión de dinorfina y encefalina en el CPu está regulada por los receptores dopaminérgicos (Bronstein *et al.*, 1994; Mavridis y Besson, 1999), siendo los receptores D₁, localizados principalmente en las neuronas estriatonigrales, los implicados en la regulación de dinorfina (Moratalla *et al.*, 1996b; Gerfen *et al.*, 1990, 1991) y los receptores D₂, que se expresan en las neuronas estriatopallidales, los involucrados en la modulación de encefalina (Gerfen *et al.*, 1990, 1991; Steiner y Gerfen, 1999).

Los receptores D₄ se expresan en ambos tipos de neuronas de proyección (Rivera *et al.*, 2003). Los resultados presentados en este trabajo muestran que la activación de los receptores D₄ modifica los niveles de ARNm para encefalina y que el efecto es doble y contrapuesto, ya que a los 30 minutos los reduce mientras que los incrementa a las 2 horas. Sin embargo, el agonista PD168,077 no induce cambios en los niveles de dinorfina en el CPu. Por tanto, los efectos de la activación de los receptores D₄ se asemejan a los descritos para los receptores D₂.

3.3. Efectos de la activación conjunta de los receptores dopaminérgicos D₄ y receptores opiodes tipo μ

En el presente trabajo se ha descrito por primera vez que los receptores D₄ median los efectos de la morfina sobre la expresión de genes. Esto constituye una nueva evidencia de que la dopamina, a través de los distintos receptores dopaminérgicos, juega un papel importante en la mediación de los efectos de la morfina en el CPu (Liu *et al.*, 1994, Cook y Wirtshafter, 1998).

La interacción entre ambos receptores es compleja en la secuencia temporal que hemos estudiado, ya que en los tiempos

más cortos ($\frac{1}{2}$ y 2 horas) la activación conjunta de los receptores D₄ y MOR bloquean el efecto sobre la expresión de c-Fos que cada receptor tiene cuando se activan de forma individual (**Fig. 96**) mientras que en tiempos posteriores (4 y 6 horas) su activación conjunta induce la expresión de este factor de transcripción (**Fig. 96**).

Existen varias interpretaciones, sin que se excluyan entre ellas, para explicar este efecto:

a) La posible inducción de la endocitosis de los receptores MOR por la activación de los receptores D₄ evitaría los cambios en la señalización intracelular y en la expresión de genes producidos cuando sólo se administra morfina.

b) La administración de morfina provoca un incremento de liberación de dopamina en el CPu (Bontempi y Sharp, 1997; Di Chiara e Imperato, 1988a,b; Lacey *et al.*, 1989). Se ha sugerido que la unión de este neurotransmisor a los receptores D₁ provoca la inducción de c-Fos (Liu *et al.*, 1994). El agonista PD168,077 podría actuar con un inhibidor indirecto de los receptores D₁ ya que atenúa la liberación de dopamina en el CPu inducida por morfina (resultados de

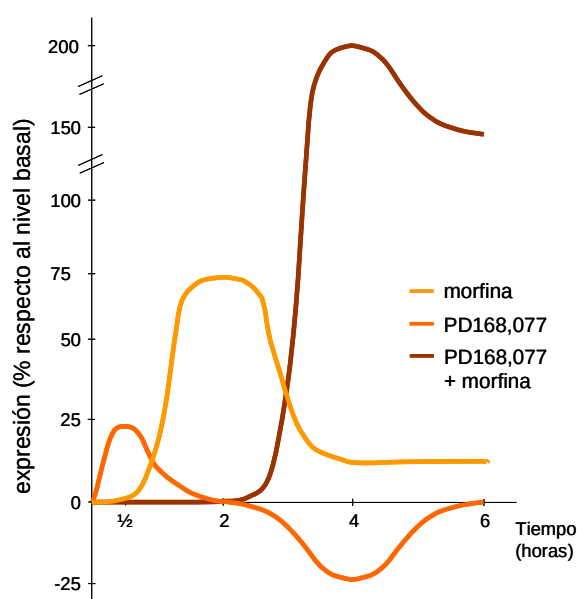


Figura 96. Diagrama temporal de la expresión de c-Fos en el CPu tras la activación aguda de los receptores dopaminérgicos D₄ y/o opiodes tipo μ .

nuestro laboratorio no publicados), evitando así la activación de éstos receptores. La administración del agonista de los receptores D_2/D_3 quinpirol previene la inducción de c-Fos por morfina (Cook y Wirtshafter, 1998), por lo que el efecto observado es común para la familia de receptores D_2 .

c) La activación directa de los receptores MOR también podría inducir directamente la expresión de c-Fos y otros factores de transcripción. Los receptores D_4 podrían modificar la cascada de señalización de los receptores MOR modificando los efectos de la morfina.

Esto podría ocurrir alterando los niveles de expresión de quinasas. Los receptores D_1 activan la vía de señalización del AMPc/PKA (Hemmings *et al.*, 1984), estimulando la fosforilación en el residuo Thr-34 de DARPP-32, proteína que modula la actividad de PP-1 y PKA (Borgkvist y Fisone, 2007; Svenningsson *et al.*, 2004). Sin embargo, este efecto es bloqueado tras la administración de DAMGO (Lindskog *et al.*, 1999). Esto sugiere la existencia de una interacción entre receptores opioides y dopaminérgicos a nivel de mecanismos de señalización celular, por lo que es posible la interacción entre los receptores D_4 y MOR a este nivel.

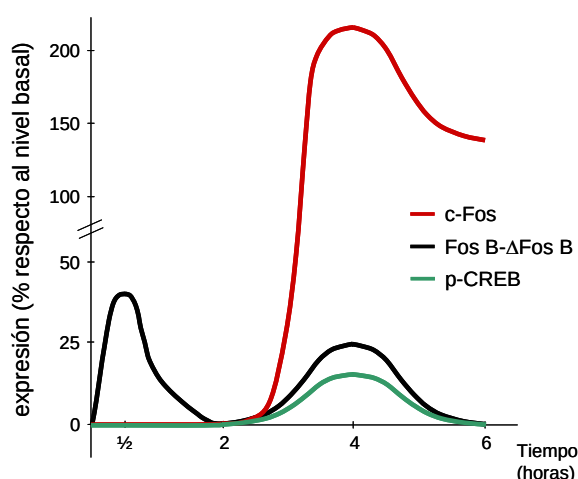


Figura 97. Diagrama temporal de la expresión de los distintos factores de transcripción en el caudado putamen tras la activación aguda de los receptores dopaminérgicos D_4 y opioides tipo μ .

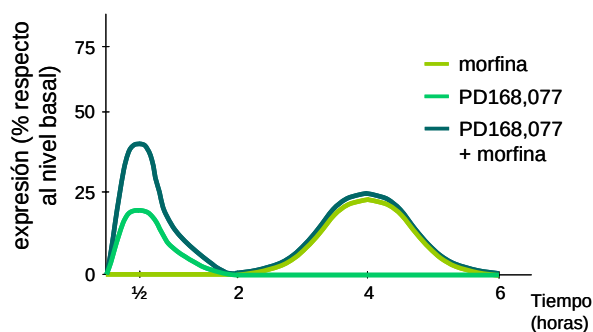


Figura 98. Diagrama temporal de la expresión de Fos B- Δ Fos B en el caudado putamen tras la activación aguda de los receptores dopaminérgicos D_4 y/o opioides tipo μ .

Los agonistas dopaminérgicos inducen la expresión de c-Fos principalmente en las neuronas estriatonigrales (Cenci *et al.*, 1992; Robertson *et al.*, 1990), como ocurre tras la administración de morfina (Ferguson *et al.*, 2004). Aunque no existen evidencias directas, esta población de neuronas de proyección expresan los receptores MOR, D_1 y D_4 (Georges *et al.*, 1999; Gerfen *et al.*, 1990; Harrison *et al.*, 1990, 1992; Le Moine *et al.*, 1991, 1995; Noble y Cox, 1995; Rivera *et al.*, 2003; Yung *et al.*, 1995). Por tanto, es posible que los tres tipos de receptores interactúen entre ellos (Fuxe *et al.*, 2007).

Contrariamente al efecto observado a las 2 horas, la activación conjunta de los receptores D_4 y MOR provoca un incremento en los niveles de c-Fos a las 4 y 6 horas (**Fig. 97**), que también se ve reflejado en el incremento de los niveles de ARNm para c-fos a las 2 horas. Este aumento de la expresión podría deberse a un mecanismo de compensación pero serían necesarios más experimentos para conocer con precisión los mecanismos moleculares que están detrás de este sinergismo positivo entre ambos receptores.

La activación de los receptores D_4 no bloquea la inducción de la expresión de Fos B- Δ Fos B por morfina a las 4 horas (**Fig. 98**). Sin embargo, la administración conjunta de PD168,077 y morfina incrementa la expresión de estos factores de transcripción a la $\frac{1}{2}$ hora con mayor intensidad que la administración sola de PD168,077, lo cual podría ser fruto de un sinergismo entre estos

receptores dopaminérgicos y los receptores MOR (Fig. 98).

Respecto a p-CREB, la activación de los receptores D₄ no modifica de forma clara el efecto de la morfina ½ hora después de la coadministración, mientras que a las 4 horas no lo bloquea (Fig. 99).

Los factores de transcripción Fos B y ΔFos B han sido implicados en la generación de desórdenes del movimiento (Kelz y Nestler, 2000) y en la aparición de adaptaciones neurológicas asociadas a la drogadicción (Chen *et al.*, 1997; Nestler, 2004a,b) y CREB es un elemento clave en el proceso de aprendizaje y memoria (Dash *et al.*, 1990; Davis *et al.*, 2000; Pham *et al.*, 1999). Como estos factores están asociados a cambios a largo plazo generados por el consumo crónico de drogas, ésta puede ser la razón por la que no se observa un efecto claro de la activación de los receptores D₄ sobre los cambios en la expresión de éstos factores de transcripción por morfina.

Respecto a los péptidos opioides endógenos, la activación de los receptores D₄ bloquea el descenso de los niveles de ARNm para dinorfina en el CPu que se produce ½ hora después de la administración de morfina. En el caso de la encefalina, PD168,077 no solo bloquea el efecto de la morfina, sino que los niveles de ARNm para este péptido endógeno se incrementan tras la coadministración de los fármacos.

Los receptores D₄ se localizan tanto en las neuronas estriatonigrales como en las

estriatopalidales (Rivera *et al.*, 2003), hecho que coincide con la regulación de la expresión inducida por morfina de ambos péptidos endógenos en el CPu.

Nuestros resultados indican por tanto, que los receptores D₄ están implicados en la regulación tanto de la vía estriatonigral como de la vía estriatopalidal.

4. Complejidad Estructural del Caudado Putamen

La variedad de conexiones aferentes y eferentes del CPu y los distintos patrones de expresión de marcadores neuroquímicos hacen que este núcleo presente una organización estructural de alta complejidad.

Una muestra de ello es el patrón de distribución de los receptores D₄ y MOR en este núcleo, ya que presentan un gradiente de expresión a lo largo del eje rostro-caudal (Arvidsson *et al.*, 1995; Kaneko *et al.*, 1995; Mansour *et al.*, 1995; Rivera *et al.*, 2002a; Svingos *et al.*, 1996). Debido a esto, los efectos de la activación de los receptores D₄ y/o MOR sobre la expresión de los factores de transcripción fueron analizados en los niveles rostrales, medios y caudales del CPu de forma independiente tal y como han realizado otros autores (Grande *et al.*, 2004; Pavon *et al.*, 2006; Rivera *et al.*, 2002a; Sgambato *et al.*, 1997).

Los efectos de la activación de los receptores MOR se producen de forma homogénea en todo el CPu salvo en algunos puntos del estudio temporal por lo que el gradiente rostro-caudal de su expresión no se ve reflejado en los cambios producidos por el tratamiento con morfina (Arvidsson *et al.*, 1995; Kaneko *et al.*, 1995; Mansour *et al.*, 1995).

Tras la activación los receptores D₄, las modificaciones en la expresión de los factores de transcripción ocurren principalmente en los niveles medios o caudales, lo cual sí refleja el hecho de que la expresión de estos receptores es mayor en los niveles caudales que en los rostrales (Rivera *et al.*, 2002a).

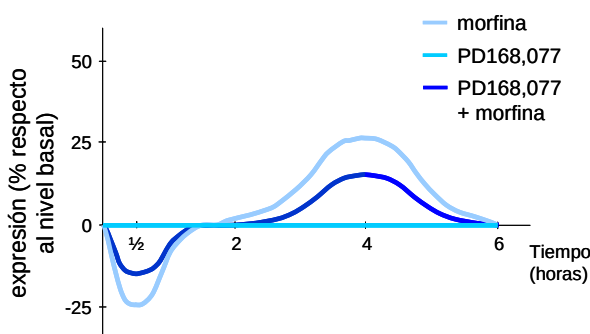


Figura 99. Diagrama temporal de la expresión de p-CREB en el caudado putamen tras la activación aguda de los receptores dopaminérgicos D₄ y/o opioides tipo μ.

Las variaciones que se observan tras la activación conjunta de ambos receptores también se analizaron a lo largo del eje rostro-caudal. En este caso, los cambios observados en los niveles del CPu varían según el factor de transcripción o el tiempo que se esté analizando, por lo que no se puede llegar a una conclusión general.

Sí hay que destacar un hecho curioso. A pesar de que los receptores MOR tienen una distribución parcheada en el CPu, ya que se expresan principalmente en los estriosomas (Arvidsson *et al.*, 1995; Kaneko *et al.*, 1995; Mansour *et al.*, 1995; Moriwaki *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 1996), y de que los receptores D₄ se expresan con mayor abundancia también en este compartimento estriatal (Rivera *et al.*, 2002a), la inducción de los distintos factores de transcripción analizados en este trabajo no presentan una distribución en parches que coincida con los estriosomas. En el caso de c-Fos, la inducción se observa en las regiones DM y VM. Los factores Fos B y ΔFos B se expresan en todo el CPu, aunque se observa un gradiente latero-medial, mientras que p-CREB se expresa homogéneamente en todo el núcleo.

Por otro lado, al comparar el patrón de expresión de c-Fos inducido por la morfina con el que se produce tras la administración de otras drogas existen ciertas diferencias. La administración aguda de anfetaminas induce la expresión de c-Fos de manera parcheada mientras que tras el tratamiento con cocaína este factor de transcripción presenta un patrón de distribución homogéneo en el CPu. Este hecho podría estar reflejando que la administración de cada droga activa diferentes receptores dopaminérgicos presentes en las neuronas de manera específica, y por tanto, las cascadas de señalización asociadas a éstos (Graybiel *et al.*, 1990).

Las proyecciones corticoestriales se organizan topográficamente también según los ejes latero-medial y dorso-ventral del CPu, de manera que las cortezas somatosensoriales proyectan principalmente hacia las regiones dorsales y laterales,

mientras que las cortezas límbicas envían sus proyecciones hacia las regiones ventrales y mediales (Gerfen y Wilson, 1996). Esta distribución se mantiene a lo largo de los núcleos que constituyen los ganglios basales (Gerfen y Wilson, 1996). Debido a esto, el análisis en detalle de la expresión de los péptidos encefalina y dinorfina se realizó en las regiones medial y lateral del CPu.

Los receptores D₄ localizados en la matriz, pero no en los estriosomas, presentan un gradiente de expresión latero-medial (Rivera *et al.*, 2002a), mientras que los receptores MOR son más abundantes en la región dorsal que en la ventral (Mansour *et al.*, 1995).

Sin embargo, no se observaron diferencias entre las regiones lateral y medial en los efectos observados tras la administración de morfina y de PD168,077 sobre la expresión de los ARNm para encefalina y dinorfina, aunque sí al analizar los efectos de la administración conjunta de PD168,077 y morfina. Así, la activación de los receptores D₄ y MOR provoca una disminución a las 2 horas de la expresión de la encefalina en la región medial pero no en la lateral, mientras que incrementa los niveles de ARNm para dinorfina a la ½ hora en la región medial pero no en la lateral. Por tanto, los resultados indican que los receptores D₄ regulan de manera diferencial los efectos de la morfina sobre la expresión de los péptidos opioides endógenos.

El análisis de la expresión de los factores de transcripción y neuropéptidos realizado a lo largo de los ejes rostro-caudal y latero-medial refleja la complejidad de la organización de este núcleo y de la interacción entre los receptores D₄ y MOR, por lo que los efectos observados no dependen sólo de la distribución de éstos receptores en el CPu. Llegar a entender la organización de estas regiones nos proporcionará mayor información sobre las funciones de cada una de ellas y del CPu en conjunto, por lo que futuros estudios se realizarán de forma detallada en las distintas regiones y compartimentos del CPu.

5. Interacción de los Receptores Dopaminérgicos D₄ y Opioides tipo μ en otros Núcleos Cerebrales e Implicación de otros Sistemas de Neurotransmisión

Las funciones mediadas por el CPu, a través de sus proyecciones eferentes hacia el GP y la SN, están reguladas por las aferencias glutamatérgicas que se originan en la corteza cerebral y por las aferencias dopaminérgicas que provienen de la SNc (Gerfen, 1984, 1989; Gerfen *et al.*, 1987).

Los receptores D₄ y MOR se expresan en la SN, la corteza y el GP (Ariano *et al.*, 1997a; Defagot *et al.*, 1997a,b; Mansour *et al.*, 1987, 1994a,b, 1995; Mrzljak *et al.*, 1996; Peckys y Landwehrmeyer, 1999; Rivera *et al.*, 2002a, 2003; Rubinstein *et al.*, 1997; Sharif y Hughes, 1989; Tempel y Zukin, 1987) por lo que no se puede descartar que se produzca algún tipo de interacción entre ambos tipos de receptores en estos núcleos tras la administración sistémica de los fármacos. Esta interacción podría contribuir a la modificación de los niveles de expresión en el CPu de los distintos factores de transcripción y péptidos opioides estudiados en este trabajo.

Sustancia negra

En la SN, los receptores D₄ se expresan tanto en la SNC (Defagot *et al.*, 1997a,b) como en la SNR. En la SNC se localizan en somas neuronales (Defagot *et al.*, 1997b), sin que se haya identificado qué tipo de neuronas son, mientras que en la SNR se expresan en terminales axónicos de neuronas GABAérgicas estriatales (Mrzljak *et al.*, 1996; Rivera *et al.*, 2003). Los receptores MOR también se expresan en ambas regiones de la SN (Mansour *et al.*, 1994a, 1995), aunque de forma más abundante en la SNR, localizándose en fibras y varicosidades. Si se ha descrito que estos receptores se encuentran en neuronas GABAérgicas en SNR que regulan la actividad de las neuronas dopaminérgicas de la SNC (Bontempi y Sharp, 1997; Di

Chiara e Imperato, 1988a; Lacey *et al.*, 1989). Por tanto, ambos receptores están implicados en la regulación de la vía dopaminérgica nigroestriatal, por lo que su activación por PD168,077 y morfina podría contribuir a los cambios observados en el CPu.

Las proyecciones aferentes de la SN también participan en la regulación de la vía nigroestriatal. Así, resultados previos de nuestro grupo de investigación (Rivera *et al.*, 2003) sugieren que la síntesis de los receptores D₄ localizados en la SNR se produce en los somas de las neuronas estriatonigrales del CPu y son transportados a través de los axones hasta la SNR, aunque también existe una pequeña contribución desde la corteza prefrontal a través de las proyecciones corticonigrales (Naito *et al.*, 1994). Por tanto, estos receptores también están implicados en la regulación de las aferencias glutamatérgica y GABAérgica en la SN.

La dopamina liberada en el CPu por las neuronas nigroestriatales regula la biosíntesis de dinorfina en el CPu (Engber *et al.*, 1992; Jiang *et al.*, 1990; Li *et al.*, 1990). Se ha sugerido que éste péptido, a su vez, actúa como regulador de la vía nigroestriatal ya que las neuronas estriatonigrales lo liberan en la SN donde regula la actividad de las neuronas localizadas en este núcleo (Di Chiara e Imperato, 1988b; Herrera-Marschitz *et al.*, 1986; Maisonneuve *et al.*, 1994; Mulder *et al.*, 1984; Reid *et al.*, 1988; Schlosser *et al.*, 1995; Spanagel y Shippenberg, 1993).

La dinorfina es el principal ligando endógeno de los receptores KOR (Gerrits *et al.*, 2003; Raynor *et al.*, 1994) que en la SN se expresa tanto en la SNC como en la SNR (DePaoli *et al.*, 1994; Minami *et al.*, 1993; Mansour *et al.*, 1994a,c), aunque de forma más abundante en la SNC (Fallon *et al.*, 1985; Mansour *et al.*, 1994c, 1996).

Se ha propuesto que las neuronas estriatonigrales liberan dinorfina en la SN (Fallon *et al.*, 1985; Weiss-Wunder y Chesselet, 1990), donde se unen a los receptores KOR localizados en neuronas

dopaminérgicas de la SNC y GABAérgicas de la SNR (Pickel *et al.*, 1993), y que éstas últimas contactarían con las neuronas dopaminérgicas de la SNC inhibiendo su actividad (Spangler *et al.*, 1997).

El descenso de los niveles de ARNm para dinorfina en el CPu que se ha descrito en este trabajo tras la administración de morfina implica una menor expresión de este opioide endógeno, y posiblemente una menor liberación en la SN (**Fig. 100**), que podría explicar el incremento de la tasa de disparo de las neuronas dopaminérgicas nigroestriatales 2 horas después de la

administración aguda de morfina descrita por otros autores (Bontempi y Sharp, 1997; Di Chiara e Imperato, 1988a) y el aumento de los niveles de TH en el CPu que hemos observado en experimentos en nuestro laboratorio (datos no publicados). Existen evidencias que apoyan esta idea ya que el bloqueo de los receptores KOR mediante la administración del antagonista norbinaltorphimine, aumenta el desarrollo de la sensibilización locomotora inducida por morfina e incrementa la liberación de dopamina (Spanagel y Shippenberg, 1993), mientras que la activación de los receptores

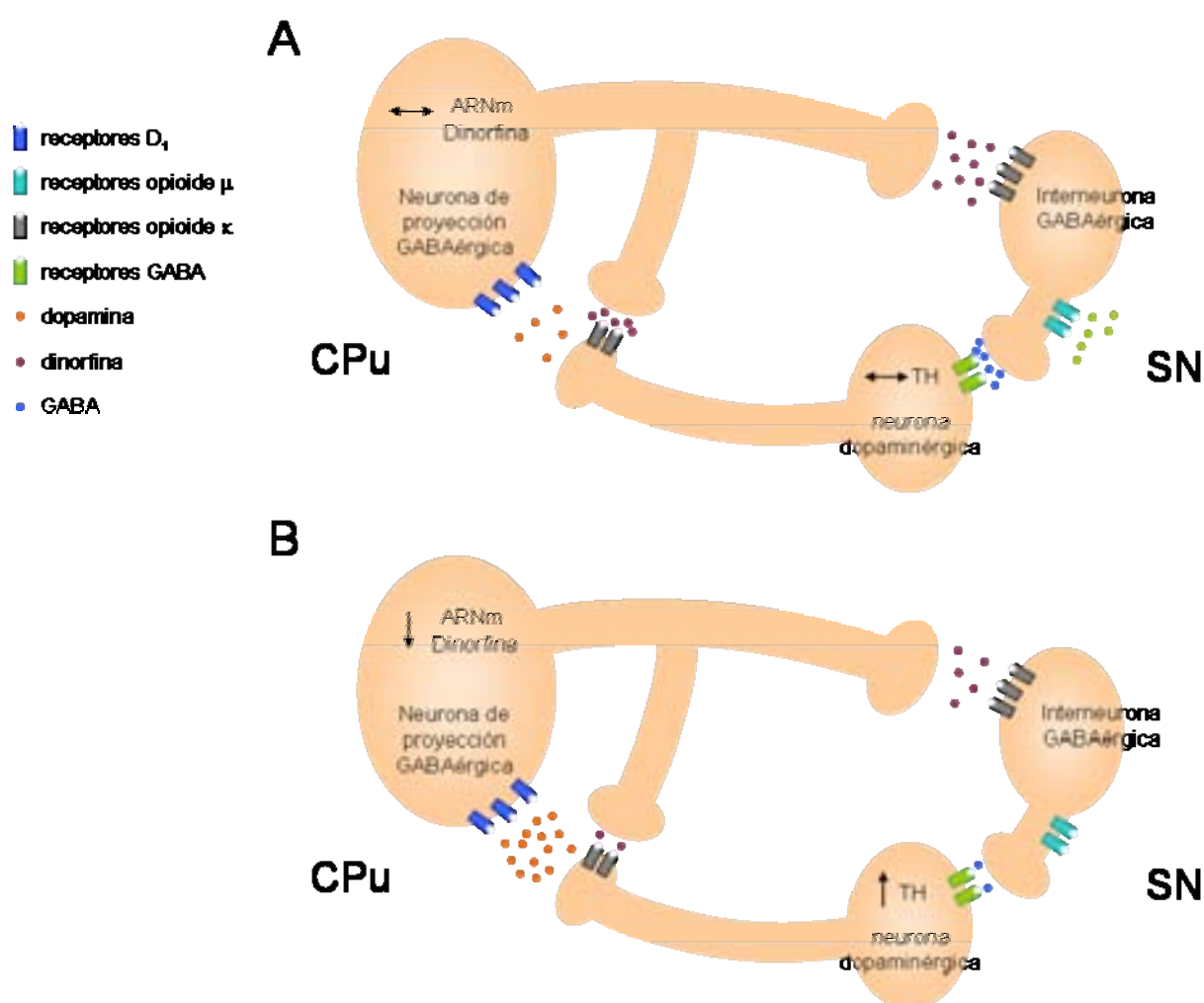


Figura 100. Esquema representativo del efecto del tratamiento agudo por morfina sobre las vías estriatonigral y nigroestriatal. La administración de morfina reduce la expresión de dinorfina en las neuronas estriatonigrales en el caudado putamen y activa los receptores MOR localizados en las interneuronas GABAérgicas de la sustancia negra (**A**), lo que provoca la inhibición de éstas (**B**). Las neuronas dopaminérgicas se ven desinhibidas (**B**), aumentando su tasa de liberación de dopamina en el caudado putamen.

Abreviaturas: CPu, caudado putamen; SN, sustancia negra; TH, tirosina hidroxilasa

KOR disminuye la tasa de disparo de las células dopaminérgicas de la SN (Walker *et al.*, 1987) y la liberación de dopamina (Manzanares *et al.*, 1991) y disminuye los efectos de recompensa de la morfina (Suzuki *et al.*, 1999).

Este efecto es complementario al mecanismo de regulación de la vía nigroestriatal de los receptores MOR localizados en la SN. La activación de estos receptores por la morfina provoca la inhibición de las neuronas GABAérgicas lo que produce la desinhibición de las neuronas dopaminérgicas e incrementa la liberación de dopamina en el CPu (**Fig. 100**).

Aunque la activación de los receptores D₄ no ha tenido ningún efecto sobre los niveles de ARNm para dinorfina, sí bloquea la disminución de su expresión inducida por morfina, por lo que podría contribuir a contrarrestar y bloquear el incremento de liberación de dopamina en el CPu, tal y como se ve reflejado en la inhibición del incremento de expresión de TH por morfina (datos no publicados de nuestro laboratorio). Complementariamente, no podemos excluir la posibilidad de que la activación de los receptores D₄ pueda provocar la internalización de los receptores MOR en las neuronas de la SN, inhibiendo los efectos de la morfina. Sería necesario identificar los tipos neuronales donde se localizan los receptores D₄ y MOR para determinar si se coexpresan en las mismas neuronas.

Globo Pálido

En el CPu se ha detectado la expresión de encefalina en las neuronas estriatopalidales (Cuello y Paxinos, 1978; Gerfen y Young, 1988), por lo que este péptido participa en la regulación de la vía eferente estriatopalidal (Curran y Watson, 1995; Gerfen y Young, 1988; Gerfen y Wilson, 1996; Reiner y Anderson, 1990).

La encefalina es el ligando principal de los receptores DOR. En el CPu, éstos receptores se expresan abundantemente y

con una distribución homogénea. Mansour y colaboradores (1993) sugirieron que estos receptores podrían localizarse en los axones colaterales de las neuronas estriatales actuando como autorreceptores, por lo que la encefalina podría autorregular su propia expresión. En el GP no se ha detectado el ARNm para el receptor DOR y la densidad de sitios de unión es baja (Mansour *et al.*, 1993, 1994a). Se ha postulado que la encefalina en el GP produciría un efecto excitatorio indirecto inhibiendo la liberación de GABA por parte de las aferencias estriatopalidales (Mavridis y Besson, 1999). Por tanto, encefalina y GABA poseen efectos opuestos sobre la excitabilidad del GP para regular la estimulación de la actividad locomotora (Mavridis y Besson, 1999).

Los receptores MOR del GP también están involucrados en el control de la actividad locomotora (Dewar *et al.*, 1985). La encefalina además de ser el ligando principal de los receptores DOR, también se une con bastante afinidad a estos receptores (Gerrits *et al.*, 2003; Monory *et al.*, 2000; Raynor *et al.*, 1994), por lo que la encefalina también podría unirse a los receptores MOR en el GP regulando su actividad. La disminución de los niveles de ARNm para encefalina por morfina en el CPu puede modificar la actividad de ambos tipos de receptores opioides en el CPu y en el GP.

Tanto en el LGP como en el MGP, los receptores D₄ se expresan en los terminales axónicos de neuronas GABAérgicas (Ariano *et al.*, 1997a; Mauger *et al.*, 1998; Mrzljak *et al.*, 1996; Rivera *et al.*, 2003), por lo que como en el caso de la SNR, estos receptores son sintetizados en el soma de las neuronas localizadas en el estriado y transportados a través de los axones (Rivera *et al.*, 2003). También se ha descrito que estos receptores se expresan en los somas de neuronas palidales (Defagot *et al.*, 1997b), por lo que estos receptores dopaminérgicos podrían localizarse en las mismas neuronas que los receptores MOR.

Esta distribución de ambos receptores, junto con el hecho de que la activación de los receptores D_4 bloquea la reducción de los niveles de ARNm para encefalina en el CPu inducida por la morfina, sugiere que debe existir una interacción entre estos receptores dopaminérgicos y los receptores MOR en el GP.

Corteza

En la corteza, tanto las neuronas piramidales glutamatérgicas que proyectan hacia el CPu y la SN (Carter, 1982), como las interneuronas GABAérgicas expresan de manera abundante el receptor D_4 (Ariano *et al.*, 1997a; Khan *et al.*, 1998; Mrzljak *et al.*, 1996; Rubinstein *et al.*, 1997). La hiperexcitabilidad cortical que muestran los ratones deficientes para D_4 (Rubinstein *et al.*, 2001) es mimetizada por la administración del antagonista de los receptores D_4 PNU-101387G en ratones normales (Rubinstein *et al.*, 2001), lo que sugiere que estos receptores dopaminérgicos podrían actuar como moduladores inhibitorios de la actividad glutamatérgica y GABAérgica de la corteza y por tanto regular la transmisión excitatoria de la corteza hacia los ganglios basales

(Rubinstein *et al.*, 2001; Tarazi *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 2002).

De acuerdo con esto, Wang y colaboradores (2003) han sugerido que los receptores D_4 y los receptores glutamatérgicos tipo NMDA interaccionan entre ellos en neuronas de la corteza prefrontal (**Fig. 101A**). La actividad de los canales NMDA está regulada por un proceso complejo de fosforilación-desfosforilación, mediado por las proteínas PKA, PP-1 y CaMKII (Lieberman y Mody, 1994; Raman *et al.*, 1996; Westphal *et al.*, 1999). La activación de los receptores D_4 implica una reducción de la actividad de PKA y consecuentemente la deshinhibición de PP-1, que a su vez reduce la autofosforilación de CaMKII. El resultado final es el bloqueo de la corriente a través de los canales NMDA. Además, PKA y CaMKII son mediadores del transporte de los receptores NMDA (Crump *et al.*, 2001; *et al.*, 1998), por lo que la reducción de la actividad modifica el tráfico intracelular de estos receptores e induce su internalización, reduciendo su expresión en la membrana celular.

Esto sugiere que los efectos del agonista PD168,077 sobre la expresión de factores de transcripción y opioides endógenos

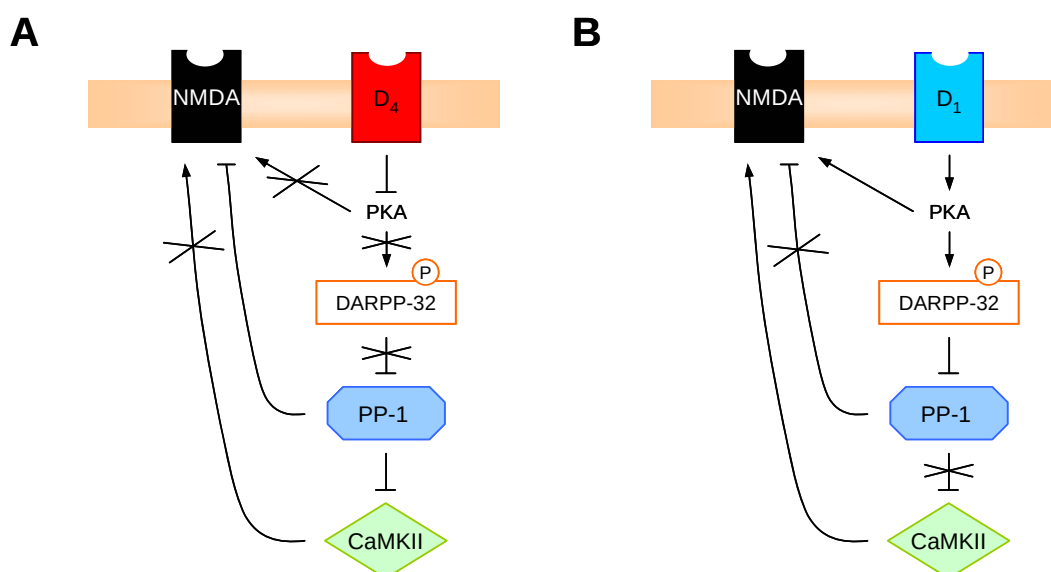


Figura 101. Representación esquemática del efecto de la activación de los receptores D_4 (A) y D_1 (B) sobre la expresión de los receptores NMDA en neuronas de la corteza y del estriado respectivamente. Abreviaturas: CaMK, proteína quinasa dependiente de Ca^{2+} /Calmodulina; PKA, proteína quinasa A; PP-1, fosfatasa 1

podrían estar mediados por la inhibición presináptica que ejercen estos receptores sobre la transmisión corticoestriatal. Las neuronas piramidales de la corteza prefrontal establecen conexiones con neuronas localizadas en los estriosomas del CPu. Los receptores MOR se localizan principalmente en las dendritas y espinas dendríticas de neuronas estriatales aunque también se localizan en algunos axones corticales (Berendse *et al.*, 1992; Donoghue y Herkenham, 1986; Gerfen, 1984, 1989; Kincaid y Wilson, 1996; Wang *et al.*, 1996; Wang y Pickel, 1998). Por tanto, los receptores MOR también podrían estar implicados en la regulación postsináptica de la neurotransmisión corticoestriatal, lo que constituye otro posible punto de interacción de los receptores D₄ y MOR.

Interacción con otros tipos de receptores en el caudado putamen

Los receptores D₄ podrían interaccionar también con otros receptores dopaminérgicos u otro tipo de receptores en el CPu para regular los efectos de la morfina.

Los receptores D1 regulan el número de receptores NMDA en las membranas de las neuronas del CPu (Dunah y Standaert, 2001; Flores-Hernandez *et al.*, 2002; Keefe y Ganguly, 1998; Snyder *et al.*, 1998) (**Fig. 101B**) ya que la activación de estos receptores dopaminérgicos incrementa la densidad de receptores NMDA en membrana plasmáticas (Flores-Hernandez *et al.*, 2002). Aunque no se han realizado estudios sobre el efecto de los receptores D₄ sobre la densidad de los receptores NMDA en las neuronas estriatales, los receptores dopaminérgicos D₄ y D₁ podrían regular de manera opuesta el tráfico de los receptores glutamatérgicos en el CPu, y por tanto el efecto de la transmisión glutamatérgica. Un hecho que apoya la interacción entre los tres receptores en el CPu, es que los ratones deficientes para el receptor D₄ presentan una mayor expresión tanto de los receptores D₁ como NMDA en

este núcleo (Gan *et al.*, 2004), probablemente potenciado por un proceso de compensación para contrarrestar los efectos derivados de la pérdida de los receptores D₄.

Las neuronas estriatales que expresan MOR también expresan los receptores NMDA (Wang y Pickel, 2000). Por tanto, las modificaciones que la activación de los receptores D₄ causen sobre la transmisión cortical glutamatérgica podrían provocar cambios en las neuronas que expresan MOR y por tanto influir sobre los efectos de su activación por morfina.

Los receptores metabotrópicos de glutamato (mGlu), que se expresan de manera abundante en las neuronas de proyección del CPu (Albin *et al.*, 1992; Martin *et al.*, 1992; Shigemoto *et al.*, 1992; Testa *et al.*, 1994) también podrían estar implicados en los fenómenos que hemos observado puesto que su activación incrementa la expresión de encefalina y dinorfina en el CPu (Wang y McGinty, 1998). Además el incremento de la liberación de glutamato en el CPu contribuye, al menos en parte, a la estimulación de los terminales nerviosos nigroestriatales en el CPu (Westerink *et al.*, 1992) o a las neuronas dopaminérgicas en la SN, provocando un incremento de liberación de dopamina en el CPu (Nieoullon *et al.*, 1978; Overton y Clark, 1992; Taber y Fibiger, 1993). Por tanto, los receptores D₄ podrían alterar la actividad de las neuronas dopaminérgicas nigroestriatales mediante la liberación de glutamato sobre estas neuronas. Además, la administración de naloxona, antagonista general de los receptores opioides (Zukin *et al.*, 1982), y de CTOP, antagonista específico de los receptores MOR (Toll, 1992) produce un incremento de la liberación de Glu en el estriado por lo que debe existir una inhibición tónica mediante los receptores MOR en condiciones fisiológicas (You *et al.*, 1999), que puede ser modificada por la administración de morfina.

Todas las evidencias expuestas, recogidas en la **figura 102**, sugieren que la activación de los receptores D₄ puede

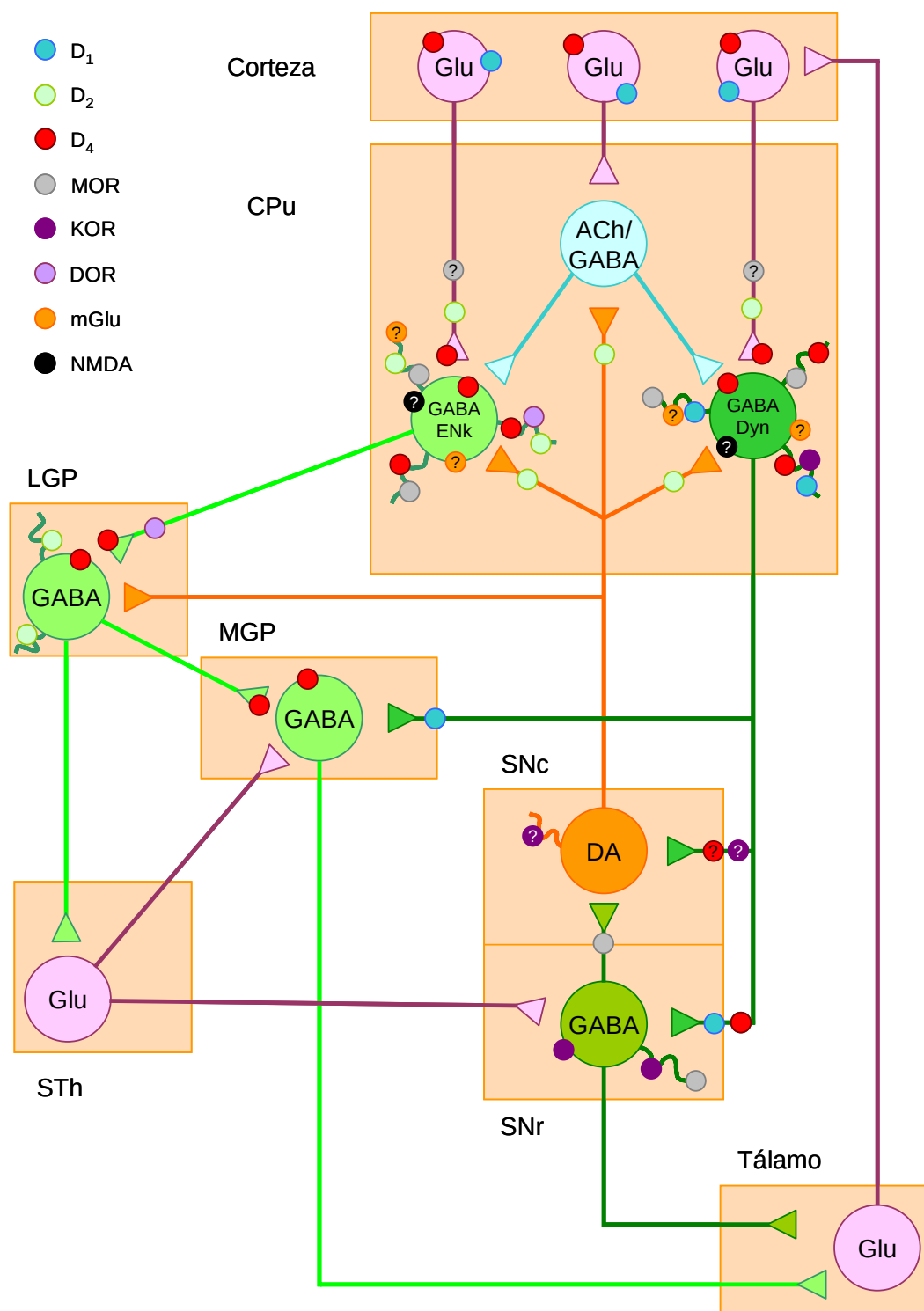


Figura 102. Esquema representativo y simplificado de la localización de los receptores D₁, D₂, DOR, KOR, mGlu y NMDA que pueden influir o regular la interacción de los receptores D₄ y MOR en la corteza y los núcleos que forman los ganglios basales.

Abreviaturas y símbolos: ?, se desconoce el tipo celular donde se expresan los receptores o la localización subcelular; ACh, acetilcolina; DA, dopamina; DOR, receptor opioide δ; Dyn, dinorfina; Enk, encefalina; Glu, glutamato; KOR, receptore opioide κ; LGP, globo pálido lateral; MGP, globo pálido medial; MOR, receptor opioide μ; STh, núcleo subtalámico, SNr, sustancia negra reticular; SNC, sustancia negra compacta

modular la regulación de la expresión de factores de transcripción y opioides endógenos en el CPU, no solo por su activación directa en este núcleo, sino mediante su interacción con otros sistemas de neurotransmisores y por la influencia de las conexiones aferentes que recibe desde otros núcleos, lo que da muestras de la complejidad del papel regulador de los receptores dopaminérgicos, y en concreto de los receptores D_4 , en la organización funcional del CPU.

6. Actividad Locomotora

Se ha establecido un modelo para explicar cómo el estriado controla la función motora mediante las dos vías de proyección que parten de él (Flaherty y Graybiel, 1993; Parent y Hazrati, 1995a,b). De manera

simplificada, la activación de la vía indirecta inhibe las neuronas talamocorticales reduciendo la actividad motora, mientras que la activación de la vía directa inicia el movimiento promoviendo la desinhibición de las neuronas talamocorticales (Albin *et al.*, 1989; Alexander *et al.*, 1990; Bolam *et al.*, 2000; DeLong, 1990; Gerfen, 1992; Graybiel, 1990; Hauber, 1998; Joel y Weiner, 1997; Kalivas *et al.*, 1983) (**Fig. 103**). A pesar de este esquema, la organización estriatal en los compartimentos de la matriz y los estriosomas también influye en el control de la actividad motora (Gerfen, 1984; Graybiel, 1990; Graybiel y Ragsdale, 1978; Graybiel *et al.*, 2000). Así, las neuronas GABAérgicas localizadas en los estriosomas inervan a las neuronas dopaminérgicas de la SNC (Gerfen, 1984;

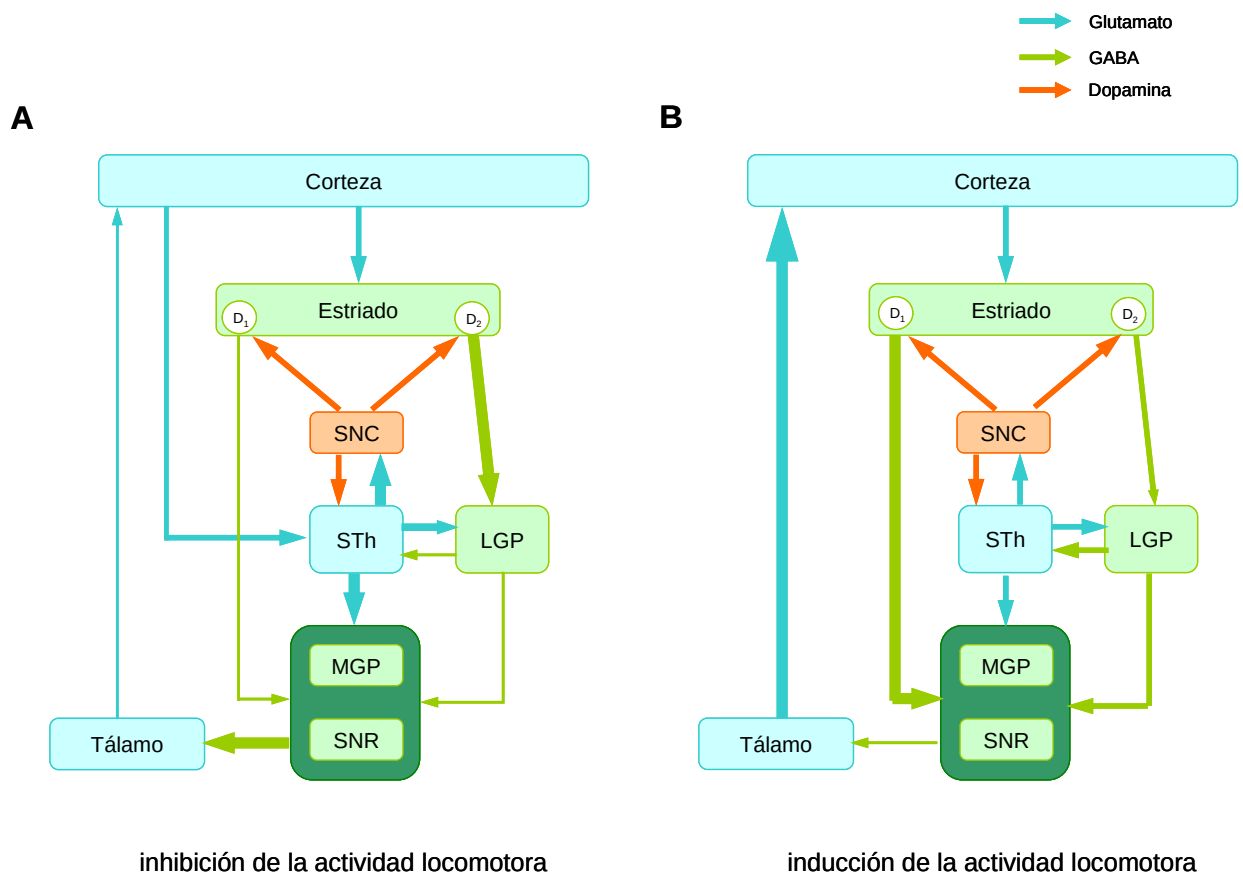


Figura 103. Diagrama esquemático que representa el modelo que explica el mecanismo de regulación de la actividad locomotora por los ganglios basales. El grosor relativo de las flechas indica el grado de activación de la vía de transmisión (Modificado de Smith *et al.*, 1998).

Abreviaturas: LGP, globo pálido lateral; MGP, globo pálido medial; SNC, sustancia negra compacta; SNR, sustancia negra reticular; STh, núcleo subtalámico

Jimenez-Castellanos y Graybiel, 1987, 1989), de manera que controlan de forma crítica la neurotransmisión dopaminérgica mediante la vía nigroestriatal.

El sistema dopaminérgico juega un papel importante en la regulación de la actividad motora y por tanto en la mediación de las respuestas comportamentales de distintas drogas de abuso (Nazco et al., 2005; Koob, 1996; Uhl et al., 1998). Las vías dopaminérgicas mesolímbica y nigroestriatal que proyectan hacia el Acb y CPu juegan un papel importante en la mediación de los efectos locomotores de la morfina (Wise y Bozarth, 1987).

En este trabajo se ha mostrado que la administración aguda de morfina induce un incremento de la actividad locomotora en los ratones como ya han establecido anteriormente otros autores (Belknap et al., 1998; Cadoni et al., 2000; Coudereau et al., 1996; Kuribara, 1995; Murphy et al., 2001). El análisis de la locomoción en intervalos de tiempo indicó que la locomoción aumenta de forma paulatina a lo largo de 30 minutos. Existen varios trabajos que muestran que una misma dosis de morfina en ratones provoca un incremento de la locomoción y un aumento de la liberación de dopamina en el Acb por la vía mesolímbica (Bassareo et al., 1996; Di Chiara e Imperato, 1988a,b, 1995; Murphy et al., 2001; Pontieri et al., 1995) y en menor medida en el CPu (Di Chiara e Imperato, 1988a,b). Sin embargo, no se puede descartar que mecanismos no dependiente de la dopamina pueden estar implicados en la expresión de la hiperactividad locomotora inducida por sustancias opiáceas (Kalivas et al., 1983; Murphy et al., 2001).

También se ha mostrado que la activación de los receptores D₄ no modifica la locomoción de los ratones. Sin embargo, la activación previa de los receptores D₄ bloquea el incremento de la actividad locomotora inducida por morfina.

Estudios realizados en ratones neonatales lesionados con la neurotoxina 6-OHDA muestran hiperactividad, efecto que la administración de antagonistas de los

receptores D₄ (CP-293,019 L-745,870, U-101,958) atenúa (Zhang et al., 2001; Zhang et al., 2002a,b), al igual que los animales deficientes en este receptor dopaminérgico y lesionados, que tampoco la presentan (Avalle et al., 2004). Por tanto, estos receptores dopaminérgicos deben estar involucrados en la regulación de la actividad motora.

Esta reducción de la locomoción puede deberse a la potenciación de la vía estriatopalidal o a la inhibición de la vía estriatonigral. Aunque los receptores D₄ se expresan en las neuronas estriatonigrales y estriatopalidales del CPu, su activación debe provocar mayores cambios en las neuronas que proyectan hacia el GP como se ha observado en las ratas y ejercen un mayor control de la vía estriatopalidal. Sería necesario realizar un estudio en ratones para conocer los cambios producidos por la administración de PD168,077 y morfina en los niveles de expresión de encefalina y dinorfina y en la tasa de liberación de dopamina en el CPu y explicar de forma más clara el origen de los efectos sobre la locomoción obtenidos en este trabajo.

Varios trabajos han sugerido que los receptores D₄ están implicados en la expresión de la hiperactividad locomotora inducida por el consumo agudo de etanol (Drago et al., 1998; Robinson y Berridge, 1993; Thrasher et al., 1999) cocaína y anfetaminas (Katz et al., 2003; Kruzich et al., 2004; Robinson y Berridge, 1993), por lo que nuestros resultados son una evidencia más de que estos receptores dopaminérgicos están implicados en el proceso de drogadicción.

La exposición repetida a las drogas provoca un incremento progresivo de la respuesta comportamental a la droga, manifestándose como un incremento de la activación locomotora o un aumento de perseveración motora (estereotipias), fenómeno conocido como sensibilización (Bartoletti et al., 1983; Canales y Gaybiel, 2000; Pierce y Kalivas, 1997; Post y Rose, 1976; Robinson y Becker, 1986; Shuster et al., 1975; Stewart y Badiani, 1993;

Vanderschuren y Kalivas, 2000). Aunque existen pocos trabajos, se ha sugerido que los receptores D_4 no están implicados en la aparición de la sensibilización tras la administración crónica de anfetaminas y alcohol (Eravci *et al.*, 1997; Quadros *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2000). Sin embargo, las observaciones de Feldpausch y colaboradores (1998) sugieren que estos receptores dopaminérgicos sí están implicados en la sensibilización conductual inducida por morfina.

Serían necesarios más estudios para conocer el papel de los receptores D_4 en la regulación de la actividad locomotora inducida por distintas drogas y en la aparición de estereotipias motoras (una o varias secuencias de movimientos con carácter reiterativo e inconclusos por lo que no constituyen una acción específica), o cognitivas (reiteración insistente de pensamientos, acompañada de un déficit de atención y rigidez de ideas).

7. Papel de los Receptores Dopaminérgicos D_4 en el Desarrollo de la Drogadicción

Aunque se ha asociado al sistema dopaminérgico con enfermedades en las que existe un déficit en el control de la actividad motora como es la enfermedad de Parkinson, actualmente también se le ha vinculado con multitud de desórdenes: esquizofrenia, trastorno por déficit de atención e hiperactividad, adicción (Tarazi *et al.*, 2004).

Estudios genéticos de polimorfismos han indicado que el receptor dopaminérgico D_4 está asociado al ADHA (Benjamin *et al.*, 1996; Carrasco *et al.*, 2006; Ebstein *et al.*, 1996; Faraone *et al.*, 2000, 2001; Grady *et al.*, 2003; LaHoste *et al.*, 1996; Rowe *et al.*, 1998; Swanson *et al.*, 1998), que se caracteriza por problemas en el control de la atención, impulsividad e hiperactividad (Faraone *et al.*, 2000; Searight *et al.*, 2000; Wender *et al.*, 2001). Se ha estudiado la implicación de los sistemas noradrenérgico

(Biederman y Spencer, 1999), dopaminérgico (Solanto, 2002) y serotoninérgico (Spivak *et al.*, 1999), pero ninguno de ellos explica totalmente las alteraciones que se producen.

Además, varios autores han vinculado al ADHD con el riesgo de iniciar el consumo de drogas (Davids y Gastpar, 2003; Ponce *et al.*, 2000). Las características neurológicas y de personalidad (búsqueda de sensaciones, novedad y riesgo) que confiere este síndrome podría predisponer al individuo a tener comportamientos motores, motivacionales y de atención que configuran su personalidad de tal manera que los hace proclives al consumo de sustancias adictivas (Franques *et al.*, 2003; Le Bon *et al.*, 2004). Nadal y colaboradores (2005) desarrollaron un estudio en el que relacionan el desarrollo de condicionamiento de lugar a la morfina con la tendencia a explorar y la búsqueda de sensaciones nuevas de manera continuada sin que intervengan otros factores como la ansiedad por la novedad. Por tanto, la tendencia a explorar y buscar la novedad podría indicar una cierta predisposición a la adicción (Stansfield y Kirstein, 2006). De acuerdo con esto, los resultados de Dulawa y colaboradores (1999) muestran que ratones deficientes para el receptor D_4 tienen una menor actividad exploratoria.

Debido a la alta expresión de los receptores D_4 en las neuronas localizadas en los estriosomes (Rivera *et al.*, 2002a), este subtipo de receptor dopaminérgico también podría estar involucrado en la regulación de la transmisión corticoestriatal, en aprendizaje motor asociado a recompensas, y en la búsqueda de la novedad.

Los resultados expuestos en este trabajo indican por primera vez que los receptores D_4 juegan un papel importante en la regulación de los efectos agudos de la morfina y constituyen el inicio del estudio del mecanismo de interacción entre estos receptores dopaminérgicos y los receptores MOR.

Conclusiones

1. La administración aguda de morfina produce un incremento transitorio de la expresión de la proteína c-Fos en la región dorso-medial del caudado putamen pero no modifica los niveles de ARNm. Además, la morfina induce la expresión de las proteínas Fos B y Δ Fos B a las 4 horas y disminuye la de p-CREB a los 30 minutos en todo el caudado putamen.
2. La administración aguda de PD168,077 también incrementa de manera rápida y transitoria la expresión de la proteína c-Fos y no modifica los niveles de ARNm. Este agonista dopaminérgico incrementa la expresión de las proteínas Fos B y Δ Fos B pero no altera los niveles de la proteína p-CREB a lo largo del caudado putamen.
3. Durante las dos primeras horas, la activación de los receptores dopaminérgicos D_4 bloquea el efecto que tiene la morfina sobre la expresión de las proteínas c-Fos y p-CREB.
4. A partir de las dos horas, la activación de los receptores dopaminérgicos D_4 y opioides tipo μ induce la expresión del ARNm y de la proteína c-Fos.
5. La morfina disminuye los niveles de ARNm para encefalina y dinorfina en el caudado putamen, mientras que el agonista PD168,077 sólo modula los niveles de ARNm para encefalina. La activación de los receptores D_4 bloquea el efecto de la morfina sobre ambos péptidos opioides.
6. La activación de los receptores D_4 disminuye la densidad de receptores opioides tipo μ en membranas celulares en el caudado putamen, pero no modifica su afinidad.
7. La administración de PD168,077 no altera la actividad locomotora en ratón, pero sí reduce la hiperlocomoción inducida por morfina.
8. Los resultados obtenidos en este trabajo demuestran por primera vez que los receptores dopaminérgicos D_4 interaccionan en el caudado putamen con los receptores opioides tipo μ , sugiriendo que este receptor dopaminérgico podría jugar un papel crítico en la fase inicial del consumo de morfina.

Bibliografía

- Abraham KE, Brewer KL (2001) Expression of c-fos mRNA is increased and related to dynorphin mRNA expression following excitotoxic spinal cord injury in the rat. *Neurosci Lett* 307(3):187-91.
- Acquas E, Carboni E, Di Chiara G (1991) Profound depression of mesolimbic dopamine release after morphine withdrawal in dependent rats. *Eur J Pharmacol* 193(1):133-4.
- Acquas E, Di Chiara G (1992) Depression of mesolimbic dopamine transmission and sensitization to morphine during opiate abstinence. *J Neurochem* 58(5):1620-5.
- Adams JP, Sweatt JD (2002) Molecular psychology: roles for the ERK MAP kinase cascade in memory. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 42:135-63.
- Adams DH, Hanson GR, K.A. Keefe (2003) Distinct effects of methamphetamine and cocaine on preprodynorphin messenger RNA in rat striatal patch and matrix. *J Neurochem* 84:87-93.
- Aghajanian GK, Wang YY (1986) Pertussis toxin blocks the outward currents evoked by opiate and alpha 2-agonists in locus coeruleus neurons. *Brain Res* 371(2):390-4.
- Agnati LF, Fuxe K, Zini I, Lenzi P, Hokfelt T (1980) Aspects on receptor regulation and isoreceptor identification. *Med Biol* 58(4):182-7.
- Airavaara M, Mijatovic J, Vihavainen T, Piepponen TP, Saarma M, Ahtee L (2006) In heterozygous GDNF knockout mice the response of striatal dopaminergic system to acute morphine is altered. *Synapse* 59(6):321-9.
- Aiso M, Shigematsu K, Kebabian JW, Potter WZ, Cruciani RA, Saavedra JM (1987) Dopamine D1 receptor in rat brain: a quantitative autoradiographic study with ¹²⁵I-SCH 23982. *Brain Res* 408(1-2):281-5.
- Akil H, Watson SJ, Young E, Lewis ME, Khachaturian H, Walker JM (1984) Endogenous opioids: biology and function. *Annu Rev Neurosci* 7:223-55.
- Albin RL, Young AB, Penney JB (1989) The functional anatomy of basal ganglia disorders. *Trends Neurosci* 12(10):366-75.
- Albin, RL, Makowiec RL, Hollingsworth ZR, Dure IV LS, Penney JB, Young AB (1992) Excitatory amino acid binding sites in the basal ganglia of the rat: A quantitative autoradiographic study. *Neuroscience* 46:35-48.
- Alexander GE, Crutcher MD, DeLong MR (1990) Basal ganglia-thalamocortical circuits: parallel substrates for motor, oculomotor, "prefrontal" and "limbic" functions. *Prog Brain Res* 85:119-46.
- Alvarez Y, Farre M (2005) Farmacología de los opioides. Adicciones. Monografía opiáceos 17(2):21-40.
- Andersen SL, LeBlanc CJ, Lyss PJ (2001) Maturation increases in c-fos expression in the ascending dopamine systems. *Synapse* 41(4):345-50.
- Angers S, Salahpour A, Bouvier M (2002) Dimerization: an emerging concept for G protein-coupled receptor ontogeny and function. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 42:409-35.
- Angulo JA, McEwen BS (1994) Molecular aspects of neuropeptide regulation and function in the corpus striatum and nucleus accumbens. *Brain Res Rev* 19(1):1-28.
- Anton B, Fein J, To T, Li X, Silberstein L, Evans CJ (1996) Immunohistochemical localization of ORL-1 in the central nervous system of the rat. *J Comp Neurol* 368(2):229-51.
- Arden JR, Segredo V, Wang Z, Lameh J, Sadee W (1995) Phosphorylation and agonist-specific intracellular trafficking of an epitope-tagged mu-opioid receptor expressed in HEK 293 cells. *J Neurochem* 65(4):1636-45.
- Ariano MA, Wang J, Noblett KL, Larson ER, Sibley DR (1997a) Cellular distribution of the rat D4 dopamine receptor protein in the CNS using anti-receptor antisera. *Brain Res* 752(1-2):26-34.
- Ariano MA, Wang J, Noblett KL, Larson ER, Sibley DR (1997b) Cellular distribution of the rat D1B receptor in central nervous system using anti-receptor antisera. *Brain Res* 746(1-2):141-50.
- Arvidsson U, Riedl M, Chakrabarti S, Lee JH, Nakano AH, Dado RJ, Loh HH, Law PY, Wessendorf MW, Elde R (1995) Distribution and targeting of a mu-opioid receptor (MOR1) in brain and spinal cord. *J Neurosci* 15(5 Pt 1):3328-41.
- Azaryan AV, Clock BJ, Rosenberger JG, Cox BM (1998) Transient upregulation of mu opioid receptor mRNA levels in nucleus accumbens during chronic cocaine administration. *Can J Physiol Pharmacol* 76(3):278-83.
- Atkins JB, Chlan-Fourney J, Nye HE, Hiroi N, Carlezon WA Jr, Nestler EJ (1999) Region-specific induction of deltaFosB by repeated administration of typical versus atypical antipsychotic drugs. *Synapse* 33(2):118-28.

- Avale ME, Falzone TL, Gelman DM, Low MJ, Grandy DK, Rubinstein M (2004) The dopamine D4 receptor is essential for hyperactivity and impaired behavioral inhibition in a mouse model of attention deficit/hyperactivity disorder. *Mol Psychiatry* 9(7):718-26.
- Barber JR, Verma IM (1987) Modification of fos proteins: phosphorylation of c-fos, but not v-fos, is stimulated by 12-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate and serum. *Mol Cell Biol* 7(6):2201-11.
- Barrot M, Olivier JDA, Zachariou V, Neve RL, Nestler EJ (2000) Influence of CREB in the nucleus accumbens shell on the sensitivity to aversive and nociceptive stimuli. *Soc Neurosci Abstr* 26:485.
- Bassareo V, Tanda G, Petromilli P, Giua C, Di Chiara G (1996) Non-psychostimulant drugs of abuse and anxiogenic drugs activate with differential selectivity dopamine transmission in the nucleus accumbens and in the medial prefrontal cortex of the rat. *Psychopharmacology (Berl)* 124(4):293-9.
- 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(10):1193-6.
- Bayer SA (1990) Neurogenetic patterns in the medial limbic cortex of the rat related to anatomical connections with the thalamus and striatum. *Exp Neurol* 107(2):132-42.
- Beaulieu JM (2005) Morphine-induced mu-opioid receptor internalization: a paradox solved in neurons. *J Neurosci* 25(44):10061-3.
- Becker A, Grecksch G, Brodemann R, Kraus J, Peters B, Schroeder H, Thiemann W, Loh HH, Holt V (2000) Morphine self-administration in mu-opioid receptor-deficient mice. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 361(6):584-9.
- Beckstead RM, Kersey KS (1985) Immunohistochemical demonstration of differential substance P-, met-enkephalin-, and glutamic-acid-decarboxylase-containing cell body and axon distributions in the corpus striatum of the cat. *J Comp Neurol* 232(4):481-98.
- Beitner DB, Duman RS, Nestler EJ (1989) A novel action of morphine in the rat locus coeruleus: persistent decrease in adenylate cyclase. *Mol Pharmacol* 35(5):559-64.
- Beitner-Johnson D, Guitart X, Nestler EJ (1992) Neurofilament proteins and the mesolimbic dopamine system: common regulation by chronic morphine and chronic cocaine in the rat ventral tegmental area. *J Neurosci* 12(6):2165-76.
- Belcheva MM, Vogel Z, Ignatova E, Avidor-Reiss T, Zippel R, Levy R, Young EC, Barg J, Coscia CJ (1998) Opioid modulation of extracellular signal-regulated protein kinase activity is ras-dependent and involves Gbetagamma subunits. *J Neurochem* 70(2):635-45.
- Belknap JK, Noordewier B, Lame M (1989) Genetic dissociation of multiple morphine effects among C57BL/6J, DBA/2J and C3H/HeJ inbred mouse strains. *Physiol Behav* 46(1):69-74.
- Belknap JK, Riggan J, Cross S, Young ER, Gallaher EJ, Crabbe JC (1998) Genetic determinants of morphine activity and thermal responses in 15 inbred mouse strains. *Pharmacol Biochem Behav* 59(2):353-60.
- Benjamin J, Li L, Patterson C, Greenberg BD, Murphy DL, Hamer DH (1996) Population and familial association between the D4 dopamine receptor gene and measures of Novelty Seeking. *Nat Genet* 12(1):81-4.
- Berendse HW, Galis-de Graaf Y, Groenewegen HJ (1992) Topographical organization and relationship with ventral striatal compartments of prefrontal corticostriatal projections in the rat. *J Comp Neurol* 316(3):314-47.
- Berger MA, Defagot MC, Villar MJ, Antonelli MC (2001) D4 dopamine and metabotropic glutamate receptors in cerebral cortex and striatum in rat brain. *Neurochem Res* 26(4):345-52.
- 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(15):4707-15.
- Berke JD, Paletzki RF, Aronson GJ, Hyman SE, Gerfen CR (1998) A complex program of striatal gene expression induced by dopaminergic stimulation. *J Neurosci* 18(14):5301-10.
- Berke JD, Hyman SE (2000) Addiction, dopamine, and the molecular mechanisms of memory. *Neuron* 25(3):515-32.
- Berkowitz LA, Riabowol KT, Gilman MZ (1989) Multiple sequence elements of a single functional class are required for cyclic AMP responsiveness of the mouse c-fos promoter. *Mol Cell Biol* 9(10):4272-81.
- Bernaerts P, Tirelli E (2003) Facilitatory effect of the dopamine D4 receptor agonist PD168,077

- on memory consolidation of an inhibitory avoidance learned response in C57BL/6J mice. *Behav Brain Res* 142(1-2):41-52.
- Berridge MJ (1997) Elementary and global aspects of calcium signalling. *J Exp Biol* 200(Pt 2):315-9.
- Beaulieu JM (2005) Morphine-induced mu-opioid receptor internalization: a paradox solved in neurons. *J Neurosci* 25(44):10061-3.
- Bhargava HN, Villar VM, Rahmani NH, Larsen AK (1992) Time course of the distribution of morphine in brain regions and spinal cord after intravenous injection to spontaneously hypertensive and normotensive Wistar-Kyoto rats. *J Pharmacol Exp Ther* 261(3):1008-14.
- Biederman J, Spencer T (1999) Attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD) as a noradrenergic disorder. *Biol Psychiatry* 46(9):1234-42.
- Bilecki W, Przewlocki R (2000) Effect of opioids on Ca²⁺/cAMP responsive element binding protein. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* 60(4):557-67.
- Bilecki W, Wawrzczak-Bargiela A, Przewlocki R (2004) Activation of AP-1 and CRE-dependent gene expression via mu-opioid receptor. *J Neurochem* 90(4):874-82.
- Bilecki W, Zapart G, Ligeza A, Wawrzczak-Bargiela A, Urbanski MJ, Przewlocki R (2005) Regulation of the extracellular signal-regulated kinases following acute and chronic opioid treatment. *Cell Mol Life Sci* 62(19-20):2369-75.
- Binetruy B, Smeal T, Karin M (1991) Ha-Ras augments c-Jun activity and stimulates phosphorylation of its activation domain. *Nature* 351(6322):122-7.
- Blendy JA, Maldonado R (1998) Genetic analysis of drug addiction: the role of cAMP response element binding protein. *J Mol Med* 76(2):104-10.
- Bloodworth D (2005) Issues in opioid management. *Am J Phys Med Rehabil* 84(3 Suppl):S42-55.
- Bodnar RJ, Klein GE (2005) Endogenous opiates and behaviour: 2004. *Peptides* 26(12):2629-711.
- Bohmann D, Bos TJ, Admon A, Nishimura T, Vogt PK, Tjian R (1987) Human proto-oncogene c-jun encodes a DNA binding protein with structural and functional properties of transcription factor AP-1. *Science* 238(4832):1386-92.
- Bohn LM, Lefkowitz RJ, Gainetdinov RR, Peppel K, Caron MG, Lin FT (1999) Enhanced morphine analgesia in mice lacking beta-arrestin 2. *Science* 286(5449):2495-8.
- 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(6813):720-3.
- Bolam JP, Hanley JJ, Booth PA, Bevan MD (2000) Synaptic organisation of the basal ganglia. *J Anat* 196 (Pt 4):527-42.
- Bontempi B, Sharp FR (1997) Systemic morphine-induced Fos protein in the rat striatum and nucleus accumbens is regulated by mu opioid receptors in the substantia nigra and ventral tegmental area. *J Neurosci* 17(21):8596-612.
- Borgkvist A, Fisone G (2007) Psychoactive drugs and regulation of the cAMP/PKA/DARPP-32 cascade in striatal medium spiny neurons. *Neurosci Biobehav Rev* 31(1):79-88.
- Borgland SL, Connor M, Osborne PB, Furness JB, Christie MJ (2003) Opioid agonists have different efficacy profiles for G protein activation, rapid desensitization, and endocytosis of mu-opioid receptors. *J Biol Chem* 278(21):18776-84.
- Boronat MA, Olmos G, Garcia-Sevilla JA (1998) Attenuation of tolerance to opioid-induced antinociception and protection against morphine-induced decrease of neurofilament proteins by idazoxan and other I2-imidazoline ligands. *Br J Pharmacol* 125(1):175-85.
- Bouthenet ML, Souil E, Martres MP, Sokoloff P, Giros B, Schwartz JC (1991) Localization of dopamine D3 receptor mRNA in the rat brain using in situ hybridization histochemistry: comparison with dopamine D2 receptor mRNA. *Brain Res* 564(2):203-19.
- Bouvier M (2001) Oligomerization of G-protein-coupled transmitter receptors. *Nat Rev Neurosci* 2(4):274-86.
- Boyle WJ, Smeal T, Defize LH, Angel P, Woodgett JR, Karin M, Hunter T (1991) Activation of protein kinase C decreases phosphorylation of c-Jun at sites that negatively regulate its DNA-binding activity. *Cell* 64(3):573-84.
- Brase DA, Loh HH, Way EL (1977) Comparison of the effects of morphine on locomotor activity, analgesia and primary and protracted physical dependence in six mouse strains. *J Pharmacol Exp Ther* 201(2):368-74.

- Breuer O, Lawhorn C, Miller T, Smith DM, Brown LL (2005) Functional architecture of the mammalian striatum: mouse vascular and striosome organization and their anatomic relationships. *Neurosci Lett* 385(3):198-203.
- Bristow LJ, Collinson N, Cook GP, Curtis N, Freedman SB, Kulagowski JJ, Leeson PD, Patel S, Ragan CI, Ridgill M, Saywell KL, Tricklebank MD (1997) L-745,870, a subtype selective dopamine D4 receptor antagonist, does not exhibit a neuroleptic-like profile in rodent behavioral tests. *J Pharmacol Exp Ther* 283(3):1256-63.
- Bronstein DM, Ye H, Pennypacker KR, Hudson PM, Hong JS (1994) Role of a 35 kDa fos-related antigen (FRA) in the long-term induction of striatal dynorphin expression in the 6-hydroxydopamine lesioned rat. *Mol Brain Res* 23(3):191-203.
- Browman KE, Curzon P, Pan JB, Molesky AL, Komater VA, Decker MW, Brioni JD, Moreland RB, Fox GB (2005) A-412997, a selective dopamine D4 agonist, improves cognitive performance in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 82(1):148-55.
- Brown LL, Smith DM, Goldbloom LM (1998) Organizing principles of cortical integration in the rat neostriatum: corticostriate map of the body surface is an ordered lattice of curved laminae and radial points. *J Comp Neurol* 392(4):468-88.
- Brown LL, Feldman SM, Smith DM, Cavanaugh JR, Ackermann RF, Graybiel AM (2002) Differential metabolic activity in the striosome and matrix compartments of the rat striatum during natural behaviors. *J Neurosci* 22(1):305-14.
- Brownstein MJ, Mroz EA, Tappaz ML, Leeman SE (1977) On the origin of substance P and glutamic acid decarboxylase (GAD) in the substantia nigra. *Brain Res* 135(2):315-23.
- Bunzow JR, Saez C, Mortrud M, Bouvier C, Williams JT, Low M, Grandy DK (1994) Molecular cloning and tissue distribution of a putative member of the rat opioid receptor gene family that is not a mu, delta or kappa opioid receptor type. *FEBS Lett* 347(2-3):284-8.
- Busch SJ, Sassone-Corsi P (1990) Fos, Jun and CREB basic-domain peptides have intrinsic DNA-binding activity enhanced by a novel stabilizing factor. *Oncogene* 5(10):1549-56.
- Cadoni C, Solinas M, Di Chiara G (2000) Psychostimulant sensitization: differential changes in accumbal shell and core dopamine. *Eur J Pharmacol* 388(1):69-76.
- Cambi F, Fung B, Chikaraishi D (1989) 5' flanking DNA sequences direct cell-specific expression of rat tyrosine hydroxylase. *J Neurochem* 53(5):1656-9.
- Canales JJ, Graybiel AM (2000) Patterns of gene expression and behavior induced by chronic dopamine treatments. *Ann Neurol* 47(4 Suppl 1):S53-9.
- Canales JJ (2005) Stimulant-induced adaptations in neostriatal matrix and striosome systems: transiting from instrumental responding to habitual behavior in drug addiction. *Neurobiol Learn Mem* 83(2):93-103.
- Capper-Loup C, Canales JJ, Kadaba N, Graybiel AM (2002) Concurrent activation of dopamine D1 and D2 receptors is required to evoke neural and behavioral phenotypes of cocaine sensitization. *J Neurosci* 22(14):6218-27.
- Cardinal RN, Everitt BJ (2004) Neural and psychological mechanisms underlying appetitive learning: links to drug addiction. *Curr Opin Neurobiol* 14(2):156-62.
- Cardinal RN, Winstanley CA, Robbins TW, Everitt BJ (2004) Limbic corticostriatal systems and delayed reinforcement. *Ann NY Acad Sci* 1021:33-50.
- Carlezon WA Jr, Boundy VA, Haile CN, Lane SB, Kalb RG, Neve RL, Nestler EJ (1997) Sensitization to morphine induced by viral-mediated gene transfer. *Science* 277(5327):812-4.
- Carlezon WA Jr, Thome J, Olson VG, Lane-Ladd SB, Brodtkin ES, Hiroi N, Duman RS, Neve RL, Nestler EJ (1998) Regulation of cocaine reward by CREB. *Science* 282(5397):2272-5.
- Carrasco X, Rothhammer P, Moraga M, Henriquez H, Chakraborty R, Abolitz F, Rothhammer F (2006) Genotypic interaction between DRD4 and DAT1 loci is a high risk factor for attention-deficit/hyperactivity disorder in Chilean families. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 141(1):51-4.
- Carter CJ (1982) Topographical distribution of possible glutamatergic pathways from the frontal cortex to the striatum and substantia nigra in rats. *Neuropharmacology* 21(5):379-83.
- Cavas M, Navarro JF (2006) Effects of selective dopamine D4 receptor antagonist, L-741,741, on sleep and wakefulness in the rat. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 30(4):668-78.
- Cenci MA, Campbell K, Wictorin K, Bjorklund A (1992) Striatal c-fos induction by cocaine or apomorphine occurs preferentially in output

- neurons projecting to the substantia nigra in the rat. *Eur J Neurosci* 4(4):376-80.
- Cesselin F (1995) Opioid and anti-opioid peptides. *Fundam Clin Pharmacol* 9(5):409-33.
- Chang SL, Squinto SP, Harlan RE (1988) Morphine activation of c-fos expression in rat brain. *Biochem Biophys Res Commun* 157(2):698-704.
- Chang L, Karin M (2001) Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature* 410(6824):37-40.
- Chao J, Nestler EJ (2004) Molecular neurobiology of drug addiction. *Annu Rev Med* 55:113-32.
- Chartoff EH, Mague SD, Barhight MF, Smith AM, Carlezon WA Jr (2006) Behavioral and molecular effects of dopamine D1 receptor stimulation during naloxone-precipitated morphine withdrawal. *J Neurosci* 26(24):6450-7.
- Charuchinda C, Supavilai P, Karobath M, Palacios JM (1987) Dopamine D2 receptors in the rat brain: autoradiographic visualization using a high-affinity selective agonist ligand. *J Neurosci* 7(5):1352-60.
- Chen L, Huang LY (1991) Sustained potentiation of NMDA receptor-mediated glutamate responses through activation of protein kinase C by a mu opioid. *Neuron* 7(2):319-26.
- Chen Y, Mestek A, Liu J, Hurley JA, Yu L (1993) Molecular cloning and functional expression of a mu-opioid receptor from rat brain. *Mol Pharmacol* 44(1):8-12.
- Chen J, Nye HE, Kelz MB, Hiroi N, Nakabeppu Y, Hope BT, Nestler EJ (1995) Regulation of delta FosB and FosB-like proteins by electroconvulsive seizure and cocaine treatments. *Mol Pharmacol* 48 (5):880-9.
- Chen J, Kelz MB, Hope BT, Nakabeppu Y, Nestler EJ (1997) Chronic Fos-related antigens: stable variants of deltaFosB induced in brain by chronic treatments. *J Neurosci* 17(13):4933-41.
- Chen LE, Gao C, Chen J, Xu XJ, Zhou DH, Chi ZQ (2003) Internalization and recycling of human mu opioid receptors expressed in Sf9 insect cells. *Life Sci* 73(1):115-28.
- Childers SR (1991) Opioid receptor-coupled second messenger systems. *Life Sci* 48(21):1991-2003.
- Chiu R, Boyle WJ, Meek J, Smeal T, Hunter T, Karin M (1988) The c-Fos protein interacts with c-Jun/AP-1 to stimulate transcription of AP-1 responsive genes. *Cell* 54(4):541-52.
- Cho DI, Beom S, Van Tol HH, Caron MG, Kim KM (2006) Characterization of the desensitization properties of five dopamine receptor subtypes and alternatively spliced variants of dopamine D2 and D4 receptors. *Biochem Biophys Res Commun* 350(3):634-40.
- Ciliax BJ, Nash N, Heilman C, Sunahara R, Hartney A, Tiberi M, Rye DB, Caron MG, Niznik HB, Levey AI (2000) Dopamine D(5) receptor immunolocalization in rat and monkey brain. *Synapse* 37(2):125-45.
- Claing A, Laporte SA, Caron MG, Lefkowitz RJ (2002) Endocytosis of G protein-coupled receptors: roles of G protein-coupled receptor kinases and beta-arrestin proteins. *Prog Neurobiol* 66(2):61-79.
- Clifford JJ, Waddington JL (2000) Topographically based search for an "Ethogram" among a series of novel D(4) dopamine receptor agonists and antagonists. *Neuropsychopharmacology* 22(5):538-44.
- Cobb MH (1999) MAP kinase pathways. *Prog Biophys Mol Biol* 71(3-4):479-500.
- Cochran BH (1993) Regulation of immediate early gene expression. *NIDA Res Monogr* 125:3-24.
- Cohen DR, Curran T (1988) Fra-1: a serum-inducible, cellular immediate-early gene that encodes a fos-related antigen. *Mol Cell Biol* 8(5):2063-9.
- Cole DG, Kobierski LA, Konradi C, Hyman SE (1994) 6-Hydroxydopamine lesions of rat substantia nigra up-regulate dopamine-induced phosphorylation of the cAMP-response element-binding protein in striatal neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 91(20):9631-5.
- Cole RL, Konradi C, Douglass J, Hyman SE (1995) Neuronal adaptation to amphetamine and dopamine: molecular mechanisms of prodynorphin gene regulation in rat striatum. *Neuron* 14(4):813-23.
- Colombo PJ, Brightwell JJ, Countryman RA (2003) Cognitive strategy-specific increases in phosphorylated cAMP response element-binding protein and c-Fos in the hippocampus and dorsal striatum. *J Neurosci* 23(8):3547-54.
- Connor M, and Henderson G (1996) Delta- and mu-opioid receptor mobilization of intracellular calcium in SH-SY5Y human neuroblastoma cells. *Br J Pharmacol* 117: 333-40.
- Cook DF, Wirtshafter D (1998) Quinpirole attenuates striatal c-fos induction by 5-HT,

- opioid and muscarinic receptor agonists. *Eur J Pharmacol* 349(1):41-7.
- Couceyro P, Pollock KM, Drews K, Douglass J (1994) Cocaine differentially regulates activator protein-1 mRNA levels and DNA-binding complexes in the rat striatum and cerebellum. *Mol Pharmacol* 46(4):667-76.
- Coudereau JP, Debray M, Monier C, Bourre JM, Frances H (1996) Effect of isolation on morphine-induced running and changes in body temperature. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 20(5):827-38.
- Courtney SM, Petit L, Maisog JM, Ungerleider LG, Haxby JV (1998) An area specialized for spatial working memory in human frontal cortex. *Science* 279(5355):1347-51.
- Crippens D, Robinson TE (1994) Withdrawal from morphine or amphetamine: different effects on dopamine in the ventral-medial striatum studied with microdialysis. *Brain Res* 650(1):56-62.
- Cromwell HC, Berridge KC (1996) Implementation of action sequences by a neostriatal site: a lesion mapping study of grooming syntax. *J Neurosci* 16(10):3444-58.
- Crump FT, Dillman KS, Craig AM (2001) cAMP-dependent protein kinase mediates activity-regulated synaptic targeting of NMDA receptors. *J Neurosci* 21(14):5079-88.
- Cuello AC, Paxinos G (1978) Evidence for a long Leu-enkephalin striopallidal pathway in rat brain. *Nature* 271(5641):178-80.
- Curran T, Gordon MB, Rubino KL, Sambucetti LC (1987) Isolation and characterization of the c-fos(rat) cDNA and analysis of post-translational modification in vitro. *Oncogene* 2(1):79-84.
- Curran EJ, Watson SJ Jr (1995) Dopamine receptor mRNA expression patterns by opioid peptide cells in the nucleus accumbens of the rat: a double in situ hybridization study. *J Comp Neurol* 361(1):57-76.
- Curran EJ, Akil H, Watson SJ (1996) Psychomotor stimulant- and opiate-induced c-fos mRNA expression patterns in the rat forebrain: comparisons between acute drug treatment and a drug challenge in sensitized animals. *Neurochem Res* 21(11):1425-35.
- Dash PK, Hochner B, Kandel ER (1990) Injection of the cAMP-responsive element into the nucleus of Aplysia sensory neurons blocks long-term facilitation. *Nature* 345(6277):718-21.
- Daunais JB, J.F. McGinty JF (1994) Acute and chronic cocaine administration differentially alters striatal opioid and nuclear transcription factor mRNAs. *Synapse* 18:34-45.
- Daunais JB, McGinty JF (1995) Cocaine binges differentially alter striatal preprodynorphin and zif/268 mRNAs. *Mol Brain Res* 29(2):201-10.
- Daunais JB, Roberts DC, McGinty JF (1995) Short-term cocaine self administration alters striatal gene expression. *Brain Res Bull* 37(5):523-7.
- Daunais JB, Letchworth SR, Sim-Selley LJ, Smith HR, Childers SR, Porrino LJ (2001) Functional and anatomical localization of mu opioid receptors in the striatum, amygdala, and extended amygdala of the nonhuman primate. *J Comp Neurol* 433(4):471-85.
- Davids E, Gastpar M (2003). Attention-deficit/hyperactivity disorder and substance abuse. *Psychiatr Prax* 30(4):182-6.
- Davis S, Vanhoutte P, Pages C, Caboche J, Laroche S (2000) The MAPK/ERK cascade targets both Elk-1 and cAMP response element-binding protein to control long-term potentiation-dependent gene expression in the dentate gyrus in vivo. *J Neurosci* 20(12):4563-72.
- De Cesare D, Fimia GM, Sassone-Corsi P (1999) Signaling routes to CREM and CREB: plasticity in transcriptional activation. *Trends Biochem Sci* 24(7):281-5.
- Defagot MC, Antonelli MC (1997a) Autoradiographic localization of the putative D4 dopamine receptor in rat brain. *Neurochem Res* 22(4):401-7.
- Defagot MC, Malchiodi EL, Villar MJ, Antonelli MC (1997b) Distribution of D₄ dopamine receptor in rat brain with sequence-specific antibodies. *Mol Brain Res* 45(1):1-12.
- Defagot MC, Falzone TL, Low MJ, Grandy DK, Rubinstein M, Antonelli MC (2000) Quantitative analysis of the dopamine D4 receptor in the mouse brain. *J Neurosci Res* 59(2):202-8.
- Delfs JM, Yu L, Ellison GD, Reisine T, Chesselet MF (1994) Regulation of mu-opioid receptor mRNA in rat globus pallidus: effects of enkephalin increases induced by short- and long-term haloperidol administration. *J Neurochem* 63:777-80.
- DeLong MR (1990) Primate models of movement disorders of basal ganglia origin. *Trends Neurosci* 13(7):281-5.

- DePaoli AM, Hurley KM, Yasada K, Reisine T, Bell G (1994) Distribution of kappa opioid receptor mRNA in adult mouse brain: an in situ hybridization histochemistry study. *Mol Cell Neurosci* 5(4):327-35.
- Desban M, Gauchy C, Kemel ML, Besson MJ, Glowinski J (1989) Three-dimensional organization of the striosomal compartment and patchy distribution of striatonigral projections in the matrix of the cat caudate nucleus. *Neuroscience* 29(3):551-66.
- Desban M, Kemel ML, Glowinski J, Gauchy C (1993) Spatial organization of patch and matrix compartments in the rat striatum. *Neuroscience* 57(3):661-71.
- Devine DP, Leone P, Wise RA (1993) Mesolimbic dopamine neurotransmission is increased by administration of mu-opioid receptor antagonists. *Eur J Pharmacol* 243(1):55-64.
- De Vries L, Mousli M, Wurmser A, Farquhar MG (1995) GAIP, a protein that specifically interacts with the trimeric G protein G alpha i3, is a member of a protein family with a highly conserved core domain. *Proc Natl Acad Sci USA* 92(25):11916-20.
- De Vries L, Elenko E, Hubler L, Jones TL, Farquhar MG (1996) GAIP is membrane-anchored by palmitoylation and interacts with the activated (GTP-bound) form of G alpha i subunits. *Proc Natl Acad Sci USA* 93(26):15203-8.
- De Vries L, Lou X, Zhao G, Zheng B, Farquhar MG (1998) GIPC, a PDZ domain containing protein, interacts specifically with the C terminus of RGS-GAIP. *Proc Natl Acad Sci USA* 95(21):12340-5.
- De Vries TJ, Shippenberg TS (2002) Neural systems underlying opiate addiction. *J Neurosci* 22(9):3321-5.
- Dewar D, Jenner P, Marsden CD (1985) Behavioural effects in rats of unilateral and bilateral injections of opiate receptor agonists into the globus pallidus. *Neuroscience* 15(1):41-6.
- Diaz J, Levesque D, Lammers CH, Griffon N, Martres MP, Schwartz JC, Sokoloff P (1995) Phenotypical characterization of neurons expressing the dopamine D3 receptor in the rat brain. *Neuroscience* 65(3):731-45.
- Di Benedetto M, D'Addario C, Candeletti S, Romualdi P (2007) Alterations of CREB and DARPP-32 phosphorylation following cocaine and monoaminergic uptake inhibitors. *Brain Res* 1128(1):33-9.
- Di Chiara G, Imperato A (1986) Preferential stimulation of dopamine release in the nucleus accumbens by opiates, alcohol, and barbiturates: studies with transcerebral dialysis in freely moving rats. *Ann NY Acad Sci* 473:367-81.
- Di Chiara G, Imperato A (1988a) Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely moving rats. *Proc Natl Acad Sci USA* 85(14):5274-8.
- Di Chiara G, Imperato A (1988b) Opposite effects of mu and kappa opiate agonists on dopamine release in the nucleus accumbens and in the dorsal caudate of freely moving rats. *J Pharmacol Exp Ther* 244(3):1067-80.
- Di Chiara G, North RA (1992) Neurobiology of opiate abuse. *Trends Pharmacol Sci* 13(5):185-93.
- Di Chiara G (1995) The role of dopamine in drug abuse viewed from the perspective of its role in motivation. *Drug Alcohol Depend* 38(2):95-137.
- Di Chiara G, Tanda G, Bassareo V, Pontieri F, Acquas E, Fenu S, Cadoni C, Carboni E (1999) Drug addiction as a disorder of associative learning. Role of nucleus accumbens shell/extended amygdala dopamine. *Ann NY Acad Sci* 877:461-85.
- Divac I, Kosmal A, Bjorklund A, Lindvall O (1978) Subcortical projections to the prefrontal cortex in the rat as revealed by the horseradish peroxidase technique. *Neuroscience* 3(9):785-96.
- Donoghue JP, Herkenham M (1986) Neostriatal projections from individual cortical fields conform to histochemically distinct striatal compartments in the rat. *Brain Res* 365(2):397-403.
- Doucet JP, Nakabeppu Y, Bedard PJ, Hope BT, Nestler EJ, Jasmin BJ, Chen JS, Iadarola MJ, St-Jean M, Wigle N, Blanchet P, Grondin R, Robertson GS (1996) Chronic alterations in dopaminergic neurotransmission produce a persistent elevation of deltaFosB-like protein(s) in both the rodent and primate striatum. *Eur J Neurosci* 8(2):365-81.
- Douglass J, McMurray CT, Garrett JE, Adelman JP, Calavetta L (1989) Characterization of the rat prodynorphin gene. *Mol Endocrinol* 3(12):2070-8.
- Douglass J, McKinzie AA, Pollock KM (1994) Identification of multiple DNA elements regulating basal and protein kinase A-induced transcriptional expression of the rat prodynorphin gene. *Mol Endocrinol* 8(3):333-44.

- Drago J, Padungchaichot P, Accili D, Fuchs S. (1998) Dopamine receptors and dopamine transporter in brain function and addictive behaviors: insights from targeted mouse mutants. *Dev Neurosci* 20(2-3):188-203.
- Dragunow M, Faull R (1989) The use of c-fos as a metabolic marker in neuronal pathway tracing. *J Neurosci Met* 29:261-5.
- Dragunow M, Williams M, Faull RL (1990) Haloperidol induces Fos and related molecules in intrastriatal grafts derived from fetal striatal primordia. *Brain Res* 530(2):309-11.
- Draisci G, Iadarola MJ (1989) Temporal analysis of increases in c-fos, preprodynorphin and preproenkephalin mRNAs in rat spinal cord. *Mol Brain Res* 6(1):31-7.
- Dubois A, Savasta M, Curet O, Scatton B (1986) Autoradiographic distribution of the D1 agonist [3H]SKF38393, in the rat brain and spinal cord. Comparison with the distribution of D2 dopamine receptors. *Neuroscience* 19(1):125-37.
- Dulawa SC, Grandy DK, Low MJ, Paulus MP, Geyer MA (1999) Dopamine D4 receptor-knock-out mice exhibit reduced exploration of novel stimuli. *J Neurosci* 19(21):9550-6.
- Duman RS, Tallman JF, Nestler EJ (1988) Acute and chronic opiate-regulation of adenylate cyclase in brain: specific effects in locus coeruleus. *J Pharmacol Exp Ther* 246(3):1033-9.
- Dunah AW, Standaert DG (2001) Dopamine D1 receptor-dependent trafficking of striatal NMDA glutamate receptors to the postsynaptic membrane. *J Neurosci* 21(15):5546-58.
- Eblen F, Graybiel AM (1995) Highly restricted origin of prefrontal cortical inputs to striosomes in the macaque monkey. *J Neurosci* 15(9):5999-6013.
- Ebstein RP, Novick O, Umansky R, Priel B, Osher Y, Blaine D, Bennett ER, Nemanov L, Katz M, Belmaker RH (1996) Dopamine D4 receptor (D4DR) exon III polymorphism associated with the human personality trait of Novelty Seeking. *Nat Genet* 12(1):78-80.
- Ebstein RP, Benjamin J, Belmaker RH (2000) Personality and polymorphisms of genes involved in aminergic neurotransmission. *Eur J Pharmacol* 410(2-3):205-214.
- El Kouhen R, Burd AL, Erickson-Herbrandson LJ, Chang CY, Law PY, Loh HH (2001) Phosphorylation of Ser363, Thr370, and Ser375 residues within the carboxyl tail differentially regulates mu-opioid receptor internalization. *J Biol Chem* 276(16):12774-80.
- Elde R, Arvidsson U, Riedl M, Vulchanova L, Lee JH, Dado R, Nakano A, Chakrabarti S, Zhang X, Loh HH, et al (1995) Distribution of neuropeptide receptors. New views of peptidergic neurotransmission made possible by antibodies to opioid receptors. *Ann NY Acad Sci* 757:390-404.
- Elliott AC (2001) Recent developments in non-excitable cell calcium entry. *Cell Calcium* 30(2):73-93.
- Engber TM, Boldry RC, Kuo S, Chase TN (1992) Dopaminergic modulation of striatal neuropeptides: differential effects of D1 and D2 receptor stimulation on somatostatin, neuropeptide Y, neurotensin, dynorphin and enkephalin. *Brain Res* 581(2):261-8.
- Eravci M, Grosspietsch T, Pinna G, Schulz O, Kley S, Bachmann M, Wolffgramm J, Gotz E, Heyne A, Meinhold H, Baumgartner A (1997) Dopamine receptor gene expression in an animal model of 'behavioral dependence' on ethanol. *Mol Brain Res* 50(1-2):221-9.
- Erdtmann-Vourliotis M, Mayer P, Riechert U, Grecksch G, Holtt V (1998) Identification of brain regions that are markedly activated by morphine in tolerant but not in naive rats. *Mol Brain Res* 61(1-2):51-61.
- Evans CJ, Keith DE Jr, Morrison H, Magendzo K, Edwards RH (1992) Cloning of a delta opioid receptor by functional expression. *Science* 258(5090):1952-5.
- Everitt BJ, Parkinson JA, Olmstead MC, Arroyo M, Robledo P, Robbins TW (1999) Associative processes in addiction and reward. The role of amygdala-ventral striatal subsystems. *Ann NY Acad Sci* 877:412-38.
- Everitt BJ, Robbins TW (2005) Neural systems of reinforcement for drug addiction: from actions to habits to compulsion. *Nat Neurosci* 8(11):1481-9.
- Fallon JH, Leslie FM, Cone RI (1985) Dynorphin-containing pathways in the substantia nigra and ventral tegmentum: a double labeling study using combined immunofluorescence and retrograde tracing. *Neuropeptides* 5(4-6):457-60.
- Falzone TL, Gelman DM, Young JI, Grandy DK, Low MJ, Rubinstein M (2002) Absence of dopamine D4 receptors results in enhanced reactivity to unconditioned, but not conditioned, fear. *Eur J Neurosci* 15(1):158-64.
- Faraone SV, Biederman J, Spencer T, Wilens T, Seidman LJ, Mick E, Doyle AE (2000)

- Attention-deficit/hyperactivity disorder in adults: an overview. *Biol Psychiatry* 48(1):9-20.
- Faraone SV, Doyle AE, Mick E, Biederman J (2001) Meta-analysis of the association between the 7-repeat allele of the dopamine D(4) receptor gene and attention deficit hyperactivity disorder. *Am J Psychiatry* 158(7):1052-7.
- Feldpausch DL, Needham LM, Stone MP, Althaus JS, Yamamoto BK, Svensson KA, Merchant KM (1998) The role of dopamine D4 receptor in the induction of behavioral sensitization to amphetamine and accompanying biochemical and molecular adaptations. *J Pharmacol Exp Ther* 286(1):497-508.
- Ferguson SS, Downey WE 3rd, Colapietro AM, Barak LS, Menard L, Caron MG (1996) Role of beta-arrestin in mediating agonist promoted G protein coupled receptor internalization. *Science* 271(5247):363-6.
- Ferguson SS (2001) Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitization and signaling. *Pharmacol Rev* 53(1):1-24.
- Ferguson SM, Thomas MJ, Robinson TE (2004) Morphine-induced c-fos mRNA expression in striatofugal circuits: modulation by dose, environmental context, and drug history. *Neuropsychopharmacology* 29(9):1664-74.
- Fernandez-Espejo E (2002) [Neurobiological basis of drug addiction] *Rev Neurol* 34(7):659-64.
- Ferrer-Alcon M, Garcia-Sevilla JA, Jaquet PE, La Harpe R, Riederer BM, Walzer C, Guimon J (2000) Regulation of nonphosphorylated and phosphorylated forms of neurofilament proteins in the prefrontal cortex of human opioid addicts. *J Neurosci Res* 61(3):338-49.
- Ferrer-Alcon M, La Harpe R, Guimon J, Garcia-Sevilla JA (2003) Downregulation of neuronal cdk5/p35 in opioid addicts and opiate-treated rats: relation to neurofilament phosphorylation. *Neuropsychopharmacology* 28(5):947-55.
- Fink JS, Smith GP (1980) Mesolimbocortical dopamine terminal fields are necessary for normal locomotor and investigatory exploration in rats. *Brain Res* 199(2):359-84.
- Finley JC, Maderdrut JL, Petrusz P (1981) The immunocytochemical localization of enkephalin in the central nervous system of the rat. *J Comp Neurol* 198(4):541-65.
- Fisch TM, Prywes R, Simon MC, Roeder RG (1989) Multiple sequence elements in the c-fos promoter mediate induction by cAMP. *Genes Dev* 3(2):198-211.
- Flaherty AW, Graybiel AM (1993) Output architecture of the primate putamen. *J Neurosci* 13(8):3222-37.
- Flores-Hernandez J, Cepeda C, Hernandez-Echeagaray E, Calvert CR, Jokel ES, Fienberg AA, Greengard P, Levine MS (2002) Dopamine enhancement of NMDA currents in dissociated medium-sized striatal neurons: role of D1 receptors and DARPP-32. *J Neurophysiol* 88(6):3010-20.
- Franco R, Ferre S, Agnati L, Torvinen M, Gines S, Hillion J, Casado V, Lledo P, Zoli M, Lluís C, Fuxe K (2000) Evidence for adenosine/dopamine receptor interactions: indications for heteromerization. *Neuropsychopharmacology* 23(4 Suppl):S50-9.
- Franques P, Auriacombe M, Piquemal E, Verger M, Brisseau-Gimenez S, Grabot D, Tignol J (2003) Sensation seeking as a common factor in opioid dependent subjects and high risk sport practicing subjects. A cross sectional study. *Drug Alcohol Depend* 69(2):121-6.
- Fukuda K, Kato S, Mori K, Nishi M, Takeshima H, Iwabe N, Miyata T, Houtani T, Sugimoto T (1994) cDNA cloning and regional distribution of a novel member of the opioid receptor family. *FEBS Lett* 343(1):42-6.
- Fukuda K, Kato S, Morikawa H, Shoda T, Mori K (1996) Functional coupling of the delta-, mu-, and kappa-opioid receptors to mitogen-activated protein kinase and arachidonate release in Chinese hamster ovary cells. *J Neurochem* 67:1309-16.
- Furlan AD, Sandoval JA, Mailis-Gagnon A, Tunks E (2006) Opioids for chronic noncancer pain: a meta-analysis of effectiveness and side effects. *CMAJ* 174(11):1589-94.
- Fuxe K, Agnati LF, Benfenati F, Cimmino M, Algeri S, Hokfelt T, Mutt V (1981) Modulation by cholecystokinins of 3H-spiroperidol binding in rat striatum: evidence for increased affinity and reduction in the number of binding sites. *Acta Physiol Scand* 113(4):567-9.
- Fuxe K, Agnati LF, Kalia M, Goldstein M, Andersson K y Härfstrand A (1985) Dopaminergic systems in the brain and pituitary. The dopaminergic system (Flückiger E, Müller EE, Thorner MO, eds.) Springer-Verlag, Berlin 11-25.
- Fuxe K, Manger P, Genedani S, Agnati L (2006) The nigrostriatal DA pathway and Parkinson's disease. *J Neural Transm Suppl* 70:71-83.

- Fuxe K, Canals M, Torvinen M, Marcellino D, Terasmaa A, Genedani S, Leo G, Guidolin D, Diaz-Cabiale Z, Rivera A, Lundstrom L, Langel U, Narvaez J, Tanganelli S, Lluís C, Ferre S, Woods A, Franco R, Agnati LF (2007) Intramembrane receptor-receptor interactions: a novel principle in molecular medicine. *J Neural Transm* 114(1):49-75.
- Gago B, Fuxe K, Agnati L, Penafiel A, De La Calle A, Rivera A (2007) Dopamine D(4) receptor activation decreases the expression of mu-opioid receptors in the rat striatum. *J Comp Neurol* 502(3):358-366.
- Gan L, Falzone TL, Zhang K, Rubinstein M, Baldessarini RJ, Tarazi FI (2004) Enhanced expression of dopamine D(1) and glutamate NMDA receptors in dopamine D(4) receptor knockout mice. *J Mol Neurosci* 22(3):167-78.
- Garcia MM, Brown HE, Harlan RE (1995) Alterations in immediate-early gene proteins in the rat forebrain induced by acute morphine injection. *Brain Res* 692(1-2):23-40.
- Garcia MM, Anderson AT, Edwards R, Harlan RE (2003) Morphine induction of c-fos expression in the rat forebrain through glutamatergic mechanisms: role of non-n-methyl-D-aspartate receptors. *Neuroscience* 119(3):787-94.
- Garzon J, Rodriguez-Munoz M, Lopez-Fando A, Garcia-Espana A, Sanchez-Blazquez P (2004) RGSZ1 and GAIP regulate mu- but not delta-opioid receptors in mouse CNS: role in tachyphylaxis and acute tolerance. *Neuropsychopharmacology* 29(6):1091-104.
- George SR, Zastawny RL, Briones-Urbina R, Cheng R, Nguyen T, Heiber M, Kouvelas A, Chan AS, O'Dowd BF (1994) Distinct distributions of mu, delta and kappa opioid receptor mRNA in rat brain. *Biochem. Biophys. Res Commun* 205(2): 1438-44.
- Georges F, Stinus L, Bloch B, Le Moine C (1999) Chronic morphine exposure and spontaneous withdrawal are associated with modifications of dopamine receptor and neuropeptide gene expression in the rat striatum. *Eur J Neurosci* 11:481-90.
- Georges F, Stinus L, Le Moine C (2000) Mapping of c-fos gene expression in the brain during morphine dependence and precipitated withdrawal, and phenotypic identification of the striatal neurons involved. *Eur J Neurosci* 12(12):4475-86.
- Gerfen CR (1984) The neostriatal mosaic: compartmentalization of corticostriatal input and striatonigral output systems. *Nature* 311(5985):461-4.
- Gerfen CR, Herkenham M, Thibault J (1987) The neostriatal mosaic: II. Patch- and matrix-directed mesostriatal dopaminergic and non-dopaminergic systems. *J Neurosci* 7(12):3915-34.
- Gerfen CR, Young WS 3rd (1988) Distribution of striatonigral and striatopallidal peptidergic neurons in both patch and matrix compartments: an in situ hybridization histochemistry and fluorescent retrograde tracing study. *Brain Res* 460(1):161-7.
- Gerfen CR (1989) The neostriatal mosaic: striatal patch-matrix organization is related to cortical lamination. *Science* 246(4928):385-8.
- 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(4986):1429-32.
- Gerfen CR, McGinty JF, Young WS 3rd (1991) Dopamine differentially regulates dynorphin, substance P, and enkephalin expression in striatal neurons: in situ hybridization histochemical analysis. *J Neurosci* 11(4):1016-31.
- Gerfen CR (1992) The neostriatal mosaic: multiple levels of compartmental organization in the basal ganglia. *Annu Rev Neurosci* 15: 285-320.
- Gerfen CR, Wilson CJ (1996) The basal ganglia, en *Handbook of Chemical Neuroanatomy* (Swanson LW, Björklund A y Hökfelt T, eds) Elsevier Science, Amsterdam 12:371-468.
- Gerrits MA, Lesscher HB, van Ree JM (2003) Drug dependence and the endogenous opioid system. *Eur Neuropsychopharmacol* 13(6):424-34.
- Gilliss B, Malanga CJ, Pieper JO, Carlezon WA Jr (2002) Cocaine and SKF-82958 potentiate brain stimulation reward in Swiss-Webster mice. *Psychopharmacology* 163(2):238-48.
- Ginty DD, Bonni A, Greenberg ME (1994) Nerve growth factor activates a Ras-dependent protein kinase that stimulates c-fos transcription via phosphorylation of CREB. *Cell* 77(5):713-25.
- Glase SA, Akunne HC, Georgic LM, Heffner TG, MacKenzie RG, Manley PJ, Pugsley TA, Wise LD (1997) Substituted [(4-phenylpiperazinyl)-methyl]benzamides: selective dopamine D4 agonists. *J Med Chem* 40(12):1771-2.
- Gonzalez GA, Montminy MR (1989) Cyclic AMP stimulates somatostatin gene transcription by phosphorylation of CREB at serine 133. *Cell* 59(4):675-80.

- Gonzalez-Nicolini MV, Berglind W, Cole KS, Keogh CL, McGinty JF (2003) Local mu and delta opioid receptors regulate amphetamine-induced behavior and neuropeptide mRNA in the striatum. *Neuroscience* 121(2):387-98.
- Grady DL, Chi HC, Ding YC, Smith M, Wang E, Schuck S, Flodman P, Spence MA, Swanson JM, Moyzis RK (2003) High prevalence of rare dopamine receptor D4 alleles in children diagnosed with attention-deficit hyperactivity disorder. *Mol Psychiatry* 8(5):536-45.
- Grande C, Zhu H, Martin AB, Lee M, Ortiz O, Hiroi N, Moratalla R (2004) Chronic treatment with atypical neuroleptics induces striosomal FosB/DeltaFosB expression in rats. *Biol Psychiatry* 55(5):457-63.
- Graybiel AM, Ragsdale CW Jr (1978) Histochemically distinct compartments in the striatum of human, monkeys, and cat demonstrated by acetylthiocholinesterase staining. *Proc Natl Acad Sci USA* 75(11):5723-6.
- Graybiel AM (1990) Neurotransmitters and neuromodulators in the basal ganglia. *Trends Neurosci* 13(7):244-54.
- Graybiel AM, Moratalla R, Robertson HA (1990) Amphetamine and cocaine induce drug-specific activation of the c-fos gene in striosome-matrix compartments and limbic subdivisions of the striatum. *Proc Natl Acad Sci USA* 87(17):6912-6.
- Graybiel AM (1995) Building action repertoires: memory and learning functions of the basal ganglia. *Curr Opin Neurobiol* 5(6):733-41.
- Graybiel AM (1998) The basal ganglia and chunking of action repertoires. *Neurobiol Learn Mem* 70(1-2):119-36.
- Graybiel AM, Canales JJ, Capper-Loup C (2000) Levodopa-induced dyskinesias and dopamine-dependent stereotypies: a new hypothesis. *Trends Neurosci* 23(10 Suppl):S71-7.
- Greenberg ME, Ziff EB (1984) Stimulation of 3T3 cells induces transcription of the c-fos proto-oncogene. *Nature* 311(5985):433-8.
- Greengard P, Nairn AC, Girault JA, Ouimet CC, Snyder GL, Fisone G, Allen PB, Fienberg A, Nishi A (1998) The DARPP-32/protein phosphatase-1 cascade: a model for signal integration. *Brain Res Rev* 26(2-3):274-84.
- Grewal SS, York RD, Stork PJ (1999) Extracellular-signal-regulated kinase signalling in neurons. *Curr Opin Neurobiol* 9(5):544-53.
- Groves PM, Martone M, Young SJ, Armstrong DM (1988) Three-dimensional pattern of enkephalin-like immunoreactivity in the caudate nucleus of the cat. *J Neurosci* 8(3):892-900.
- Guitart X, Nestler EJ (1989) Identification of morphine- and cyclic AMP-regulated phosphoproteins (MARPPs) in the locus coeruleus and other regions of rat brain: regulation by acute and chronic morphine. *J Neurosci* 9(12):4371-87.
- 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(3):1168-71.
- Gutstein HB, Rubie EA, Mansour A, Akil H, Woodgett JR (1997) Opioid effects on mitogen-activated protein kinase signaling cascades. *Anesthesiology* 87(5):1118-26.
- Gutstein HB, Thome JL, Fine JL, Watson SJ, Akil H (1998) Pattern of c-fos mRNA induction in rat brain by acute morphine. *Can J Physiol Pharmacol* 76(3):294-303.
- Guttenberg ND, Klop H, Minami M, Satoh M, Voorn P (1996) Co-localization of mu opioid receptor is greater with dynorphin than enkephalin in rat striatum. *Neuroreport* 7(13):2119-24.
- Haber SN, Fudge JL, McFarland NR (2000) Striatonigrostriatal pathways in primates form an ascending spiral from the shell to the dorsolateral striatum. *J Neurosci* 20(6):2369-82.
- Haberstock-Debic H, Kim KA, Yu YJ, von Zastrow M (2005) Morphine promotes rapid, arrestin-dependent endocytosis of mu-opioid receptors in striatal neurons. *J Neurosci* 25(34):7847-57.
- Hai T, Curran T (1991) Cross-family dimerization of transcription factors Fos/Jun and ATF/CREB alters DNA binding specificity. *Proc Natl Acad Sci USA* 88(9):3720-4.
- Han W, Hata H, Imbe H, Liu QR, Takamatsu Y, Koizumi M, Murphy NP, Senba E, Uhl GR, Sora I, Ikeda K (2006) Increased body weight in mice lacking mu-opioid receptors. *Neuroreport* 17(9):941-4.
- Hanson GR, Merchant KM, Letter AA, Bush L, Gibb JW (1987) Methamphetamine-induced changes in the striatal-nigral dynorphin system: role of D-1 and D-2 receptors. *Eur J Pharmacol* 144(2):245-6.

- Harlan RE, Kailas SR, Tagoe CE, Garcia MM (2004) Morphine actions in the rat forebrain: role of protein kinase C. *Brain Res Bull* 62(4):285-95.
- Harris GC, Aston-Jones G (1994) Involvement of D2 dopamine receptors in the nucleus accumbens in the opiate withdrawal syndrome. *Nature* 371(6493):155-7.
- Harrison MB, Wiley RG, Wooten GF (1990) Selective localization of striatal D1 receptors to striatonigral neurons. *Brain Res* 528(2):317-22.
- Harrison MB, Wiley RG, Wooten GF (1992) Changes in D2 but not D1 receptor binding in the striatum following a selective lesion of striatopallidal neurons. *Brain Res* 590(1-2):305-10.
- Hauber W, Bubser M, Schmidt WJ (1994) 6-Hydroxydopamine lesion of the rat prefrontal cortex impairs motor initiation but not motor execution. *Exp Brain Res* 99(3):524-8.
- Hauber W (1998) Involvement of basal ganglia transmitter systems in movement initiation. *Prog Neurobiol* 56(5):507-40.
- Hayward MD, Duman RS, Nestler EJ (1990) Induction of the c-fos proto-oncogene during opiate withdrawal in the locus coeruleus and other regions of rat brain. *Brain Res* 525(2):256-66.
- Hemmings HC Jr, Greengard P, Tung HY, Cohen P (1984) DARPP-32, a dopamine-regulated neuronal phosphoprotein, is a potent inhibitor of protein phosphatase-1. *Nature* 310(5977):503-5.
- Herkenham M, Pert CB (1981) Mosaic distribution of opiate receptors, parafascicular projections and acetylcholinesterase in rat striatum. *Nature* 291(5814):415-8.
- Hernandez A, Ibanez-Sandoval O, Sierra A, Valdiosera R, Tapia D, Anaya V, Galarraga E, Vargas J, Aceves J (2006) Control of the subthalamic innervation of the rat globus pallidus by D2/3 and D4 dopamine receptors. *J Neurophysiol* 96(6):2877-88.
- Herrera-Marschitz M, Christensson-Nylander I, Sharp T, Staines W, Reid M, Hokfelt T, Terenius L, Ungerstedt U (1986) Striato-nigral dynorphin and substance P pathways in the rat. II. Functional analysis. *Exp Brain Res* 64(1):193-207.
- Hikosaka O, Nakahara H, Rand MK, Sakai K, Lu X, Nakamura K, Miyachi S, Doya K (1999) Parallel neural networks for learning sequential procedures. *Trends Neurosci* 22: 464-71.
- Hiroi N, Brown JR, Haile CN, Ye H, Greenberg ME, Nestler EJ (1997) FosB mutant mice: loss of chronic cocaine induction of Fos-related proteins and heightened sensitivity to cocaine's psychomotor and rewarding effects. *Proc Natl Acad Sci USA* 94(19):10397-402.
- Hiroi N, Brown J, Ye H, Saudou F, Vaidya VA, Duman RS, Greenberg ME, Nestler EJ (1998) Essential Role of the fosB Gene in Molecular, Cellular, and Behavioral Actions of Chronic Electroconvulsive Seizures. *J Neurosci* 18:6952-62.
- Hnasko TS, Sotak BN, Palmiter RD (2005) Morphine reward in dopamine-deficient mice. *Nature* 438(7069):854-7.
- Hope B, Kosofsky B, Hyman SE, Nestler EJ (1992) Regulation of immediate early gene expression and AP-1 binding in the rat nucleus accumbens by chronic cocaine. *Proc Natl Acad Sci USA* 89(13):5764-8.
- Hope BT, Nye HE, Kelz MB, Self DW, Iadarola MJ, Nakabeppu Y, Duman RS, Nestler EJ (1994) Induction of a long-lasting AP-1 complex composed of altered Fos-like proteins in brain by chronic cocaine and other chronic treatments. *Neuron* 13:1235-44.
- Horner KA, Zadina JE (2004) Internalization and down-regulation of mu opioid receptors by endomorphins and morphine in SH-SY5Y human neuroblastoma cells. *Brain Res* 1028(2):121-32.
- Hsu SM, Raine L (1981) Protein A, avidin, and biotin in immunohistochemistry. *J Histochem Cytochem* 29(11):1349-53.
- Huang Y, Kegeles LS, Bae S, Hwang D, Roth BL, Savage JE, Laruelle M (2001). Synthesis of potent and selective dopamine D(4) antagonists as candidate radioligands. *Bioorg Med Chem Lett* 11(11):1375-7.
- Hurd YL, Herkenham M (1992) Influence of a single injection of cocaine, amphetamine or GBR 12909 on mRNA expression of striatal neuropeptides. *Mol Brain Res* 16(1-2):97-104.
- Hurd YL, Herkenham M (1995) Neuropeptide compartmentalization within the human neostriatum: In situ hybridization and in vitro autoradiography characterization. *Neuroscience* 64:571-86.
- Hyman SE, Malenka RC (2001) Addiction and the brain: the neurobiology of compulsion and its persistence. *Nat Rev Neurosci* 2(10):695-703.
- Impey S, Smith DM, Obrietan K, Donahue R, Wade C, Storm DR (1998) Stimulation of cAMP response element (CRE)-mediated transcription during contextual learning. *Nat Neurosci* 1(7):595-601.

- Ito K, Haga T, Lamah J, Sadee W (1999) Sequestration of dopamine D2 receptors depends on coexpression of G-protein-coupled receptor kinases 2 or 5. *Eur J Biochem* 260(1):112-9.
- Itokawa M, Toru M, Ito K, Tsuga H, Kameyama K, Haga T, Arinami T, Hamaguchi H (1996) Sequestration of the short and long isoforms of dopamine D2 receptors expressed in Chinese hamster ovary cells. *Mol Pharmacol* 49(3):560-6.
- Ivanov A, Aston-Jones G (2001) Local opiate withdrawal in locus coeruleus neurons in vitro. *J Neurophysiol* 85(6):2388-97.
- Iwata K, Ito K, Fukuzaki A, Inaki K, Haga T (1999) Dynamin and rab5 regulate GRK2-dependent internalization of dopamine D2 receptors. *Eur J Biochem* 263(2):596-602.
- Jabourian M, Venance L, Bourgoin S, Ozon S, Perez S, Godeheu G, Glowinski J, Kemel ML (2005) Functional mu opioid receptors are expressed in cholinergic interneurons of the rat dorsal striatum: territorial specificity and diurnal variation. *Eur J Neurosci* 21(12):3301-9.
- Jeanneteau F, Diaz J, Sokoloff P, Griffon N (2004) Interactions of GIPC with dopamine D2, D3 but not D4 receptors define a novel mode of regulation of G protein-coupled receptors. *Mol Biol Cell* 15(2):696-705.
- Jiang HK, McGinty JF, Hong JS (1990) Differential modulation of striatonigral dynorphin and enkephalin by dopamine receptor subtypes. *Brain Res* 507(1):57-64.
- Jiang D, Sibley DR (1999) Regulation of D(1) dopamine receptors with mutations of protein kinase phosphorylation sites: attenuation of the rate of agonist-induced desensitization. *Mol Pharmacol* 56(4):675-83.
- Jimenez-Castellanos J, Graybiel AM (1987) Subdivisions of the dopamine-containing A8-A9-A10 complex identified by their differential mesostriatal innervation of striosomes and extrastriosomal matrix. *Neuroscience* 23(1):223-42.
- Jimenez-Castellanos J, Graybiel AM (1989) Evidence that histochemically distinct zones of the primate substantia nigra pars compacta are related to patterned distributions of nigrostriatal projection neurons and striatonigral fibers. *Exp Brain Res* 74(2):227-38.
- Jin W, Lee NM, Loh HH, and Thayer SA (1994) Opioids mobilize calcium from inositol 1,4,5-trisphosphate-sensitive stores in NG108-15 cells. *J Neurosci* 14:1920-29.
- Joel D, Weiner I (1997) The connections of the primate subthalamic nucleus: indirect pathways and the open-interconnected scheme of basal ganglia-thalamocortical circuitry. *Brain Res Rev* 23(1-2):62-78.
- Johnson SW, North RA (1992) Opioids excite dopamine neurons by hyperpolarization of local interneurons. *J Neurosci* 12(2):483-8.
- Johnson GL, Lapadat R (2002) Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science* 298(5600):1911-2.
- Kabbani N, Negyessy L, Lin R, Goldman-Rakic P, Levenson R (2002) Interaction with neuronal calcium sensor NCS-1 mediates desensitization of the D2 dopamine receptor. *J Neurosci* 22(19):8476-86.
- 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(5871):245-9.
- Kalivas PW, Widerlov E, Stanley D, Breese G, Prange AJ Jr (1983) Enkephalin action on the mesolimbic system: a dopamine-dependent and a dopamine-independent increase in locomotor activity. *J Pharmacol Exp Ther* 227(1):229-37.
- Kalivas PW, Duffy P (1990) Effect of acute and daily neurotensin and enkephalin treatments on extracellular dopamine in the nucleus accumbens. *J Neurosci* 10(9):2940-9.
- Kalivas PW, Sorg BA, Hooks MS (1993) The pharmacology and neural circuitry of sensitization to psychostimulants. *Behav Pharmacol* 4(4):315-334.
- Kaneko T, Minami M, Satoh M, Mizuno N (1995) Immunocytochemical localization of mu-opioid receptor in the rat caudate-putamen. *Neurosci Lett* 184(3):149-52.
- Katz JL, Chausmer AL, Elmer GI, Rubinstein M, Low MJ, Grandy DK (2003) Cocaine-induced locomotor activity and cocaine discrimination in dopamine D4 receptor mutant mice. *Psychopharmacology (Berl)* 170(1):108-14.
- Kawaguchi Y, Wilson CJ, Augood SJ, Emson PC (1995) Striatal interneurons: chemical, physiological and morphological characterization. *Trends Neurosci* 18(12):527-35.
- Kebabian JW, Calne DB (1979) Multiple receptors for dopamine. *Nature* 277(5692):93-6.

- Keefe KA, Ganguly A (1998) Effects of NMDA receptor antagonists on D1 dopamine receptor-mediated changes in striatal immediate early gene expression: evidence for involvement of pharmacologically distinct NMDA receptors. *Dev Neurosci* 20(2-3):216-28.
- 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(32):19021-4.
- Keith DE, Anton B, Murray SR, Zaki PA, Chu PC, Lissin DV, Montelliet-Agius G, Stewart PL, Evans CJ, von Zastrow M (1998) mu-Opioid receptor internalization: opiate drugs have differential effects on a conserved endocytic mechanism in vitro and in the mammalian brain. *Mol Pharmacol* 53(3):377-84.
- Kelz MB, Nestler EJ (2000) DeltaFosB: a molecular switch underlying long-term neural plasticity. *Curr Opin Neurol* 13:715-720.
- Khan ZU, Gutierrez A, Martin R, Penafiel A, Rivera A, De La Calle A (1998) Differential regional and cellular distribution of dopamine D2-like receptors: an immunocytochemical study of subtype-specific antibodies in rat and human brain. *J Comp Neurol* 402(3):353-71.
- Khan ZU, Gutierrez A, Martin R, Penafiel A, Rivera A, de la Calle A (2000) Dopamine D5 receptors of rat and human brain. *Neuroscience* 100(4):689-99.
- Kieffer BL, Befort K, Gaveriaux-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(24):12048-52.
- Kim KM, Valenzano KJ, Robinson SR, Yao WD, Barak LS, Caron MG (2001) Differential regulation of the dopamine D2 and D3 receptors by G protein-coupled receptor kinases and beta-arrestins. *J Biol Chem* 276(40):37409-14.
- Kincaid AE, Wilson CJ (1996) Corticostriatal innervation of the patch and matrix in the rat neostriatum. *J Comp Neurol* 374(4):578-92.
- Ko JL, Minnerath SR, Loh HH (1997) Dual promoters of mouse mu-opioid receptor gene. *Biochem. Biophys. Res Commun* 234(2):351-7.
- Koch T, Schulz S, Pfeiffer M, Klutzny M, Schroder H, Kahl E, Holtt V (2001) C-terminal splice variants of the mouse mu-opioid receptor differ in morphine-induced internalization and receptor resensitization. *J Biol Chem* 276(33):31408-14.
- Koch T, Wiedera A, Bartsch K, Schulz S, Brandenburg LO, Wundrack N, Beyer A, Grecksch G, Holtt V (2005) Receptor endocytosis counteracts the development of opioid tolerance. *Mol Pharmacol* 67(1):280-7.
- Konradi C, Kobierski LA, Nguyen TV, Heckers S, Hyman SE (1993) The cAMP-response-element-binding protein interacts, but Fos protein does not interact, with the proenkephalin enhancer in rat striatum. *Proc Natl Acad Sci USA* 90(15):7005-9.
- Konradi C, Cole RL, Heckers S, Hyman SE (1994) Amphetamine regulates gene expression in rat striatum via transcription factor CREB. *J Neurosci* 14(9):5623-34.
- Konradi C, Leveque JC, Hyman SE (1996) Amphetamine and dopamine-induced immediate early gene expression in striatal neurons depends on postsynaptic NMDA receptors and calcium. *J Neurosci* 16(13):4231-9.
- Koob GF (1992a) Neural mechanisms of drug reinforcement. *Ann N Y Acad Sci* 654:171-91.
- Koob GF (1992b) Drugs of abuse: anatomy, pharmacology and function of reward pathways. *Trends Pharmacol Sci* 13(5):177-84.
- Koob GF, Maldonado R, Stinus L (1992) Neural substrates of opiate withdrawal. *Trends Neurosci* 15(5):186-91.
- Koob GF (1996) Hedonic valence, dopamine and motivation. *Mol Psychiatry* 1(3):186-9.
- Koob GF, Le Moal M (1997) Drug abuse: hedonic homeostatic dysregulation. *Science* 278(5335):52-8.
- Koob GF, Caine SB, Parsons L, Markou A, Weiss F (1997) Opponent process model and psychostimulant addiction. *Pharmacol Biochem Behav* 57(3):513-21.
- Koob GF, Le Moal M (2001) Drug addiction, dysregulation of reward, and allostasis. *Neuropsychopharmacology* 24(2):97-129.
- Kotler M, Cohen H, Segman R, Gritsenko I, Nemanov L, Lerer B, Kramer I, Zer-Zion M, Kletz I, Ebstein RP (1997) Excess dopamine D4 receptor (D4DR) exon III seven repeat allele in opioid-dependent subjects. *Mol Psychiatry* 2(3):251-4.
- Kovacs KJ (1998) c-Fos as a transcription factor: a stressful (re)view from a functional map. *Neurochem Int* 33(4):287-97.
- Kowalski C, Micheau J, Corder R, Gaillard R, Conte-Devolx B (1992) Age-related changes in cortico-releasing factor, somatostatin,

- neuropeptide Y, methionine enkephalin and beta-endorphin in specific rat brain areas. *Brain Res* 582(1):38-46.
- Kovary K, Bravo R (1991) The jun and fos protein families are both required for cell cycle progression in fibroblasts. *Mol Cell Biol* 11(9):4466-72.
- Kruzich PJ, Suchland KL, Grandy DK (2004) Dopamine D4 receptor-deficient mice, congenic on the C57BL/6J background, are hypersensitive to amphetamine. *Synapse* 53(2):131-9.
- Kula NS, Tarazi FI, Baldessarini RJ, Xu L, Bakthavachalam V, Pounds S, True CD (1999) Neuropharmacological assessment of potential dopamine D4 receptor-selective radioligands. *Eur J Pharmacol* 367(1):139-42.
- Kulagowski JJ, Broughton HB, Curtis NR, Mawer IM, Ridgill MP, Baker R, Emms F, Freedman SB, Marwood R, Patel S, Patel S, Ragan CI, Leeson PD (1996) 3-((4-(4-Chlorophenyl)piperazin-1-yl)-methyl)-1H-pyrrolo-2,3-b-pyridine: an antagonist with high affinity and selectivity for the human dopamine D4 receptor. *J Med Chem* 39(10):1941-2.
- Kumer SC, Vrana KE (1996) Intricate regulation of tyrosine hydroxylase activity and gene expression. *J Neurochem* 67(2):443-62.
- Kunishio K, Haber SN (1994) Primate cingulostriatal projection: limbic striatal versus sensorimotor striatal input. *J Comp Neurol* 350(3):337-56.
- Kuribara H (1995) Modification of morphine sensitization by opioid and dopamine receptor antagonists: evaluation by studying ambulation in mice. *Eur J Pharmacol* 275(3):251-8.
- Kurose H, Katada T, Amano T, Ui M (1983) Specific uncoupling by islet-activating protein, pertussis toxin, of negative signal transduction via alpha-adrenergic, cholinergic, and opiate receptors in neuroblastoma x glioma hybrid cells. *J Biol Chem* 258(8):4870-5.
- Lacey MG, Mercuri NB, North RA (1989) Two cell types in rat substantia nigra zona compacta distinguished by membrane properties and the actions of dopamine and opioids. *J Neurosci* 9(4):1233-41.
- Lachowicz JE, Shen Y, Monsma FJ Jr, Sibley DR (1995) Molecular cloning of a novel G protein-coupled receptor related to the opiate receptor family. *J Neurochem* 64(1):34-40.
- LaHoste GJ, Swanson JM, Wigal SB, Glabe C, Wigal T, King N, Kennedy JL (1996) Dopamine D4 receptor gene polymorphism is associated with attention deficit hyperactivity disorder. *Mol Psychiatry* 1(2):121-4.
- Lamph WW, Dwarki VJ, Ofir R, Montminy M, Verma IM (1990) Negative and positive regulation by transcription factor cAMP response element-binding protein is modulated by phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci USA* 87(11):4320-4.
- Lanau F, Brockhaus M, Pink JR, Franchet C, Wildt-Perinic D, Goepfert C, Probst A, Hartman DS (1997) Development and characterization of antibodies against the N terminus of the human dopamine D4 receptor. *J Neurochem* 69(5):2169-78.
- Law PY, Wong YH, Loh HH (2000) Molecular mechanisms and regulation of opioid receptor signaling. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 40:389-430.
- Le Bon O, Basiaux P, Streel E, Tecco J, Hanak C, Hansenne M, Ansseau M, Pelc I, Verbanck P, Dupont S (2004) Personality profile and drug of choice; a multivariate analysis using Cloninger's TCI on heroin addicts, alcoholics, and a random population group. *Drug Alcohol Depend* 73(2):175-82.
- Le Moine C, Normand E, Bloch B (1991) Phenotypical characterization of the rat striatal neurons expressing the D1 dopamine receptor gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 88(10):4205-9.
- Le Moine C, Bloch B (1995) D1 and D2 dopamine receptor gene expression in the rat striatum: sensitive cRNA probes demonstrate prominent segregation of D1 and D2 mRNAs in distinct neuronal populations of the dorsal and ventral striatum. *J Comp Neurol* 355(3):418-26.
- Le Moine C, Svenningsson P, Fredholm BB, Bloch B (1997) Dopamine-adenosine interactions in the striatum and the globus pallidus: inhibition of striatopallidal neurons through either D2 or A2A receptors enhances D1 receptor-mediated effects on c-fos expression. *J Neurosci* 17(20):8038-48.
- Leone P, Pocock D, Wise RA (1991) Morphine-dopamine interaction: ventral tegmental morphine increases nucleus accumbens dopamine release. *Pharmacol Biochem Behav* 39(2):469-72.
- Leshner AI (1997) Addiction is a brain disease, and it matters. *Science* 278(5335):45-7.
- Levesque D, Diaz J, Pilon C, Martres MP, Giros B, Souil E, Schott D, Morgat JL, Schwartz JC, Sokoloff P (1992) Identification, characterization, and localization of the dopamine D3 receptor in rat brain using 7-

- [3H]hydroxy-N,N-di-n-propyl-2-aminotetralin. *Proc Natl Acad Sci USA* 89(17):8155-9.
- Levey AI, Hersch SM, Rye DB, Sunahara RK, Niznik HB, Kitt CA, Price DL, Maggio R, Brann MR, Ciliax BJ, et al (1993) Localization of D1 and D2 dopamine receptors in brain with subtype-specific antibodies. *Proc Natl Acad Sci USA* 90(19):8861-5.
- Levine AA, Guan Z, Barco A, Xu S, Kandel ER, Schwartz JH (2005) CREB-binding protein controls response to cocaine by acetylating histones at the fosB promoter in the mouse striatum. *Proc Natl Acad Sci USA* 102(52):19186-91.
- Li SJ, Jiang HK, Stachowiak MS, Hudson PM, Owyang V, Nanry K, Tilson HA, Hong JS (1990) Influence of nigrostriatal dopaminergic tone on the biosynthesis of dynorphin and enkephalin in rat striatum. *Brain Res Mol Brain Res* 8(3):219-25.
- Li S, Zhu J, Chen C, Chen YW, Deriel JK, Ashby B, Liu-Chen LY (1993) Molecular cloning and expression of a rat kappa opioid receptor. *Biochem J* 295:629-33.
- Li LY, Chang KJ (1996) The stimulatory effect of opioids on mitogen-activated protein kinase in Chinese hamster ovary cells transfected to express mu-opioid receptors. *Mol Pharmacol* 50:599-602.
- Liang Y, Mestek A, Yu L, Carr LG (1995) Cloning and characterization of the promoter region of the mouse mu opioid receptor gene. *Brain Res* 679(1):82-8.
- Liang Y, Carr LG (1997) Transcription of the mouse mu-opioid receptor gene is regulated by two promoters. *Brain Res* 769(2):372-4.
- Lieberman DN, Mody I (1994) Regulation of NMDA channel function by endogenous Ca(2+)-dependent phosphatase. *Nature* 369(6477):235-9.
- Lindskog M, Svenningsson P, Fredholm B, Greengard P, Fisone G (1999) Mu- and delta-opioid receptor agonists inhibit DARPP-32 phosphorylation in distinct populations of striatal projection neurons. *Eur J Neurosci* 11(6):2182-6.
- Liu J, Nickolenko J, Sharp FR (1994) Morphine induces c-fos and junB in striatum and nucleus accumbens via D1 and N-methyl-D-aspartate receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 91(18):8537-41.
- Liu JG, Anand KJ (2001) Protein kinases modulate the cellular adaptations associated with opioid tolerance and dependence. *Brain Res Rev* 38(1-2):1-19.
- Loh HH, AP Smith AP (1990) Molecular characterization of opioid receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 30:123-147.
- Lonze BE, Ginty DD (2002) Function and regulation of CREB family transcription factors in the nervous system. *Neuron* 35(4):605-23.
- Lovenberg TW, Nichols DE, Nestler EJ, Roth RH, Mailman RB (1991) Guanine nucleotide binding proteins and the regulation of cyclic AMP synthesis in NS20Y neuroblastoma cells: role of D1 dopamine and muscarinic receptors. *Brain Res* 556(1):101-7.
- MacGibbon GA, Lawlor PA, Hughes P, Young D, Dragunow M (1995) Differential expression of inducible transcription factors in basal ganglia neurons. *Mol Brain Res* 34(2):294-302.
- Maisonneuve IM, Archer S, Glick SD (1994) U50,488, a kappa opioid receptor agonist, attenuates cocaine-induced increases in extracellular dopamine in the nucleus accumbens of rats. *Neurosci Lett* 181(1-2):57-60.
- 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 Arch Pharmacol* 352(5):565-75.
- Maldonado R, Saiardi A, Valverde O, Samad TA, Roques BP, Borrelli E (1997) Absence of opiate rewarding effects in mice lacking dopamine D2 receptors. *Nature* 388(6642):586-9.
- 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(8):2445-64.
- Mansour A, Thompson RC, Akil H, Watson SJ (1993) Delta opioid receptor mRNA distribution in the brain: comparison to delta receptor binding and proenkephalin mRNA. *J Chem Neuroanat* 6(6):351-62.
- Mansour A, Fox CA, Burke S, Meng F, Thompson RC, Akil H, Watson SJ (1994a). Mu, delta, and kappa opioid receptor mRNA expression in the rat CNS: an in situ hybridization study. *J Comp Neurol* 350(3):412-38.
- Mansour A, Fox CA, Thompson RC, Akil H, Watson SJ (1994b) mu-Opioid receptor mRNA expression in the rat CNS: comparison to mu-receptor binding. *Brain Res* 643(1-2):245-65.
- Mansour A, Fox CA, Meng F, Akil H, Watson SJ (1994c) Kappa 1 receptor mRNA distribution in the rat CNS: comparison to kappa receptor

- binding and prodynorphin mRNA. *Mol Cell Neurosci* 5(2):124-44.
- Mansour A, Fox CA, Burke S, Akil H, Watson SJ (1995). Immunohistochemical localization of the cloned mu opioid receptor in the rat CNS. *J Chem Neuroanat* 8(4):283-305.
- Mansour A, Burke S, Pavlic RJ, Akil H, Watson SJ (1996) Immunohistochemical localization of the cloned kappa 1 receptor in the rat CNS and pituitary. *Neuroscience* 71(3):671-90.
- Manzanares J, Lookingland KJ, Moore KE (1991) Kappa opioid receptor-mediated regulation of dopaminergic neurons in the rat brain. *J Pharmacol Exp Ther* 256(2):500-5.
- Manzanedo C, Aguilar MA, Minarro J (1999) The effects of dopamine D2 and D3 antagonists on spontaneous motor activity and morphine-induced hyperactivity in male mice. *Psychopharmacology (Berl)* 143(1):82-8.
- Marshall FH, Jones KA, Kaupmann K, Bettler B (1999) GABAB receptors - the first 7TM heterodimers. *Trends Pharmacol Sci* 20(10):396-9.
- Martin LJ, Blackstone CD, Haganir RL, Price DL (1992) Cellular localization of a metabotropic glutamate receptor in rat brain. *Neuron* 9:259-270.
- Martin KC, Kandel ER (1996) Cell adhesion molecules, CREB, and the formation of new synaptic connections. *Neuron* 17(4):567-70.
- Martin-Schild S, Gerall AA, Kastin AJ, Zadina JE (1999) Differential distribution of endomorphin 1- and endomorphin 2-like immunoreactivities in the CNS of the rodent. *J Comp Neurol* 405(4):450-71.
- Mason JN, Kozell LB, Neve KA (2002) Regulation of dopamine D(1) receptor trafficking by protein kinase A-dependent phosphorylation. *Mol Pharmacol* 61(4):806-16.
- Matsumoto M, Hidaka K, Tada S, Tasaki Y, Yamaguchi T (1995) Full-length cDNA cloning and distribution of human dopamine D4 receptor. *Mol Brain Res* 29(1):157-62.
- Matsumoto M, Hidaka K, Tada S, Tasaki Y, Yamaguchi T (1996) Low levels of mRNA for dopamine D4 receptor in human cerebral cortex and striatum. *J Neurochem* 66(3):915-9.
- Matthes HW, Maldonado R, Simonin F, Valverde O, Slowe S, Kitchen I, Befort K, Dierich A, Le Meur M, Dolle P, Tzavara E, Hanoune J, Roques BP, Kieffer BL (1996) Loss of morphine-induced analgesia, reward effect and withdrawal symptoms in mice lacking the mu-opioid-receptor gene. *Nature* 383(6603):819-23.
- Matthews RT, German DC (1984) Electrophysiological evidence for excitation of rat ventral tegmental area dopamine neurons by morphine. *Neuroscience* 11(3):617-25.
- Matthews RP, Guthrie CR, Wailes LM, Zhao X, Means AR, McKnight GS (1994) Calcium/calmodulin-dependent protein kinase types II and IV differentially regulate CREB-dependent gene expression. *Mol Cell Biol* 14(9):6107-16.
- Mauger C, Sivan B, Brockhaus M, Fuchs S, Civelli O, Monsma F Jr (1998) Development and characterization of antibodies directed against the mouse D4 dopamine receptor. *Eur J Neurosci* 10(2):529-37.
- Mavridis M, Besson MJ (1999) Dopamine-opiate interaction in the regulation of neostriatal and pallidal neuronal activity as assessed by opioid precursor peptides and glutamate decarboxylase messenger RNA expression. *Neuroscience* 92(3):945-66.
- Mayr B, Montminy M (2001) Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2(8):599-609.
- Mazzucchelli C, Vantaggiato C, Ciamei A, Fasano S, Pakhotin P, Krezel W, Welzl H, Wolfer DP, Pages G, Valverde O, Marowsky A, Porrazzo A, Orban PC, Maldonado R, Ehrenguber MU, Cestari V, Lipp HP, Chapman PF, Pouyssegur J, Brambilla R (2002) Knockout of ERK1 MAP kinase enhances synaptic plasticity in the striatum and facilitates striatal-mediated learning and memory. *Neuron* 34(5):807-20.
- McGeorge AJ, Faull RL (1989) The organization of the projection from the cerebral cortex to the striatum in the rat. *Neuroscience* 29(3):503-37
- McGinty JF; Henriksen SJ; Goldstein A; Terenius L; Bloom FE (1982) Dynorphin is contained within hippocampal mossy fibers: Immunochemical alterations after kainic acid administration and colchicine-induced neurotoxicity. *Proc Natl Acad Sci USA* 79:1797-1800.
- Meador-Woodruff JH, Mansour A, Healy DJ, Kuehn R, Zhou QY, Bunzow JR, Akil H, Civelli O, Watson SJ Jr (1991) Comparison of the distributions of D1 and D2 dopamine receptor mRNAs in rat brain. *Neuropsychopharmacology* 5(4):231-42.
- Meador-Woodruff JH, Haroutunian V, Powchik P, Davidson M, Davis KL, Watson SJ (1997) Dopamine receptor transcript expression in

- striatum and prefrontal and occipital cortex. Focal abnormalities in orbitofrontal cortex in schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry* 54(12):1089-95.
- Meck WH (2006) Neuroanatomical localization of an internal clock: A functional link between mesolimbic, nigrostriatal, and mesocortical dopaminergic systems. *Brain Res* 1109(1):93-107.
- 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(3 Pt 2):2396-406.
- Meunier JC (1997) Nociceptin/orphanin FQ and the opioid receptor-like ORL1 receptor. *Eur J Pharmacol* 340(1):1-15.
- Milde-Langosch K (2005) The Fos family of transcription factors and their role in tumorigenesis. *Eur J Cancer* 41(16):2449-61.
- Miller RJ, Pickel VM (1980) The distribution and functions of the enkephalins. *J Histochem Cytochem* 28(8):903-17.
- Miller JC (1990) Induction of c-fos mRNA expression in rat striatum by neuroleptic drugs. *J Neurochem* 54(4):1453-5.
- Milligan G (2004) G protein-coupled receptor dimerization: function and ligand pharmacology. *Mol Pharmacol* 66(1):1-7.
- Min BH, Augustin LB, Felsheim RF, Fuchs JA, Loh HH (1994) Genomic structure analysis of promoter sequence of a mouse mu opioid receptor gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 91(19):9081-5.
- Minami M, Hosoi Y, Toya T, Katao Y, Maekawa K, Katsumata S, Yabuuchi K, Onogi T, Satoh M (1993) In situ hybridization study of kappa-opioid receptor mRNA in the rat brain. *Neurosci Lett* 162(1-2):161-4.
- Missale C, Nash SR, Robinson SW, Jaber M, Caron MG (1998) Dopamine receptors: from structure to function. *Physiol Rev* 78(1):189-225.
- Mollereau C, Parmentier M, Mailleux P, Butour JL, Moisand C, Chalon P, Caput D, Vassart G, Meunier JC (1994) ORL1, a novel member of the opioid receptor family. Cloning, functional expression and localization. *FEBS Lett* 341(1):33-8.
- Monory K, Bourin MC, Spetea M, Tomboly C, Toth G, Matthes HW, Kieffer BL, Hanoune J, Borsodi A (2000) Specific activation of the mu opioid receptor (MOR) by endomorphin 1 and endomorphin 2. *Eur J Neurosci* 12(2):577-84.
- Montminy M (1997) Transcriptional regulation by cyclic AMP. *Annu Rev Biochem* 66:807-22.
- Moratalla R, Vickers EA, Robertson HA, Cochran BH, Graybiel AM (1993) Coordinate expression of c-fos and jun B is induced in the rat striatum by cocaine. *J Neurosci* 13(2):423-33.
- Moratalla R, Elibol B, Vallejo M, Graybiel AM (1996a) Network-level changes in expression of inducible Fos-Jun proteins in the striatum during chronic cocaine treatment and withdrawal. *Neuron* 17(1):147-56.
- Moratalla R, Xu M, Tonegawa S, Graybiel AM (1996b) Cellular responses to psychomotor stimulant and neuroleptic drugs are abnormal in mice lacking the D1 dopamine receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 93(25):14928-33.
- Morelli M, Fenu S, Di Chiara G (1989). Substantia nigra as a site of origin of dopamine-dependent motor syndromes induced by stimulation of mu and delta opioid receptors. *Brain Res* 487(1):120-30.
- Morgan JI, Curran T (1991) Stimulus-transcription coupling in the nervous system: involvement of the inducible proto-oncogenes fos and jun. *Annu Rev Neurosci* 14:421-51.
- Moriwaki A, Wang JB, Svingos A, Van Bockstaele E, Cheng P, Pickel V, Uhl GR (1996) mu Opiate receptor immunoreactivity in rat central nervous system. *Neurochem Res* 21(11):1315-31.
- Mrzljak L, Bergson C, Pappy M, Huff R, Levenson R, Goldman-Rakic PS (1996) Localization of dopamine D4 receptors in GABAergic neurons of the primate brain. *Nature* 381(6579):245-8.
- Mulder AH, Wardeh G, Hogenboom F, Frankhuyzen AL (1984) Kappa- and delta-opioid receptor agonists differentially inhibit striatal dopamine and acetylcholine release. *Nature* 308(5956):278-80.
- Muller DL, Unterwald EM (2005) D1 dopamine receptors modulate deltaFosB induction in rat striatum after intermittent morphine administration. *J Pharmacol Exp Ther* 314(1):148-54.
- Mumberg D, Lucibello FC, Schuermann M, Muller R (1991) Alternative splicing of fosB transcripts results in differentially expressed mRNAs encoding functionally antagonistic proteins. *Genes Dev* 5(7):1212-23.
- Murphy NP, Lam HA, Maidment NT (2001) A comparison of morphine-induced locomotor

- activity and mesolimbic dopamine release in C57BL6, 129Sv and DBA2 mice. *J Neurochem* 79(3):626-35.
- Nadal R, Rotllant D, Marquez C, Armario A (2005) Perseverance of exploration in novel environments predicts morphine place conditioning in rats. *Behav Brain Res* 165(1):72-9.
- 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(1):14-23.
- Naito A, Kita H (1994) The cortico-nigral projection in the rat: an anterograde tracing study with biotinylated dextran amine. *Brain Res* 637(1-2):317-22.
- Nakabeppu Y, Nathans D (1991) A naturally occurring truncated form of FosB that inhibits Fos/Jun transcriptional activity. *Cell* 64(4):751-9.
- 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(5703):423-7.
- Narita M, Narita M, Mizoguchi H, Tseng LF (1995) Inhibition of protein kinase C, but not of protein kinase A, blocks the development of acute antinociceptive tolerance to an intrathecally administered mu-opioid receptor agonist in the mouse. *Eur J Pharmacol* 280(2):R1-3.
- Narita M, Mizuo K, Mizoguchi H, Sakata M, Narita M, Tseng LF, Suzuki T (2003) Molecular evidence for the functional role of dopamine D3 receptor in the morphine-induced rewarding effect and hyperlocomotion. *J Neurosci* 23(3):1006-12.
- Narita M, Suzuki M, Narita M, Niikura K, Nakamura A, Miyatake M, Yajima Y, Suzuki T (2006) mu-Opioid receptor internalization-dependent and -independent mechanisms of the development of tolerance to mu-opioid receptor agonists: Comparison between etorphine and morphine. *Neuroscience* 138(2):609-19.
- Nayak S, Cassaday HJ (2003) The novel dopamine D4 receptor agonist (PD 168,077 maleate): doses with different effects on locomotor activity are without effect in classical conditioning. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 27(3):441-9.
- Neal CR Jr, Mansour A, Reinscheid R, Nothacker HP, Civelli O, Watson SJ Jr (1999) Localization of orphanin FQ (nociceptin) peptide and messenger RNA in the central nervous system of the rat. *J Comp Neurol* 406(4):503-47.
- Negus SS, Henriksen SJ, Mattox A, Pasternak GW, Portoghese PS, Takemori AE, Weinger MB, Koob GF (1993) Effect of antagonists selective for mu, delta and kappa opioid receptors on the reinforcing effects of heroin in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 265(3):1245-52.
- Nemmani KV, Lalonde J, Mogil JS (2005) Region-specific changes of calcium/calmodulin-dependent protein kinase IV in the mouse brain following chronic morphine treatment. *Neuroreport* 16(9):879-82.
- Nestler EJ, Tallman JF (1988) Chronic morphine treatment increases cyclic AMP-dependent protein kinase activity in the rat locus coeruleus. *Mol Pharmacol* 33(2):127-32.
- Nestler EJ (1992) Molecular mechanisms of drug addiction. *J Neurosci* 12(7):2439-50.
- Nestler EJ, Hope BT, Widnell KL (1993a) Drug addiction: a model for the molecular basis of neural plasticity. *Neuron* 11(6):995-1006.
- Nestler EJ, Bergson CM, Gultart X, Hope BT (1993b) Regulation of neural gene expression in opiate and cocaine addiction. *NIDA Res Monogr* 125:92-116.
- Nestler EJ, Berhow MT, Brodtkin ES (1996) Molecular mechanisms of drug addiction: adaptations in signal transduction pathways. *Mol Psychiatry* 1(3):190-9.
- Nestler EJ, Aghajanian GK (1997) Molecular and cellular basis of addiction. *Science* 278(5335):58-63.
- Nestler EJ, Kelz MB, Chen J (1999) DeltaFosB: a molecular mediator of long-term neural and behavioral plasticity. *Brain Res* 835(1):10-7.
- Nestler EJ, Barrot M, Self DW (2001) Δ FosB: A sustained molecular switch for addiction. *PNAS* 98(20):11042-46.
- Nestler EJ (2004a) Historical review: Molecular and cellular mechanisms of opiate and cocaine addiction. *Trends Pharmacol Sci* 25(4):210-8.
- Nestler EJ (2004b) Molecular mechanisms of drug addiction. *Neuropharmacology* 47(Suppl 1):24-32.
- Newton SS, Thome J, Wallace TL, Shirayama Y, Schlesinger L, Sakai N, Chen J, Neve R, Nestler EJ, Duman RS (2002) Inhibition of cAMP response element-binding protein or dynorphin in the nucleus accumbens

- produces an antidepressant-like effect. *J Neurosci* 22(24):10883-90.
- Nguyen TV, Kosofsky BE, Birnbaum R, Cohen BM, Hyman SE (1992) Differential expression of c-fos and zif268 in rat striatum after haloperidol, clozapine, and amphetamine. *Proc Natl Acad Sci USA* 89(10):4270-4.
- Nieoullon A, Cheramy A, Glowinski J (1978) Release of dopamine evoked by electrical stimulation of the motor and visual areas of the cerebral cortex in both caudate nuclei and in the substantia nigra in the cat. *Brain Res* 145(1):69-83.
- Nishina H, Sato H, Suzuki T, Sato M, Iba H (1990) Isolation and characterization of fra-2, an additional member of the fos gene family. *Proc Natl Acad Sci USA* 87(9):3619-23.
- Noble F, Cox BM (1995) Differential regulation of D₁ dopamine receptor- and of A_{2a} adenosine receptor-stimulated adenylyl cyclase by μ -, δ_1 - and δ_2 -opioid agonists in rat caudate-putamen. *J Neurochem* 65: 125-33.
- 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(5846):202-6.
- Nothacker HP, Reinscheid R, Mansour A, Henningsen RA, Ardati A, Monsma FJ Jr, Watson SJ, Civelli O (1996) Primary structure and tissue distribution of the orphanin FQ precursor. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 8677-82.
- Nye H, Hope BT, Kelz M, Iadarola M, Nestler EJ (1995) Pharmacological studies of the regulation of chronic FOS-related antigen induction by cocaine in the striatum and nucleus accumbens. *J Pharmacol Exp Ther* 275:1671-80.
- Nye HE, Nestler EJ (1996) Induction of chronic Fos-related antigens in rat brain by chronic morphine administration. *Mol Pharmacol* 49:636-45.
- Nylander I, Terenius L (1987) Dopamine receptors mediate alterations in striato-nigral dynorphin and substance P pathways. *Neuropharmacology* 26:1295-1302.
- Oak JN, Oldenhof J, Van Tol HH (2000) The dopamine D(4) receptor: one decade of research. *Eur J Pharmacol* 405(1-3):303-27.
- Oakley RH, Laporte SA, Holt JA, Caron MG, Barak LS (2000) Differential affinities of visual arrestin, beta arrestin1, and beta arrestin2 for G protein-coupled receptors delineate two major classes of receptors. *J Biol Chem* 275(22):17201-10.
- Ogier-Denis E, Petiot A, Bauvy C, Codogno P (1997) Control of the expression and activity of the Galpha-interacting protein (GAIP) in human intestinal cells. *J Biol Chem* 272(39):24599-603.
- Ohmstede CA, Jensen KF, Sahyoun NE (1989) Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase enriched in cerebellar granule cells. Identification of a novel neuronal calmodulin-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 264(10):5866-75.
- Okajima F, Tomura H, and Kondo Y (1993) Enkephalin activates the phospholipase C/Ca system through cross-talk between opioid receptors and P-2-purinergic or bradykinin receptors in NG108-15 cells. A permissive role for pertussis toxin-sensitive G proteins. *Biochem J* 290: 241-7.
- Oliverio A, Castellano C (1981) Behavioral effects of opiates: a pharmacogenetic analysis. *Curr Dev Psychopharmacol* 6:45-64.
- 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(2):1285-97.
- Ouimet CC, Langley-Gullion KC, Greengard P (1998) Quantitative immunocytochemistry of DARPP-32-expressing neurons in the rat caudatoputamen. *Brain Res* 808(1):8-12.
- Overton P, Clark D (1992) Ionophoretically administered drugs acting at the N-methyl-D-aspartate receptor modulate burst firing in A9 dopamine neurons in the rat. *Synapse* 10(2):131-40.
- Parent A, Hazrati LN (1995a) Functional anatomy of the basal ganglia. I. The cortico-basal ganglia-thalamo-cortical loop. *Brain Res Rev* 20(1):91-127.
- Parent A, Hazrati LN (1995b) Functional anatomy of the basal ganglia. II. The place of subthalamic nucleus and external pallidum in basal ganglia circuitry. *Brain Res Rev* 20(1):128-54.
- Park MR, Lighthall JW, Kitai ST (1980) Recurrent inhibition in the rat neostriatum. *Brain Res* 194(2):359-69.
- Patel S, Freedman S, Chapman KL, Emms F, Fletcher AE, Knowles M, Marwood R, Mcallister G, Myers J, Curtis N, Kulagowski JJ, Leeson PD, Ridgill M, Graham M, Matheson S, Rathbone D, Watt AP, Bristow LJ, Rupniak NM, Baskin E, Lynch JJ, Ragan CI (1997) Biological profile of L-745,870, a selective antagonist with high affinity for the

- dopamine D4 receptor. *J Pharmacol Exp Ther* 283(2):636-47.
- Pavon N, Martin AB, Mendiola A, Moratalla R (2006) ERK phosphorylation and FosB expression are associated with L-DOPA-induced dyskinesia in hemiparkinsonian mice. *Biol Psychiatry* 59(1):64-74.
- Paxinos G and Watson C (2001) The rat brain in stereotaxic coordinates. Academic Press, Sydney (Australia).
- Pearson G, Robinson F, Beers Gibson T, Xu BE, Karandikar M, Berman K, Cobb MH (2001) Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev* 22(2):153-83.
- Peckys D, Landwehrmeyer GB (1999) Expression of mu, kappa, and delta opioid receptor messenger RNA in the human CNS: a 33P in situ hybridization study. *Neuroscience* 88(4):1093-135.
- Persico AM, Schindler CW, O'Hara BF, Brannock MT, Uhl GR (1993) Brain transcription factor expression: effects of acute and chronic amphetamine and injection stress. *Mol Brain Res* 20(1-2):91-100.
- Pert CB, Kuhar MJ, Snyder SH (1976) Opiate receptor: autoradiographic localization in rat brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 73(10):3729-33.
- Pham TA, Impey S, Storm DR, Stryker MP (1999) CRE-mediated gene transcription in neocortical neuronal plasticity during the developmental critical period. *Neuron* 22(1):63-72.
- Piazza CC, Fisher WW, Hanley GP, Hilker K, Derby KM (1996) A preliminary procedure for predicting the positive and negative effects of reinforcement-based procedures. *J Appl Behav Anal* 29(2):137-52.
- Pickel VM, Chan J, Sesack SR (1993) Cellular substrates for interactions between dynorphin terminals and dopamine dendrites in rat ventral tegmental area and substantia nigra. *Brain Res* 602(2):275-89.
- Pierce RC, Kalivas PW (1997) A circuitry model of the expression of behavioral sensitization to amphetamine-like psychostimulants. *Brain Res Rev* 25(2):192-216.
- Pierce KL, Luttrell LM, Lefkowitz RJ (2001) New mechanisms in heptahelical receptor signaling to mitogen activated protein kinase cascades. *Oncogene* 20(13):1532-9.
- Pierce RC, Kumaresan V (2006) The mesolimbic dopamine system: the final common pathway for the reinforcing effect of drugs of abuse? *Neurosci Biobehav Rev* 30(2):215-38.
- Ponce G, Rodriguez-Jimenez R, Perez JA, Monasor R, Rubio G, Jimenez MA, Palomo T (2000) Attention-deficit hyperactivity disorder and vulnerability to the development of alcoholism: use of the Wender-Utah Rating Scale for retrospective diagnostic of ADHD in the childhood of alcoholic patients. *Actas Esp Psiquiatr* 28(6):357-66.
- Pontieri FE, Tanda G, Di Chiara G (1995) Intravenous cocaine, morphine, and amphetamine preferentially increase extracellular dopamine in the "shell" as compared with the "core" of the rat nucleus accumbens. *Proc Natl Acad Sci USA* 92(26):12304-8.
- Post RM, Rose H (1976) Increasing effects of repetitive cocaine administration in the rat. *Nature* 260(5553):731-2.
- Pothos E, Rada P, Mark GP, Hoebel BG (1991) Dopamine microdialysis in the nucleus accumbens during acute and chronic morphine, naloxone-precipitated withdrawal and clonidine treatment. *Brain Res* 566(1-2):348-50.
- Pouyssegur J, Lenormand P (2003) Fidelity and spatio-temporal control in MAP kinase (ERKs) signalling. *Eur J Biochem* 270(16):3291-9.
- Powell SB, Paulus MP, Hartman DS, Godel T, Geyer MA (2003) RO-10-5824 is a selective dopamine D4 receptor agonist that increases novel object exploration in C57 mice. *Neuropharmacology* 44(4):473-81.
- Pozzi L, Hakansson K, Usiello A, Borgkvist A, Lindskog M, Greengard P, Fisone G (2003) Opposite regulation by typical and atypical anti-psychotics of ERK1/2, CREB and Elk-1 phosphorylation in mouse dorsal striatum. *J Neurochem* 86(2):451-9.
- Prensa L, Parent A, Gimenez-Amaya JM (1999) Compartmentalized organization of human corpus striatum. *Rev Neurol* 28(5):512-9.
- Przewlocka B, Turchan J, Lason W, Przewlocki R (1996) The effect of single and repeated morphine administration on the prodynorphin system activity in the nucleus accumbens and striatum of the rat. *Neuroscience* 70(3):749-54.
- Prossnitz ER (2004) Novel roles for arrestins in the post-endocytic trafficking of G protein-coupled receptors. *Life Sci* 75(8):893-9.
- Punch LJ, Self DW, Nestler EJ, Taylor JR (1997) Opposite modulation of opiate withdrawal behaviors on microinfusion of a protein kinase A inhibitor versus activator into the locus

- coeruleus or periaqueductal gray. *J Neurosci* 17(21):8520-7.
- Quadros IM, Nobrega JN, Hipolide DC, Souza-Formigoni ML (2005) Increased brain dopamine D4-like binding after chronic ethanol is not associated with behavioral sensitization in mice. *Alcohol* 37(2):99-104.
- Rada P, Mark GP, Pothos E, Hoebel BG (1991) Systemic morphine simultaneously decreases extracellular acetylcholine and increases dopamine in the nucleus accumbens of freely moving rats. *Neuropharmacology* 30(10):1133-6.
- Raehal KM, Bohn LM (2005) Mu opioid receptor regulation and opiate responsiveness. *AAPS J* 7(3):E587-91.
- Raman IM, Tong G, Jahr CE (1996) Beta-adrenergic regulation of synaptic NMDA receptors by cAMP-dependent protein kinase. *Neuron* 16(2):415-21.
- Raynor K, Kong H, Chen Y, Yasuda K, Yu L, Bell GI, Reisine T (1994) Pharmacological characterization of the cloned kappa-, delta- and mu-opioid receptors. *Mol Pharmacol* 45(2):330-4.
- Reid M, Herrera-Marschitz M, Hokfelt T, Terenius L, Ungerstedt U (1988) Differential modulation of striatal dopamine release by intranigral injection of gamma-aminobutyric acid (GABA), dynorphin A and substance P. *Eur J Pharmacol* 147(3):411-20.
- Reiner A, Anderson KD (1990) The patterns of neurotransmitter and neuropeptide co-occurrence among striatal projection neurons: conclusions based on recent findings. *Brain Res Rev* 15(3):251-65.
- Reinscheid RK, Nothacker HP, Bourson A, Ardati A, Henningsen RA, Bunzow JR, Grandy DK, Langen H, Monsma FJ Jr, Civelli O (1995) Orphanin FQ: a neuropeptide that activates an opioidlike G protein-coupled receptor. *Science* 270(5237):792-4.
- Ribeiro SC, Kennedy SE, Smith YR, Stohler CS, Zubieta JK (2005) Interface of physical and emotional stress regulation through the endogenous opioid system and mu-opioid receptors. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 29(8):1264-80.
- Rivera A, Cuellar B, Giron FJ, Grandy DK, de la Calle A, Moratalla R (2002a). Dopamine D4 receptors are heterogeneously distributed in the striosomes/matrix compartments of the striatum. *J Neurochem* 80(2):219-29.
- Rivera A, Alberti I, Martin AB, Narvaez JA, de la Calle A, Moratalla R (2002b) Molecular phenotype of rat striatal neurons expressing the dopamine D5 receptor subtype. *Eur J Neurosci* 16(11):2049-58.
- Rivera A, Trias S, Penafiel A, Angel Narvaez J, Diaz-Cabiale Z, Moratalla R, de la Calle A (2003). Expression of D4 dopamine receptors in striatonigral and striatopallidal neurons in the rat striatum. *Brain Res* 989(1):35-41.
- Robbins TW, Everitt BJ (2002) Limbic-striatal memory systems and drug addiction. *Neurobiol Learn Mem* 78(3):625-36.
- Roberts DC, Koob GF (1982) Disruption of cocaine self-administration following 6-hydroxydopamine lesions of the ventral tegmental area in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 17(5):901-4.
- Robertson HA, Peterson MR, Murphy K, Robertson GS (1989) D1-dopamine receptor agonists selectively activate striatal c-fos independent of rotational behaviour. *Brain Res* 503(2):346-9.
- Robertson GS, Vincent SR, Fibiger HC (1990) Striatonigral projection neurons contain D1 dopamine receptor-activated c-fos. *Brain Res* 523(2):288-90.
- Robertson GS, Fibiger HC (1992) Neuroleptics increase c-fos expression in the forebrain: contrasting effects of haloperidol and clozapine. *Neuroscience* 46(2):315-28.
- Robertson GS, Vincent SR, Fibiger HC (1992) D1 and D2 dopamine receptors differentially regulate c-fos expression in striatonigral and striatopallidal neurons. *Neuroscience* 49(2):285-96.
- Robinson TE, Becker JB (1986) Enduring changes in brain and behavior produced by chronic amphetamine administration: a review and evaluation of animal models of amphetamine psychosis. *Brain Res* 396(2):157-98.
- Robinson TE, Berridge KC (1993) The neural basis of drug craving: an incentive-sensitization theory of addiction. *Brain Res* 18:247-91.
- Robinson TE, Kolb B (1999) Morphine alters the structure of neurons in the nucleus accumbens and neocortex of rats. *Synapse* 33(2):160-2.
- Robinson TE, Berridge KC (2000) The psychology and neurobiology of addiction: an incentive-sensitization view. *Addiction* 95 (Suppl 2):211-17.
- Romualdi P, Lesa G, Ferri S (1991) Chronic opiate agonists down-regulate prodynorphin gene expression in rat brain. *Brain Res* 563(1-2):132-6.

- Rossetti ZL, Hmaidan Y, Gessa GL (1992) Marked inhibition of mesolimbic dopamine release: a common feature of ethanol, morphine, cocaine and amphetamine abstinence in rats. *Eur J Pharmacol* 221(2-3):227-34.
- Rossier J (1988) Biosynthesis of opioid peptides. *Ann Endocrinol (Paris)* 49(4-5):371-3.
- Rowe DC, Stever C, Giedinghagen LN, Gard JM, Cleveland HH, Terris ST, Mohr JH, Sherman S, Abramowitz A, Waldman ID (1998) Dopamine DRD4 receptor polymorphism and attention deficit hyperactivity disorder. *Mol Psychiatry* 3(5):419-26.
- Rubinstein M, Phillips TJ, Bunzow JR, Falzone TL, Dziewczapolski G, Zhang G, Fang Y, Larson JL, McDougall JA, Chester JA, Saez C, Pugsley TA, Gershanik O, Low MJ, Grandy DK (1997) Mice lacking dopamine D4 receptors are supersensitive to ethanol, cocaine, and methamphetamine. *Cell* 90(6):991-1001.
- Rubinstein M, Cepeda C, Hurst RS, Flores-Hernandez J, Ariano MA, Falzone TL, Kozell LB, Meshul CK, Bunzow JR, Low MJ, Levine MS, Grandy DK (2001) Dopamine D4 receptor-deficient mice display cortical hyperexcitability. *J Neurosci* 21(11):3756-63.
- Ryder K, Lau LF, Nathans D (1988) A gene activated by growth factors is related to the oncogene v-jun. *Proc Natl Acad Sci USA* 85(5):1487-91.
- Ryseck RP, Bravo R (1991) c-JUN, JUN B, and JUN D differ in their binding affinities to AP-1 and CRE consensus sequences: effect of FOS proteins. *Oncogene* 6(4):533-42.
- Sagar, S M; Sharp, F R; Curran, T (1988) Expression of c-fos protein in brain: metabolic mapping at the cellular level. *Science* 240(4857): 1328-31.
- Sakai N, Thome J, Newton SS, Chen J, Kelz MB, Steffen C, Nestler EJ, Duman RS (2002) Inducible and brain region-specific CREB transgenic mice. *Mol Pharmacol* 61(6):1453-64.
- Sassone-Corsi P, Visvader J, Ferland L, Mellon PL, Verma IM (1988) Induction of proto-oncogene fos transcription through the adenylate cyclase pathway: characterization of a cAMP-responsive element. *Genes Dev* 2(12A):1529-38.
- Schlosser B, Kudernatsch MB, Sutor B, ten Bruggencate G (1995) Delta, mu and kappa opioid receptor agonists inhibit dopamine overflow in rat neostriatal slices. *Neurosci Lett* 191(1-2):126-30.
- Schonthal A, Buscher M, Angel P, Rahmsdorf HJ, Ponta H, Hattori K, Chiu R, Karin M, Herrlich P (1989) The Fos and Jun/AP-1 proteins are involved in the downregulation of Fos transcription. *Oncogene* 4(5):629-36.
- Schulz S, Schreff M, Nuss D, Gramsch C, Holtt V (1996) Nociceptin/orphanin FQ and opioid peptides show overlapping distribution but not co-localization in pain-modulatory brain regions. *Neuroreport* 7(18):3021-5.
- Schutte J, Viallet J, Nau M, Segal S, Fedorko J, Minna J (1989) jun-B inhibits and c-fos stimulates the transforming and transactivating activities of c-jun. *Cell* 59(6):987-97.
- Searight HR, Burke JM, Rottnek F (2000) Adult ADHD: evaluation and treatment in family medicine. *Am Fam Physician* 62(9):2077-86, 2091-2.
- Self DW, Stein L (1992) The D1 agonists SKF 82958 and SKF 77434 are self-administered by rats. *Brain Res* 582(2):349-52.
- Seeman P, Van Tol HH (1994). Dopamine receptor pharmacology. *Trends Pharmacol Sci* 15: 264-70.
- Self DW, Stein L (1992) The D1 agonists SKF 82958 and SKF 77434 are self-administered by rats. *Brain Res* 582(2):349-52.
- Sever S (2002) Dynamin and endocytosis. *Curr Opin Cell Biol* 14(4):463-7.
- Sgambato V, Abo V, Rogard M, Besson MJ, Deniau JM (1997) Effect of electrical stimulation of the cerebral cortex on the expression of the Fos protein in the basal ganglia. *Neuroscience* 81(1):93-112.
- Shaham Y, Stewart J (1996) Effects of opioid and dopamine receptor antagonists on relapse induced by stress and re-exposure to heroin in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 125(4):385-91.
- Sharif NA, Hughes J (1989) Discrete mapping of brain Mu and delta opioid receptors using selective peptides: quantitative autoradiography, species differences and comparison with kappa receptors. *Peptides* 10(3):499-522.
- Sharma SK, Klee WA, Nirenberg M (1975) Dual regulation of adenylate cyclase accounts for narcotic dependence and tolerance. *Proc Natl Acad Sci USA* 72(8):3092-6.
- Sharp FR, Liu J, Nickolenko J, Bontempi B (1995) NMDA and D1 receptors mediate induction of c-fos and junB genes in striatum following morphine administration: implications for studies of memory. *Behav Brain Res* 66(1-2):225-30.

- Shaw-Lutchman TZ, Barrot M, Wallace T, Gilden L, Zachariou V, Impey S, Duman RS, Storm D, Nestler EJ (2002) Regional and cellular mapping of cAMP response element-mediated transcription during naltrexone-precipitated morphine withdrawal. *J Neurosci* 22(9):3663-72.
- Shaywitz AJ, Greenberg ME (1999) CREB: a stimulus-induced transcription factor activated by a diverse array of extracellular signals. *Annu Rev Biochem* 68:821-61.
- Sheng M, Greenberg ME (1990) The regulation and function of c-fos and other immediate early genes in the nervous system. *Neuron* 4(4):477-85.
- Sheng M, McFadden G, Greenberg ME (1990) Membrane depolarization and calcium induce c-fos transcription via phosphorylation of transcription factor CREB. *Neuron* 4(4):571-82.
- Shigemoto R, Nakanishi S, Mizuno N (1992) Distribution of the mRNA for a metabotropic glutamate receptor mGluR1 in the central nervous system: An *in situ* hybridization study in adult and developing rat. *J Comp Neurol* 322: 121-35.
- Shippenberg TS, Herz A (1987) Place preference conditioning reveals the involvement of D1-dopamine receptors in the motivational properties of mu- and kappa-opioid agonists. *Brain Res* 436(1):169-72.
- Shippenberg TS, Elmer GI (1998) The neurobiology of opiate reinforcement. *Crit Rev Neurobiol* 12(4):267-303.
- Shuster L, Webster GW, Yu G (1975) Increased running response to morphine in morphine-pretreated mice. *J Pharmacol Exp Ther* 192(1):64-7.
- Sirinathsinghji DJ, Schuligoi R, Heavens RP, Dixon A, Iversen SD, Hill RG (1994) Temporal changes in the messenger RNA levels of cellular immediate early genes and neurotransmitter/receptor genes in the rat neostriatum and substantia nigra after acute treatment with eticlopride, a dopamine D2 receptor antagonist. *Neuroscience* 62(2):407-23.
- Sklair-Tavron L, Shi WX, 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(20):11202-7.
- Slepnev VI, Ochoa GC, Butler MH, Grabs D, De Camilli P (1998) Role of phosphorylation in regulation of the assembly of endocytic coat complexes. *Science* 281(5378):821-4.
- Smart D, Hirst RA, Hirota K, Grandy DK, and Lambert DG (1997) The effects of recombinant rat mu-opioid receptor activation in CHO cells in phospholipase C, [Ca] and adenylyl cyclase. *Br J Pharmacol* 120: 1165-71.
- Smith Y, Bevan MD, Shink E, Bolam JP (1998) Microcircuitry of the direct and indirect pathways of the basal ganglia. *Neuroscience* 86(2):353-87.
- Snyder GL, Fienberg AA, Haganir RL, Greengard P (1998) A dopamine/D1 receptor/protein kinase A/dopamine- and cAMP-regulated phosphoprotein (Mr 32 kDa)/protein phosphatase-1 pathway regulates dephosphorylation of the NMDA receptor. *J Neurosci* 18(24):10297-303.
- Solanto MV (2002) Dopamine dysfunction in AD/HD: integrating clinical and basic neuroscience research. *Behav Brain Res* 130(1-2):65-71.
- Sora I, Funada M, Uhl GR (1997) The mu-opioid receptor is necessary for [D-Pen2,D-Pen5]enkephalin-induced analgesia. *Eur J Pharmacol* 324(2-3):R1-2.
- Spanagel R, Herz A, Shippenberg TS (1992) Opposing tonically active endogenous opioid systems modulate the mesolimbic dopaminergic pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 89(6):2046-50.
- Spanagel R, Shippenberg TS (1993) Modulation of morphine induced sensitization by endogenous K-opioid systems. *Neurosci Lett* 153: 232-6.
- Spangler R, Zhou Y, Maggos CE, Schlussman SD, Ho A, Kreek MJ (1997) Prodynorphin, proenkephalin and kappa opioid receptor mRNA responses to acute "binge" cocaine. *Mol Brain Res* 44(1):139-42.
- Slepnev VI, Ochoa GC, Butler MH, Grabs D, De Camilli P (1998) Role of phosphorylation in regulation of the assembly of endocytic coat complexes. *Science* 281(5378):821-4.
- Spivak B, Vered Y, Yoran-Hegesh R, Averbuch E, Mester R, Graf E, Weizman A (1999) Circulatory levels of catecholamines, serotonin and lipids in attention deficit hyperactivity disorder. *Acta Psychiatr Scand* 99(4):300-4.
- Stansfield KH, Kirstein CL (2006) Effects of novelty on behavior in the adolescent and adult rat. *Dev Psychobiol* 48(1):10-5.
- Steiner H, Gerfen CR (1993) Cocaine-induced c-fos messenger RNA is inversely related to dynorphin expression in striatum. *J Neurosci* 13(12):5066-81.

- Steiner H, Gerfen CR (1999) Enkephalin regulates acute D2 dopamine receptor antagonist-induced immediate-early gene expression in striatal neurons. *Neuroscience* 88(3):795-810.
- Stengaard-Pedersen K, Larsson LI (1981) Comparative immunocytochemical localization of putative opioid ligands in the central nervous system. *Histochemistry* 73(1):89-114.
- Stewart J, Badiani A (1993) Tolerance and sensitization to the behavioral effects of drugs. *Behav Pharmacol* 4(4):289-312.
- Suzuki T, Kobayashi K, Nagatsu T (1995) Genomic structure and tissue distribution of the mouse dopamine D4 receptor. *Neurosci Lett* 199(1):69-72.
- Suzuki T, Kishimoto Y, Misawa M, Nagase H, Takeda F (1999) Role of the kappa-opioid system in the attenuation of the morphine-induced place preference under chronic pain. *Life Sci* 64(1):PL1-7.
- Sgambato V, Abo V, Rogard M, Besson MJ, Deniau JM (1997) effect of electrical stimulation of the cerebral cortex on the expression of the fos protein in the basal ganglia. *Neuroscience* 81(1):93-112.
- Svenningsson P, Nishi A, Fisone G, Girault JA, Nairn AC, Greengard P (2004) DARPP-32: an integrator of neurotransmission. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 44:269-96.
- Svingos AL, Moriwaki A, Wang JB, Uhl GR, Pickel VM (1996) Ultrastructural immunocytochemical localization of mu-opioid receptors in rat nucleus accumbens: extrasynaptic plasmalemmal distribution and association with Leu5-enkephalin. *J Neurosci* 16(13):4162-73.
- Svingos AL, Periasamy S, Pickel VM (2000) Presynaptic dopamine D(4) receptor localization in the rat nucleus accumbens shell. *Synapse* 36(3):222-32.
- Swanson JM, Sunohara GA, Kennedy JL, Regino R, Fineberg E, Wigal T, Lerner M, Williams L, LaHoste GJ, Wigal S (1998) Association of the dopamine receptor D4 (DRD4) gene with a refined phenotype of attention deficit hyperactivity disorder (ADHD): a family-based approach. *Mol Psychiatry* 3(1):38-41.
- Sweatt JD (2001) The neuronal MAP kinase cascade: a biochemical signal integration system subserving synaptic plasticity and memory. *J Neurochem* 76(1):1-10.
- Szucs RP, Frankel PS, McMahon LR, Cunningham KA (2005) Relationship of cocaine-induced c-Fos expression to behaviors and the role of serotonin 5-HT2A receptors in cocaine-induced c-Fos expression. *Behav Neurosci* 119(5):1173-83.
- Taber MT, Fibiger HC (1993) Electrical stimulation of the medial prefrontal cortex increases dopamine release in the striatum. *Neuropsychopharmacology* 9(4):271-5.
- Tarazi FI, Kula NS, Baldessarini RJ (1997) Regional distribution of dopamine D4 receptors in rat forebrain. *Neuroreport* 8(16):3423-6.
- Tarazi FI, Campbell A, Yeghiayan SK, Baldessarini RJ (1998) Localization of dopamine receptor subtypes in corpus striatum and nucleus accumbens septi of rat brain: comparison of D1-, D2-, and D4-like receptors. *Neuroscience* 83(1):169-76.
- Tarazi FI, Zhang K, Baldessarini RJ (2004) Dopamine D4 receptors: beyond schizophrenia. *J Recept Signal Transduct Res* 24(3):131-47.
- Tegeder I, Geisslinger G (2004) Opioids as modulators of cell death and survival-unraveling mechanisms and revealing new indications. *Pharmacol Rev* 56(3):351-69.
- Tempel A, Zukin RS (1987) Neuroanatomical patterns of the mu, delta, and kappa opioid receptors of rat brain as determined by quantitative in vitro autoradiography. *Proc Natl Acad Sci USA* 84(12):4308-12.
- Terwilliger RZ, Beitner-Johnson D, Sevarino KA, Crain SM, Nestler EJ (1991) A general role for adaptations in G-proteins and the cyclic AMP system in mediating the chronic actions of morphine and cocaine on neuronal function. *Brain Res* 548(1-2):100-10.
- Testa CM, Standaert DG, Young AB, Penney Jr. JB (1994) Metabotropic glutamate receptor mRNA expression in the basal ganglia of the rat. *J Neurosci* 14:3005-18.
- Thompson RC, Mansour A, Akil H, Watson SJ (1993) Cloning and pharmacological characterization of a rat mu opioid receptor. *Neuron* 11(5):903-13.
- Thrasher MJ, Freeman PA, Risinger FO (1999) Clozapine's effects on ethanol's motivational properties. *Alcohol Clin Exp Res* 23(8):1377-85.
- Tibbles LA, Woodgett JR (1999) The stress-activated protein kinase pathways. *Cell Mol Life Sci* 55(10):1230-54.
- Toll L (1992) Comparison of mu opioid receptor binding on intact neuroblastoma cells with guinea pig brain and neuroblastoma cell

- membranes. *J Pharmacol Exp Ther* 260(1):9-15.
- Turchan J, Lason W, Budziszewska B, Przewlocka B (1997) Effects of single and repeated morphine administration on the prodynorphin, proenkephalin and dopamine D2 receptor gene expression in the mouse brain. *Neuropeptides* 31(1):24-8.
- Turgeon SM, Pollack AE, Fink JS (1997) Enhanced CREB phosphorylation and changes in c-Fos and FRA expression in striatum accompany amphetamine sensitization. *Brain Res* 749(1):120-6.
- Ueda H, Miyamae T, Hayashi C, Watanabe S, Fukushima N, Sasaki Y, Iwamura T, Misu Y (1995) Protein kinase C involvement in homologous desensitization of delta-opioid receptor coupled to Gi1-phospholipase C activation in *Xenopus* oocytes. *J Neurosci* 15(11):7485-99.
- Ueda H (2004) Locus-specific involvement of anti-opioid systems in morphine tolerance and dependence. *Ann NY Acad Sci* 1025:376-82.
- Uhl GR, Vandenbergh DJ, Rodriguez LA, Miner L, Takahashi N (1998) Dopaminergic genes and substance abuse. *Adv Pharmacol* 42:1024-32.
- Uhl GR, Sora I, Wang Z (1999) The mu opiate receptor as a candidate gene for pain: polymorphisms, variations in expression, nociception, and opiate responses. *Proc Natl Acad Sci USA* 96(14):7752-5.
- Umemoto S, Kawai Y, Senba E (1994) Differential regulation of IEGs in the rat PVH in single and repeated stress models. *Neuroreport* 6(1):201-4.
- Van Tol HH, Bunzow JR, Guan HC, Sunahara RK, Seeman P, Niznik HB, Civelli O (1991). Cloning of the gene for a human dopamine D4 receptor with high affinity for the antipsychotic clozapine. *Nature* 350(6319):610-4.
- Vanderschuren LJ, Tjon GH, Nestby P, Mulder AH, Schoffelmeer AN, De Vries TJ (1997) Morphine-induced long-term sensitization to the locomotor effects of morphine and amphetamine depends on the temporal pattern of the pretreatment regimen. *Psychopharmacology (Berl)* 131(2):115-22.
- 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(2-3):99-120.
- Vanderschuren LJ, Schoffelmeer AN, Van Leeuwen SD, Hof L, Jonker AJ, Voorn P (2002) Compartment-specific changes in striatal neuronal activity during expression of amphetamine sensitization are the result of drug hypersensitivity. *Eur J Neurosci* 16(12):2462-8.
- Vaught JL, Rothman RB, Westfall TC (1982) Mu and delta receptors: their role in analgesia in the differential effects of opioid peptides on analgesia. *Life Sci* 30(17):1443-55.
- Vincent S, Hokfelt T, Christensson I, Terenius L (1982) Immunohistochemical evidence for a dynorphin immunoreactive striato-nigral pathway. *Eur J Pharmacol* 85(2):251-2.
- Voorn P, Roest G, Groenewegen HJ (1987) Increase of enkephalin and decrease of substance P immunoreactivity in the dorsal and ventral striatum of the rat after midbrain 6-hydroxydopamine lesions. *Brain Res* 412(2):391-6.
- Walker JM, Thompson LA, Frascella J, Friederich MW (1987) Opposite effects of mu and kappa opiates on the firing-rate of dopamine cells in the substantia nigra of the rat. *Eur J Pharmacol* 134(1):53-9.
- Walter S, Kuschinsky K (1989) Conditioning of morphine-induced locomotor activity and stereotyped behaviour in rats. *J Neural Transm Gen Sect* 78(3):231-47.
- Walters CL, Kuo YC, Blendy JA (2003) Differential distribution of CREB in the mesolimbic dopamine reward pathway. *J Neurochem* 87(5):1237-44.
- Wan W, Ennulat DJ, Cohen BM (1995) Acute administration of typical and atypical antipsychotic drugs induces distinctive patterns of Fos expression in the rat forebrain. *Brain Res* 688(1-2):95-104.
- Wang JB, Imai Y, Eppler CM, Gregor P, Spivak CE, Uhl GR (1993). Mu opiate receptor: cDNA cloning and expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 90(21):10230-4.
- Wang JQ, Smith AJW, McGinty JF (1995) A single injection of amphetamine or methamphetamine induces dynamic alterations in c-fos, zif/268 and preprodynorphin messenger RNA expression in the rat forebrain. *Neuroscience* 68:83-95.
- Wang JQ, McGinty JF (1995a) Dose-dependent alteration in zif/268 and preprodynorphin mRNA expression induced by amphetamine or methamphetamine in rat forebrain. *J Pharmacol Exp Ther* 273(2):909-17.

- Wang JQ, McGinty JF (1995b) Alterations in striatal zif/268, preprodynorphin and preproenkephalin mRNA expression induced by repeated amphetamine administration in rats. *Brain Res* 673(2):262-74.
- Wang H, Moriwaki A, Wang JB, Uhl GR, Pickel VM (1996) Ultrastructural immunocytochemical localization of mu opioid receptors and Leu5-enkephalin in the patch compartment of the rat caudate-putamen nucleus. *J Comp Neurol* 375(4):659-74.
- Wang H, Moriwaki A, Wang JB, Uhl GR, Pickel VM (1997) Ultrastructural immunocytochemical localization of mu-opioid receptors in dendritic targets of dopaminergic terminals in the rat caudate-putamen nucleus. *Neuroscience* 81(3):757-71.
- Wang JQ, McGinty JF (1998) Metabotropic glutamate receptor agonist increases neuropeptide mRNA expression in rat striatum. *Mol Brain Res* 54(2):262-9.
- Wang H, Pickel VM (1998) Dendritic spines containing mu-opioid receptors in rat striatal patches receive asymmetric synapses from prefrontal corticostriatal afferents. *J Comp Neurol* 396(2):223-37.
- Wang H, Pickel VM (2000) Presence of NMDA-type glutamate receptors in cingulate corticostriatal terminals and their postsynaptic targets. *Synapse* 35(4):300-10.
- Wang X, Zhong P, Yan Z (2002) Dopamine D4 receptors modulate GABAergic signaling in pyramidal neurons of prefrontal cortex. *J Neurosci* 22(21):9185-93.
- Wang X, Zhong P, Gu Z, Yan Z (2003) Regulation of NMDA receptors by dopamine D4 signaling in prefrontal cortex. *J Neurosci* 23(30):9852-61.
- Ward HG, Simansky KJ (2006) Chronic prevention of micro-opioid receptor (MOR) G-protein coupling in the pontine parabrachial nucleus persistently decreases consumption of standard but not palatable food. *Psychopharmacology (Berl)* 187(4):435-46.
- Watanabe Y, Stone E, McEwen BS (1994) Induction and habituation of c-fos and zif/268 by acute and repeated stressors. *Neuroreport* 5(11):1321-4.
- Way EL, Loh HH, Shen FH (1969) Simultaneous quantitative assessment of morphine tolerance and physical dependence. *J Pharmacol Exp Ther* 167(1):1-8.
- Weber E, Roth KA, Barchas JD (1982) Immunohistochemical distribution of alpha-neo-endorphin/dynorphin neuronal systems in rat brain: evidence for colocalization. *Proc Natl Acad Sci USA* 79(9):3062-6.
- Wedzony K, Chocyk A, Mackowiak M, Fijał K, Czyrak A (2000) Cortical localization of dopamine D4 receptors in the rat brain-immunocytochemical study. *J Physiol Pharmacol* 51(2):205-21.
- Weiner DM, Levey AI, Sunahara RK, Niznik HB, O'Dowd BF, Seeman P, Brann MR (1991) D1 and D2 dopamine receptor mRNA in rat brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 88(5):1859-63.
- Weiss-Wunder LT, Chesselet MF (1990) Heterogeneous distribution of cytochrome oxidase activity in the rat substantia nigra: correlation with tyrosine hydroxylase and dynorphin immunoreactivities. *Brain Res* 529(1-2):269-76.
- Wender PH, Wolf LE, Wasserstein J (2001) Adults with ADHD. An overview. *Ann NY Acad Sci* 931:1-16.
- Westerink BH, Santiago M, De Vries JB (1992) The release of dopamine from nerve terminals and dendrites of nigrostriatal neurons induced by excitatory amino acids in the conscious rat. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 345(5):523-9.
- Westphal RS, Tavalin SJ, Lin JW, Alto NM, Fraser ID, Langeberg LK, Sheng M, Scott JD (1999) Regulation of NMDA receptors by an associated phosphatase-kinase signaling complex. *Science* 285(5424):93-6.
- White NM (1989) A functional hypothesis concerning the striatal matrix and patches: mediation of S-R memory and reward. *Life Sci* 45(21):1943-57.
- White NM (1997) Mnemonic functions of the basal ganglia. *Curr Opin Neurobiol* 7(2):164-9.
- White NM, Hiroi N (1998) Preferential localization of self-stimulation sites in striosomes/patches in the rat striatum. *Proc Natl Acad Sci USA* 95(11):6486-91.
- Wick MJ, Minnerath SR, Lin X, Elde R, Law PY, Loh HH (1994) Isolation of a novel cDNA encoding a putative membrane receptor with high homology to the cloned mu, delta, and kappa opioid receptors. *Mol Brain Res* 27(1):37-44.
- Widnell KL, Russell DS, Nestler EJ (1994) Regulation of expression of cAMP response element-binding protein in the locus coeruleus in vivo and in a locus coeruleus-like cell line in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 91(23):10947-51.

- Widnell KL, Self DW, Lane SB, Russell DS, Vaidya VA, Miserendino MJ, Rubin CS, Duman RS, Nestler EJ (1996) Regulation of CREB expression: in vivo evidence for a functional role in morphine action in the nucleus accumbens. *J Pharmacol Exp Ther* 276(1):306-15.
- Williams JT, Christie MJ, Manzoni O (2001) Cellular and synaptic adaptations mediating opioid dependence. *Physiol Rev* 81(1):299-343.
- Wilson CJ, Groves PM (1980) Fine structure and synaptic connections of the common spiny neuron of the rat neostriatum: a study employing intracellular inject of horseradish peroxidase. *J Comp Neurol* 194(3):599-615.
- Wise RA, Bozarth MA (1987) A psychomotor stimulant theory of addiction. *Psychol Rev* 94(4):469-92.
- Wise RA (2002) Brain reward circuitry: insights from unsensed incentives. *Neuron* 36(2):229-40.
- Wong AH, Van Tol HH (2003) The dopamine D4 receptors and mechanisms of antipsychotic atypicality. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 27(7):1091-9.
- Wong AH, Macciardi F, Klempan T, Kawczynski W, Barr CL, Lakatoo S, Wong M, Buckle C, Trakalo J, Boffa E, Oak J, Azevedo MH, Dourado A, Coelho I, Macedo A, Vicente A, Valente J, Ferreira CP, Pato MT, Pato CN, Kennedy JL, Van Tol HH (2003) Identification of candidate genes for psychosis in rat models, and possible association between schizophrenia and the 14-3-3eta gene. *Mol Psychiatry* 8(2):156-66.
- Wu X, McMurray CT (2001) Calmodulin kinase II attenuation of gene transcription by preventing cAMP response element-binding protein (CREB) dimerization and binding of the CREB-binding protein. *J Biol Chem* 276(3):1735-41.
- Yasuda K, Raynor K, Kong H, Breder CD, Takeda J, Reisine T, Bell GI (1993) Cloning and functional comparison of kappa and delta opioid receptors from mouse brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 90(14):6736-40.
- Yin JC, Tully T (1996) CREB and the formation of long-term memory. *Curr Opin Neurobiol* 6(2):264-8.
- Yoon SO, Chikaraishi DM (1992) Tissue-specific transcription of the rat tyrosine hydroxylase gene requires synergy between an AP-1 motif and an overlapping E box-containing dyad. *Neuron* 9(1):55-67.
- You ZB, Herrera-Marschitz M, Terenius L (1999) Modulation of neurotransmitter release in the basal ganglia of the rat brain by dynorphin peptides. *J Pharmacol Exp Ther* 290(3):1307-15.
- Yukhananov RY, Handa RJ (1997) Effect of morphine on proenkephalin gene expression in the rat brain. *Brain Res Bull* 43(3):349-56.
- Yung KK, Bolam JP, Smith AD, Hersch SM, Ciliax BJ, Levey AI (1995) Immunocytochemical localization of D1 and D2 dopamine receptors in the basal ganglia of the rat: light and electron microscopy. *Neuroscience* 65(3):709-30.
- Zadina JE, Hackler L, Ge LJ, Kastin AJ (1997) A potent and selective endogenous agonist for the mu-opiate receptor. *Nature* 386(6624):499-502.
- Zadina JE, Martin-Schild S, Gerall AA, Kastin AJ, Hackler L, Ge LJ, Zhang X (1999) Endomorphins: novel endogenous mu-opiate receptor agonists in regions of high mu-opiate receptor density. *Ann NY Acad Sci* 897:136-44.
- Zanassi P, Paolillo M, Feliciello A, Avvedimento EV, Gallo V, Schinelli S (2001) cAMP-dependent protein kinase induces cAMP-response element-binding protein phosphorylation via an intracellular calcium release/ERK-dependent pathway in striatal neurons. *J Biol Chem* 276(15):11487-95.
- Zerial M, Toschi L, Ryseck RP, Schuermann M, Muller R, Bravo R (1989) The product of a novel growth factor activated gene, fos B, interacts with JUN proteins enhancing their DNA binding activity. *EMBO J* 8(3):805-13.
- Zhang J, Barak LS, Winkler KE, Caron MG, Ferguson SS (1997a) A central role for beta-arrestins and clathrin-coated vesicle-mediated endocytosis in beta2-adrenergic receptor resensitization. Differential regulation of receptor resensitization in two distinct cell types. *J Biol Chem* 272(43):27005-14.
- Zhang J, Ferguson SS, Barak LS, Aber MJ, Giros B, Lefkowitz RJ, Caron MG (1997b) Molecular mechanisms of G protein-coupled receptor signaling: role of G protein-coupled receptor kinases and arrestins in receptor desensitization and resensitization. *Receptors Channels* 5(3-4):193-9.
- Zhang J, Ferguson SS, Barak LS, Bodduluri SR, Laporte SA, Law PY, Caron MG (1998) Role for G protein-coupled receptor kinase in agonist-specific regulation of mu-opioid receptor responsiveness. *Proc Natl Acad Sci USA* 95(12):7157-62.

- Zhang K, Tarazi FI, Baldessarini RJ (2000) Dopamine D(4) receptors in rat forebrain: unchanged with amphetamine-induced behavioral sensitization. *Neuroscience* 97(2):211-3.
- Zhang K, Tarazi FI, Baldessarini RJ (2001) Role of dopamine D(4) receptors in motor hyperactivity induced by neonatal 6-hydroxydopamine lesions in rats. *Neuropsychopharmacology* 25(5):624-32.
- Zhang K, Tarazi FI, Davids E, Baldessarini RJ (2002a) Plasticity of dopamine D4 receptors in rat forebrain: temporal association with motor hyperactivity following neonatal 6-hydroxydopamine lesioning. *Neuropsychopharmacology* 26(5): 625-33.
- Zhang K, Davids E, Tarazi FI, Baldessarini RJ (2002b) Effects of dopamine D4 receptor-selective antagonists on motor hyperactivity in rats with neonatal 6-hydroxydopamine lesions. *Psychopharmacology* 161(1):100-6.
- Zhang K, Grady CJ, Tsapakis EM, Andersen SL, Tarazi FI, Baldessarini RJ (2004) Regulation of working memory by dopamine D4 receptor in rats. *Neuropsychopharmacology* 29(9):1648-55.
- Zola-Morgan S, Squire LR (1993) Neuroanatomy of memory. *Annu Rev Neurosci* 16:547-63.
- Zukin RS, Sugarman JR, Fitz-Syage ML, Gardner EL, Zukin SR, Gintzler AR (1982) Naltrexone-induced opiate receptor supersensitivity. *Brain Res* 245(2):285-92.
- Zurawski G, Benedik M, Kamb BJ, Abrams JS, Zurawski SM, Lee FD (1986) Activation of mouse T-helper cells induces abundant preproenkephalin mRNA synthesis. *Science* 232(4751):772-5.

Apéndice

A. Soluciones tampón

1. Tampón fosfato (PB) 0.2 M, pH 7.3

Fosfato sódico monobásico monohidrato ($\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{-H}_2\text{O}$) (Merk)	6.9 g
Fosfato sódico bibásico dihidrato ($\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-2H}_2\text{O}$) (Merk)	26.7 g
Agua destilada	1,000 ml

Ajustar el pH a 7.3.

2. Tampón fosfato (PB) 0.1 M, pH 7.3

Fosfato sódico monobásico monohidrato ($\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{-H}_2\text{O}$) (Merk)	3.45 g
Fosfato sódico bibásico dihidrato ($\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-2H}_2\text{O}$) (Merk)	13.35 g
Agua destilada	1,000 ml

Ajustar el pH a 7.3.

3. Tampón fosfato salino (PBS) 0.1 M, pH 7.3

PB 0.1M pH 7.3	1,000 ml
Cloruro sódico (NaCl) (Panreac)	9 g

Ajustar el pH a 7.3

4. Tampón STE 150 mM, pH 8

Cloruro sódico (NaCl) (Panreac)	0.438 g
Tampón TE, pH 8	40 ml

Ajustar el pH a 8
Completar hasta 50 ml con tampón TE

5. Tampón TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8 + EDTA 1 mM, pH 8)

Tampón Tris-HCl 1 M, pH 8	10 ml
Tampón EDTA 0.5 M, pH 8	2 ml

Completar hasta 1 l con agua destilada

6. Tampón Tris-HCl 1 M, pH 8

Trizma [®] Base (Sigma-Aldrich)	121.1 g
Agua destilada	1,000 ml

Ajustar el pH a 8

7. Tampón EDTA 0.5 M pH 8

EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid) (Sigma-Aldrich)	186.1 g
Agua destilada	1,000 ml

Ajustar el pH a 8

8. Tampón Tris-HCl 50 mM, pH 7.4

Tampón Tris-HCl 1 M, pH 8	50 ml
Agua destilada	950 ml
Ajustar el pH a 7.4	

9. Tampón SSC 20x

Cloruro sódico (NaCl) (<i>Panreac</i>)	175.3 g
Citrato sódico tribásico dihidrato ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) (<i>Sigma-Aldrich</i>)	88.2 g
Agua destilada	1,000 ml
Ajustar el pH a 7	

10. Tampón SSC 1x

Tampón SSC 20x	100 ml
Agua destilada	1,900 ml

11. Acetato sódico 0.01 M, pH 5.2

Acetato sódico (CH_3COONa) (<i>Sigma-Aldrich</i>)	0.82 g
Agua destilada	1,000 ml
Ajusta el pH a 5.2.	

12. Poly(ethylenimine) al 2%

Poly(ethylenimine) al 50% (<i>Sigma-Aldrich</i>)	4 ml
Tampón Tris-HCl 1 M, pH 7.4	100 ml

B. Soluciones fijadoras**Paraformaldehído al 4% en PB 0.1 M, pH 7.3**

Paraformaldehído (<i>Merck</i>)	16 g
Agua destilada	200 ml
PB 0.2 M pH 7.3	200 ml

Modo de preparación

1. Calentar 100 ml de agua destilada a 60 °C y disolver 16 g de paraformaldehído. Añadir si es necesario 1-2 gotas de hidróxido sódico (NaOH) al 2.5% para su total disolución.
2. Filtrar y completar hasta 200 ml con agua destilada y dejar enfriar.
3. Añadir 200 ml de PB 0.2 M, pH 7.3.

C. Crioprotección del tejido**Sacarosa al 30% en PBS 0.1 M pH 7.3**

Sacarosa (<i>Panreac</i>)	300 g
Azida sódica (NaN_3) (<i>Panreac</i>)	0.2 g
Tampón PBS 0.1 M, pH 7.3	1,000 ml

D. Soluciones para inmunocitoquímica

Diluyente de anticuerpos primarios y secundarios

Azida sódica (NaN_3) (<i>Panreac</i>)	0.1 g
Tritón X-100 (<i>Sigma-Aldrich</i>)	20 μl
Tampón PBS 0.1 M, pH 7.3	10 ml

E. Histología

1. Solución para la conservación de las secciones de tejido

Azida sódica (NaN_3) (<i>Panreac</i>)	0.02 g
Tampón PBS 0.1 M, pH 7.3	1000 ml

2. Portaobjetos gelatinados

Gelatina (<i>Panreac</i>)	1 g
Sulfato de cromo y potasio dodecahidrato ($\text{KCr}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) (<i>Panreac</i>)	0.1 g
Agua destilada	200 ml

Modo de preparación

1. Calentar el agua a 60 °C.
2. Disolver la gelatina completamente y añadir posteriormente el sulfato de cromo y potasio.
3. Filtrar la solución antes de usar.

Proceso de gelatinado

1. Desengrasar los portaobjetos con una mezcla de alcohol:éter (1:1).
2. Sumergir los portaobjetos en la solución de gelatinado a 60 °C durante 1 minuto.
3. Dejar secar los portaobjetos durante 24 horas en una estufa a 37 °C.

F. Hibridación *in situ*

1. Marcaje de la sonda

Para marcar la sonda, añadir en un eppendorf estéril de 1.5 ml:

Agua destilada autoclavada	1.7 μl
Tampón de reacción (5x Co) (<i>Amersham Bioscience</i>)	2.6 μl
Sonda (2.4 pmol)	1.0 μl
^{33}P -dATP (<i>PerkinElmer</i>)	6 μl
Tdt (<i>Terminal deoxynucleotidyl transferase</i>) (<i>Amersham Bioscience</i>)	1.5 μl

Colocar en una estufa a 37 °C durante 30 minutos.

2. Purificación de la sonda

Para purificar la sonda se usó el kit *ProbeQuant G-50 Micro Columns* (*Amersham Bioscience*) siguiendo los siguientes pasos:

1. Resuspender la resina de las columnas agitando con un vortex. Girar un cuarto de vuelta el tapón de las columnas y quitar el fondo del tubo.
2. Colocar las columnas en un eppendorf de 1.5 ml y centrifugar 1 minuto a 3,000 rpm. Con cuidado colocar la columna en un nuevo eppendorf de 1.5 ml.

3. Añadir tampón STE 150 mM, pH 8 a la muestra hasta tener 50 μ l y añadirlo sobre la resina de la columna.
4. Centrifugar 2 minutos a 3,000 rpm.
5. Añadir 250 μ l de tampón STE 150 mM, pH 8.

3. Determinación del marcaje de la sonda

Añadir 2 μ l de la sonda marcada a 4 ml de líquido de centelleo y agitar. Medir la actividad en un contador de centelleo. El valor obtenido debe ser superior a 300,000 cpm.

4. Mezcla de hibridación

En cada ml de solución:

Solución de hibridación	900 μ l
ADN de esperma de salmón (10 mg/ml) (<i>Sigma-Aldrich</i>)	50 μ l
DTT 5 M	40 μ l
Sonda marcada	3.75 μ l/100 μ l solución de hibridación

Modo de preparación

1. Calentar a 37 °C la solución de hibridación y el DTT 5 M.
2. Hervir durante 10 minutos el ADN de esperma de salmón y colocarlo inmediatamente en hielo.
3. Calcular las cantidades de reactivos necesarias para obtener una relación de 150 μ l de solución de hibridación por portaobjeto utilizado en el estudio.
4. Mezclar el cocktail de hibridación, el ADN de esperma de salmón y el DTT 5 M y agitar con vortex antes de añadir la sonda marcada.

Solución de hibridación

Formamida desionizada (<i>Sigma-Aldrich</i>)	100 ml
20x SSC autoclavado	40 ml
100x Denhardt's	2 ml
20% lauroylsarcosine sodium (<i>Sigma-Aldrich</i>)	10 ml
PB 0.2M, pH 7 autoclavado	20 ml
Dextran sulfato (<i>Sigma-Aldrich</i>)	20 g

Modo de preparación

1. Disolver en un baño a 37 °C en agitación.
2. Filtrar (filtro con poro de 0.45 μ m) y guardar a -20 °C.

100x Denhardt's

Polyvinylpyrrolidone (PVP) (<i>Sigma-Aldrich</i>)	10 g
Ficoll (tipo 400) (<i>Amersham Bioscience</i>)	10 g
Albúmina de suero bovino (BSA) (<i>Sigma-Aldrich</i>)	10 g
Agua destilada	500 ml

Modo de preparación

1. Disolver en un baño a 37 °C en agitación.
2. Filtrar (filtro con poro de 0.45 μ m) y guardar a -20 °C.

DTT 5 M

DL-Dithiothreitol (DTT) (<i>Sigma-Aldrich</i>)	5 g
Acetato sódico 0.01 M, pH 5.2	3.24 ml

El volumen final será de 6.5-6.6 ml. Filtrar (filtro con poro de 0.45 μ m) y guardar a -20 °C.

5. Revelado de los films

Para revelar los films se utilizó el siguiente protocolo:

1. Sumergir en líquido revelador *LX 24 X-ray developer* (Kodak) durante 2.5 minutos.
2. Lavar en agua.
3. Sumergir en líquido fijador *AL-4 X-ray Fixer* (Kodak) durante 10 minutos.
4. Lavar abundantemente con agua.
5. Secar al aire libre.

G. Método Bradford**1. Construcción de la recta patrón**

1. Partiendo de una concentración de 1mg/ml de albúmina de suero bovino (BSA; *Sigma-Aldrich*) obtener 7 diluciones sucesivas (1000 μ g/ml-50 μ g/ml) con un factor de dilución 1:2.
2. Añadir 250 μ l del reactivo *Bio-Rad Protein Assay* (1:5) (*BioRad*) a 5 μ l de cada dilución. Hacer por duplicado.
3. Incubar a temperatura ambiente durante 15 minutos.
4. Medir la absorbancia a 570 nm y obtener la recta patrón por ajuste mediante regresión lineal.

2. Determinación cuantitativa de proteínas de muestras problemas

1. Añadir 250 μ l del reactivo *Bio-Rad Protein Assay* (1:5) (*BioRad*) a 5 μ l de muestra problema. Hacer por triplicado.
2. Incubar a temperatura ambiente durante 15 minutos.
3. Medir la absorbancia a 570 nm.
4. Interpolar los valores obtenidos en la recta patrón para conocer la concentración de proteína.

Manuscrito en inglés



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Departamento de Biología Celular, Genética y Fisiología

Dopaminergic D₄ Receptor/ μ Opioid Receptor
Interaction:
Role in Early Stage of Morphine Addition

Belén Gago Calderón

Málaga, 2007

ABBREVIATIONS

AC	adenilate cyclase
Acb	nucleus accumbens
ADHD	attention-deficit/hyperactivity disorder
AP-1	activator protein-1
AMP	adenosine 5'-monophosphate
ATF	activating transcription factor
ATP	adenosine 5'-triphosphate
B_{max}	number of binding sites
CaMK	Ca ²⁺ -Calmodulin-dependent protein kinase
cAMP	3'-5'-cyclic AMP
CPu	caudate putamen
CRE	cAMP response element
CREB	cAMP response-element binding protein
CREM	cAMP-response element modulator
DAG	1,2-diacylglycerol
DARPP-32	dopamine- and cAMP-regulated phosphoprotein of 32kDa
DL	dorso-lateral
DM	dorso-medial
DOR	δ opioid receptor
ERK	extracellular signal-regulated kinase
Fra	fos-related antigen
GABA	gamma-aminobutyric acid
GP	globus pallidus
GRK	G protein-couple receptor kinase
IP3	inositol 1,4,5-triphosphate
IP3R	IP3 receptor
IR	Immunoreactive
JNK	c-Jun N-terminal kinase
K_D	dissociation constant
KOR	κ opioid receptor
LC	locus cueruleus
LGP	lateral globus pallidus
MAPK	mitogen activated protein kinase
MGP	medial globus pallidus
MOR	μ opioid receptor
mRNA	messenger RNA
ORL1	orphan opioid-like receptor
PDYN	prodynorphin
PENK	proenkephalin
PKA	protein kinase A
PKC	protein kinase C
PLC	phospholipase C

POMC	proopiomelanocortin
PP-1	protein phosphatase 1
RNA	ribonucleic acid
RSK	MAPK-activated ribosomal S6 kinase
SAPK	stress-activated protein kinase
Ser	serine
SN	substantia nigra
SNC	substantia nigra pars compacta
SNR	substantia nigra pars reticulata
STh	subthalamic nucleus
Tdt	terminal deoxynucleotidyl transferase
Thr	threonine
TF	transcription factor
VL	ventro-lateral
VM	ventro-medial
VTA	ventral tegmental area

INTRODUCTION

1. Morphine: Analgesic and Drug of Abuse

Morphine and its derivatives (codeine, phentanyl, tramadol) are the most potent analgesics available and are very efficiently used for the treatment of moderate-to-severe surgical and cancer pain (Bloodworth, 2005). However, after a long time use of morphine, patients develop adverse side effects such as nausea, dizziness, vomiting, somnolence, pruritus, diarrhea, confusion, anxiety (Furlan *et al.*, 2006) and physical tolerance to its effects.

A chronic use causes stable molecular changes in the brain that can promote continued drug taking (Di Chiara y North, 1992) producing tolerance, dependence, withdrawal symptoms and finally addiction (Hyman and Malenka, 2001).

Several theories have been developed to explain the way a person becomes drug addicted. Robinson and Berridge (1993) proposed that addiction can be viewed as an "incentive-sensitization" process. Addictive drugs share the ability to alter brain systems that are involved in the process of incentive motivation and reward, so they become hypersensitive to addictive substances and consume-associated stimuli. Koob and LeMoal (1997) defined drug addiction as a process that results from a dysregulation of neurobiologic systems, that are responsible for reward, motivation, mood, and arousal, and of the allostasis of the organism, which consists in the ability of the system to achieve stability through changes and to return to its original set point. Robbins and Everitt (Everitt y Robbins, 2005; Robbins y Everitt, 2002) consider that the development of drug addiction is linked to an overlap between memory and behaviour mechanisms and reward-related processes.

As it has been described, some of these hypotheses overlap, what means that any of them can completely explain by itself the basis of drug addiction.

2. Striatum

The striatum is the main nucleus of the basal ganglia and has a very complex structural and functional organization.

It can be divided into a dorsal part, which refers to the caudate putamen (CPu), and a ventral part, that comprises several limbic nuclei such as nucleus accumbens (Acb), olfactory tubercle and ventral pallidum (Gerfen y Wilson, 1996).

The CPu receives glutamatergic and dopaminergic efferent projections from the cortex and the SN respectively (**Fig. 1**). There are two main output streams from the CPu: one of them provides a direct input to medial globus pallidus (MGP) and substantia nigra (SN) (direct/striatonigral pathway) and the other stream provides an indirect input to these nuclei via projections from the CPu to lateral globus pallidus (LGP) (indirect/striatopallidal pathway) (Fuxe *et al.*, 1985; Gerfen and Wilson, 1996) (**Fig. 1**).

The striatum is composed of two cell types, spiny projection neurons and interneurons. There are two populations of projection neurons that can be defined neurochemically, by the selective expression of dopamine receptor subtypes and neuropeptides, and connectionally, on the

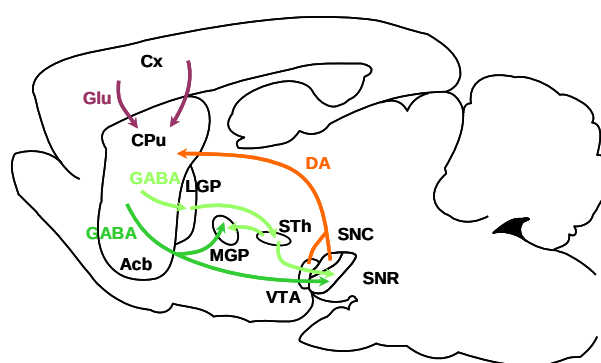


Figure 1. Diagram showing afferent and efferent connections of the striatum.

Abbreviations: Acb, nucleus accumbens; CPu, caudate putamen; Cx, cortex; DA, dopamine; Glu, glutamate; LGP, lateral globus pallidus; MGP, medial globus pallidus; SNC, substantia nigra pars compacta; SNR, substantia nigra pars reticulata; STh, subthalamic nucleus; VTA, ventral tegmental area

neuropeptides, and connectionally, on the basis of their projections targets. Thus, striatonigral neurons express substance P, dynorphin and D₁ receptors and striatopallidal neurons express enkephalin and D₂ dopamine receptors (Beckstead and Kersey, 1985; Brownstein *et al.*, 1977; Curran and Watson, 1995; Gerfen and Wilson, 1996; Gerfen and Young, 1988; Le Moine and Bloch, 1995; Reiner and Anderson 1990; Vincent *et al.*, 1982).

Although these neurons are homogenically distributed in the striatum, it has been established a functional organization of this nucleus that defines two compartments organization, the matrix and the striosomes (patches) (Gerfen and Wilson, 1996) (**Fig. 2**). The striosomes form a three-dimensional lattice-like structure inside the matrix (Breuer *et al.*, 2005; Desban *et al.*, 1993). Cortical neurons from motor and somatosensory cortical areas and posterior cingulate cortex send their projections to the matrix, while prelimbic, infralimbic, orbital and anterior cingulate cortex project to the striosomes (Bayer, 1990; Donoghue and Herkenham, 1986; Wang and Pickel, 1998). Due to this organization, it has been suggested that striosomes are mainly related to the limbic

system and the matrix to the motor control system (Gerfen and Wilson, 1996; Prensa *et al.*, 1999). Thus, the striatum constitutes an interphase for learning and memory systems responsible for habits consolidation that lead to compulsive drug use (Canales, 2005).

The expression pattern of the μ opioid receptor in the striosomes/patches (Arvidsson *et al.*, 1995; Hekerman and Pert, 1981; Pert *et al.*, 1976) and the distribution of the calcium binding protein calbindin in striatal matrix projection neurons (Kaneko *et al.*, 1995) have been useful in establishing the “patch-matrix” organization of the striatum.

3. Dopaminergic System

Dopamine plays a key role regulating several functions such as motor coordination, mood, cognition, reward and food take (Meck, 2006). Projections originating from brain areas that synthesize this neurotransmitter give rise to four axonal pathways: nigrostriatal, mesolimbic, mesocortical and tuberoinfundibular. Among them, the nigrostriatal pathway has a major relevance in our study. It originates from the substantia nigra pars compacta (SNc) and innervates the CPu (Fuxe *et al.*, 1985).

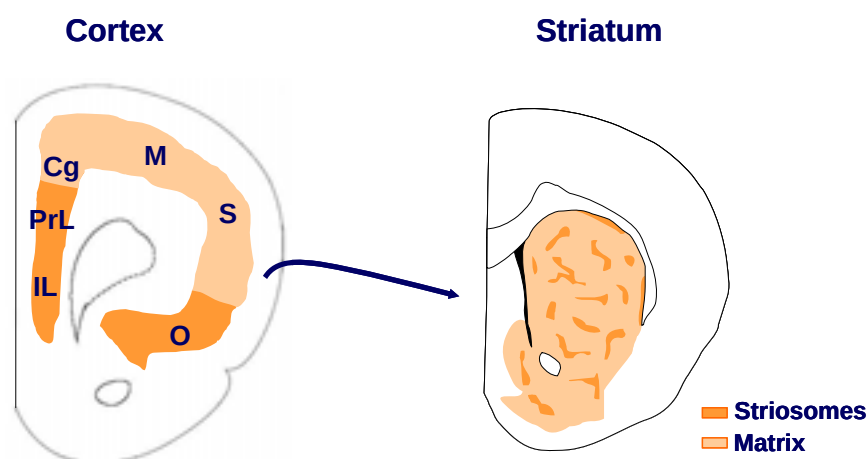


Figure 2. Diagram representing the organization of the cortical inputs to the patch-matrix compartments of the striatum.

Abbreviations: Cg, cingulate cortex; IL, infralimbic cortex; M, motor cortex; O, orbital cortex; PrL; prelimbic cortex; S, somatosensory cortex

Dopamine exerts its functions through its interaction with five different G-protein coupled receptors. They have been grouped in two different classes on the basis of their biochemical and pharmacological properties (Missale *et al.*, 1998; Seeman and Van Tol, 1994). The D1-like class includes D₁ and D₅ receptors and increases adenylate cyclase (AC) activity through G_s. The D2-like class compromises D₂, D₃ and D₄ receptors, which inhibit AC through G_{i/o} (Kebabian and Calne, 1979; Missale *et al.*, 1998).

These receptors have a widespread expression throughout the brain, but each of them has different localization. D₄ receptor (D₄R) is predominately localized in cortex, hippocampus and amygdale (Ariano *et al.*, 1997; Berger *et al.*, 2001; Defagot *et al.*, 1997a,b; Khan *et al.*, 1998; Wedzony *et al.*, 2000) and its expression in the striatum (Ariano *et al.*, 1997; Berger *et al.*, 2001; Defagot *et al.*, 1997a,b, 2000; Lanau *et al.*, 1997; Mrzljak *et al.*, 1996; Rivera *et al.*, 2002; Tarazi *et al.*, 1997, 1998) has been the subject of debate due to the undetectable or low levels of its mRNA (Matsumoto *et al.*, 1995, 1996; Meador-Woodruff *et al.*, 1997; Suzuki *et al.*, 1995). However, Khan *et al.* (1998) reported that D₄R is highly and heterogeneously expressed in the striatum (Khan *et al.*, 1998), being more abundant in the striosomes than in the matrix and in the caudal levels than in the rostral ones (Rivera *et al.*, 2002).

At the subcellular level, the D₄R is postsynaptically expressed (soma, dendrites and dendrite spiny) in striatal projection neurons and cortical neurons (Rivera *et al.*, 2003; Mrzljak *et al.*, 1996). In the output nuclei of the striatum (substantia nigra pars reticulata (SNR), LGP, MGP), these receptors are highly expressed in presynaptic structures (axons and axon terminals) (Rivera *et al.*, 2003).

Although the functions of D₄R are not clearly known, it has been proposed that this receptor plays an important role in novelty seeking, cognition, memory, attention and drug addiction (Dulawa *et al.*, 1999; Ebstein

et al., 1996, 2000; Falzone *et al.*, 2002; Kotler *et al.*, 1997; Oak *et al.*, 2000; Powell *et al.*, 2003; Rubinstein *et al.*, 1997; Tarazi *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2004).

4. Endogenous Opioid System

The endogenous opioid system consists of numerous endogenous opioid peptides and receptors, which are largely distributed in the central and peripheral nervous systems, and are involved in the physiological control of various functions such as nociception, breathness, cardiovascular and endocrine control (Bodnar and Klein, 2005).

Three main classes of opioid receptors have been described: μ opioid receptor (MOR) (Chen *et al.*, 1993; Thompson *et al.*, 1993; Wang *et al.*, 1993), κ opioid receptor (KOR) (Li *et al.*, 1993; Yasuda *et al.*, 1993) and δ opioid receptor (DOR) (Evans *et al.*, 1992; Kieffer *et al.*, 1992). Recently another opioid-like receptor has been cloned and it has been termed as ORL1 receptor (Fukuda *et al.*, 1994; Lachowitz *et al.*, 1995; Mollereau *et al.*, 1994; Reinscheid *et al.*, 1995; Wick *et al.*, 1994).

All these receptors belong to the family of G-protein coupled receptors (Chen *et al.*, 1993; Kieffer *et al.*, 1992; Li *et al.*, 1993) and share common effector mechanisms: inhibition of AC through G_{i/o}, inhibition of voltage operated calcium channels and activation of potassium channels (Aghajanian and Wang, 1986; Kurose *et al.*, 1983).

The main groups of opioid peptides are enkephalin, dynorphins and endorphins, which derives from proenkephalin (PENK), prodynorphin (PDYN) and proopiomelanocortin (POMC) respectively (Kakidani *et al.*, 1982; Nakanishi *et al.*, 1979; Noda *et al.*, 1982). These peptides have different affinity for MOR, KOR and DOR and do not bind exclusively to one of them. Thus, [Leu]- and [Met]-enkephalin have the higher affinity for DOR, but it also has affinity for MOR. Dynorphin-A and -B bind with high affinity to KOR and have

almost a negligible affinity for the other types of opioid receptors. Endorphins bind mainly to MOR but its affinity for KOR and DOR is much lower (Gerrits *et al.*, 2003; Monory *et al.*, 2000; Raynor *et al.*, 1994). Endomorphin-1 and -2 have a high selectivity towards MOR (Monory *et al.*, 2000; Zadina *et al.*, 1997, 1999). The peptide nociceptin, that derives from the prohormone pronociceptin, act at ORL1 receptors (Meunier, 1997; Reinscheid *et al.*, 1995).

The localization of opioid receptors and peptides has been reported using immunohistochemical, *in situ* hybridization and autoradiographical techniques. In the striatum, MOR presents a mosaic pattern of distribution since it is expressed mainly in the striosomes and the dorsolateral marginal areas of the CPu just beneath the cerebral white matter (Arvidsson *et al.*, 1995; Kaneko *et al.*, 1995; Mansour *et al.*, 1995; Svingos *et al.*, 1996), being more abundant in rostral than in caudal levels of the nucleus. MOR is localized in dendrites and dendritic spines of striatonigral and striatopallidal projections neurons (Arvidsson *et al.*, 1995; Guttenberg *et al.*, 1996; Moriwaki *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 1996). In the SN, MOR is expressed in axonal varicosities and dendrites and is more abundant in the SNR than in the SNC (Mansour *et al.*, 1987, 1995; Peckys and Landwehrmeyer, 1999; Sharif and Hughes, 1989; Tempel and Zukin, 1987).

It has been proposed that MOR plays a key role in pain release, food intake, drug-related behaviours and withdrawal symptoms (Akil *et al.*, 1984; Han *et al.*, 2006; Matthes *et al.*, 1996; Ribeiro *et al.*, 2005; Vaught *et al.*, 1982; Ward and Simansky, 2006).

5. Interaction of Dopaminergic and Opioid Systems

Dopamine mediates some of the reward, motor and behavioural effects of opioids (Akil *et al.*, 1984; Di Chiara and Imperato, 1988a,b; Di Chiara and North, 1992; Koob, 1992; Nestler, 1992; Nestler *et al.*, 1993a).

Although every drug of abuse has a specific molecular target, they share a common mechanism of action: an increase of mesolimbic pathway activity (Pierce and Kumaresan, 2006). It has been proposed that morphine acts on MOR located on GABAergic interneurons in ventral tegmental area (VTA) (Fig. 3) (Di Chiara and North, 1992; Johnson and North, 1992), which disinhibit dopaminergic neurons, increasing dopamine neural firing and dopamine release in Acb (Bontempi and Sharp, 1997; Devine *et al.*, 1993; Di Chiara and North, 1992; Johnson and North, 1992; Matthews and German, 1984; Spanagel *et al.*, 1992). In a similar way, morphine binds to MOR on GABAergic neurons of the SNR so dopaminergic neurons increase their firing

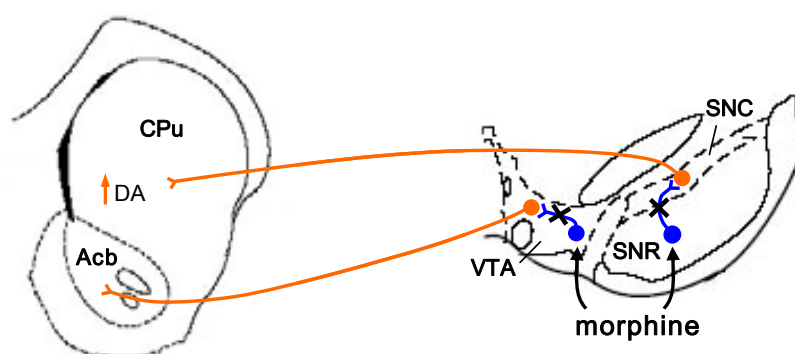


Figure 3. Mechanism of morphine action. Morphine binds to MOR on GABAergic neurons (●) in substantia nigra pars reticulata and ventral tegmental area which disinhibit dopaminergic neurons (●) in substantia nigra pars compacta and ventral tegmental area respectively. As consequence, nigrostriatal and mesolimbic pathways are activated so increase dopamine release in CPu and Acb.

Abbreviations: Acb, nucleus accumbens; CPu, caudate putamen; DA, dopamine; SNC, substantia nigra pars compacta; SNR, substantia nigra pars reticulata; VTA, ventral tegmental area

rate and dopamine release in CPu (Bontempi and Sharp, 1997; Di Chiara and Imperato, 1988a; Di Chiara and North, 1992; Lacey *et al.*, 1989; Matthews and German, 1984) (**Fig. 3**). Several authors have described that the increase of dopamine release is higher in Acb than in CPu (Airavaara *et al.*, 2006; Di Chiara and Imperato, 1986, 1988a; Leone *et al.*, 1991; Matthews and German, 1984; Pothos *et al.*, 1991; Rada *et al.*, 1991).

Acute morphine administration causes several cellular and molecular changes in brain nuclei that are implicated in the process of drug addiction as it will be described.

Transcription factors

The Fos family of transcription factors (TFs) includes c-Fos, Fos B, Δ Fos B (33-kDa isoform of Fos B) and Fra-1 and Fra-2 (*Fos-related antigen*) (35- 37-kDa isoforms of Fos B respectively) (Cohen and Curran, 1988; Greenberg and Ziff, 1984; Mumberg *et al.*, 1991; Nishina *et al.*, 1990; Zerial *et al.*, 1989). These TFs heterodimerize together with Jun family proteins c-Jun, Jun B and Jun D (Ryder *et al.*, 1988) to form active AP-1 (activator protein-1) complexes, that bind to AP-1 sites located in many genes promoter region regulating their transcription (Busch and Sassone-Corsi, 1990; Morgan and Curran, 1991; Sheng and Greenberg, 1990).

Hope *et al.* (1994) suggested a hypothetical time-course expression of Fos-like TFs after acute administration of a drug of abuse (**Fig. 4**). It describes that c-Fos is rapidly and transiently induced in the striatum, but returns to basal level within hours of drug administration. Acute FRAs (Fos B and Δ Fos B (33 kDa isoform) are induced later and persist somewhat longer than c-Fos. The chronic FRAs (35- 37-kDa isoforms of Δ Fos B) are also induced following a single acute stimulus but persist for many days at low levels in the neurons.

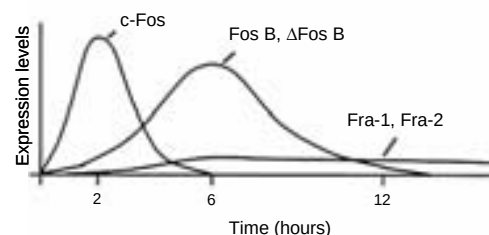


Figure 4. Scheme of Hope's model that shows a hypothetical transient induction of transcriptions factor in the striatum after an acute stimuli (modified from Hope *et al.*, 1994).

In the case of morphine acute administration, c-Fos expression is induced in the dorsomedial region of CPu (Chang *et al.*, 1988; Curran *et al.*, 1996; Garcia *et al.*, 1995; Gutstein *et al.*, 1998; Liu *et al.*, 1994; Sharp *et al.*, 1995). Some authors suggest that c-Fos induction is selective for the dynorphin/substance-P projection neurons of the striatum, although more studies are needed to establish this fact (Liu *et al.*, 1994; Ferguson *et al.*, 2004).

Little is known about the effects of morphine on the expression of Fos B and its isoforms. Recently, Muller and Untewald (2005) have described that a single injection of morphine does not modify the expression of Fos B and Δ Fos B in the striatum.

Another TF implicated in drug addiction is CREB (cAMP-response element binding protein) (Berke and Hyman, 2000; Lonze and Ginty, 2002; Martin and Kandel, 1996; Nestler *et al.*, 1993b). CREB is a member of the CREBs family together with ATFs (activating transcription factors) and CREMs (cAMP-response elementmodulators) (Lonze and Ginty, 2002). CREB binds as dimmers to the cAMP-response element (CRE) sequence found within the promoter region of numerous genes (De Cesare *et al.*, 1999; Montminy, 1997; Shaywitz and Greenberg, 1999). Its transcriptional activity is regulated by a phosphorylation process mediated by several protein kinases: Ca^{2+} /Calmodulin dependent kinases (CaMK) IV, PKA (protein kinase A) and RSKs

(MAPK-activated ribosomal S6 kinases; MAPK, mitogen activated protein kinase) phosphorylate CREB at the residue Serine-133 activating it, but CaMKII phosphorylate CREB at Serine-142 and inhibits its activity (Gonzalez and Montminy, 1989; Matthews *et al.*, 1994; Wu and McMurray, 2001; Zanassi *et al.*, 2001).

It has been described that acute administration of morphine decreases levels of phosphorylated CREB (p-CREB) in the locus coeruleus (LC) (Guitart *et al.*, 1992) and do not modify CREB expression in Acb (Widnell *et al.*, 1996), but any study has analyzed if morphine changes CREB expression or its phosphorylation state in the CPU.

Signal transduction mechanisms

Ligand binding to receptors implicates the activation or inhibition of several signal transduction mechanisms such as cAMP/PKA (Childers, 1991; Loh and Smith, 1990), protein kinase C (PKC) (Harlan *et al.*, 2004) and MAPK (Fukuda *et al.*, 1996; Li and Chang, 1996) pathways.

The acute activation of MOR reduces cAMP levels through its binding to $G_{i/o}$, causing the inhibition of AC activity (Beitner *et al.*, 1989; Childers, 1991; Duman *et al.*, 1988; Law *et al.*, 2000; Liu and Anand, 2001) and the inhibition of cAMP/PKA pathway (Liu and Anand, 2001). As a consequence, the activity of many cAMP-dependent proteins (e.g. PKA) is reduced, what will modify other proteins phosphorylation (Guitart and Nestler, 1989; Nestler, 1992). Besides, as we mentioned before, the activation of this opioid receptor also increases the conductance of K^+ channels and reduces the Na^+ -dependent inward current, causing a continuous hyperpolarization of the neuron (Childers, 1991; Nestler 2004a).

On the other hand, morphine binding to MOR increases intracellular Ca^{2+} levels by its liberation from intracellular deposits: phospholipase C (PLC) is activated and breaks down phosphoinositides in the

plasma membrane to form inositol-1,4,5-trisphosphate (IP3) and 1,2-diacylglycerol (DAG). The IP3 triggers Ca^{2+} release from intracellular stores through IP3 receptor channels (IP3Rs), producing the increase of intracellular Ca^{2+} levels. As a final consequence, the activity of Ca^{2+} dependent kinases (e.g., CaMK) results modified (Berridge, 1997; Connor and Henderson, 1996; Elliot, 2001; Jin *et al.*, 1994).

Also, morphine administration increases the activity of PKC, which would contribute to the increase of the phosphorylation of diverse proteins such as ERK 1 and ERK 2 (ERK, extracellular signal-regulated kinase) (Bilecki *et al.*, 2005; Chen and Huang, 1991; Ueda *et al.*, 1995). These proteins are members of the MAPK pathways (Chang and Karin, 2001; Johnson and Lapadat, 2002; Tibbles and Woodgett, 1999) that have been recently involved in morphine-mediated effects (Law *et al.*, 2000; Liu and Anand, 2001; Williams *et al.*, 2001).

Acute tolerance

Tolerance is a counteract mechanism that implicates a decrease in the effect of a drug despite a constant dose of it (Hyman and Malenka, 2001). Acute tolerance development after morphine administration is the consequence of a homologous desensibilization of MOR (Chen *et al.*, 2003; Claing *et al.*, 2002; Ferguson *et al.*, 1996; Ferguson, 2001; Horner and Zadina, 2004; Narita *et al.*, 1995; Prossnitz, 2004; Sever, 2002; Zhang *et al.*, 1997a,b). This desensibilization occurs through the endocytosis of MOR, what implicates a phosphorylation of the receptors followed by its internalization in a vesicle in a dynamin-dependent process via clathrin-coated pits. Endosome-associated receptors can be resensitized by phosphatases and recycle back to the plasma membrane, or degraded by proteolysis (Bilecki *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2003; Horner and Zadina, 2004; Narita *et al.*, 1995). The phosphorylation of the receptors is regulated by GRKs (G protein-couple receptor kinase),

PKA and PC (Claing *et al.*, 2002; Mason *et al.*, 2002).

Receptors can also be desensitized without ligand binding (heterologous desensibilization). In this case, the phosphorylation of receptors is mediated by several kinases such as PKA, PKC, CaMK-II, MAPK (Pierce *et al.*, 2001; Tegeder and Geisslinger, 2004). The protein PKC inhibits MOR endocytosis, contributing to tolerance to opioids (Mestek *et al.*, 1995; Narita *et al.*, 1995; Ueda *et al.*, 2004).

Dopaminergic system

Many evidences indicate that dopaminergic and endogenous opioid systems interact to modulate emotional and motivational behaviours and locomotor activity (Fink and Smith, 1980; Roberts and Koob, 1982). Thus, mesolimbic dopaminergic pathway, which rises from VTA and innervates Acb, is implicated in positive rewards systems (Di Chiara and North, 1992; Koob *et al.*, 1992). Nigrostriatal pathway is involved in the expression of stereotypes related to drug consumption (Morelli *et al.*, 1989).

The increase of dopamine release in the CPu after morphine administration induces c-Fos expression through D₁ dopamine receptor (D₁R) (Cole *et al.*, 1994; Konradi *et al.*, 1994, 1996; Liu *et al.*, 1994; Lovenberg *et al.*, 1991). Besides, SCH 23390 (D₁ antagonist) and quinpirol (D₂/D₃ receptors agonist) block morphine-induced c-Fos expression in the rat CPu (Cook and Wirtshafter, 1998; Liu *et al.*, 1994).

Nigrostriatal dopaminergic afferents from SNC modulate the expression of endogenous opioid peptide enkephalin and dynorphin in the CPu (Engber *et al.*, 1992; Gerfen *et al.*, 1990, 1991). Thus, unilateral 6-hydroxydopamine (6-OHDA) lesions of the mesostriatal dopaminergic system in the rat result in an increase of enkephalin immunoreactivity (Voorn *et al.*, 1987) and a decrease of dynorphin mRNA levels (Gerfen *et al.*, 1991), and besides, the administration of eticlopride (D₂ antagonist) in non-lesioned animals increases the expression of enkephalin mRNA (Sirinathsinghji *et al.*, 1994).

AIM OF THIS THESIS

The work presented in this thesis is focused on the analysis of D₄R role in the modulation of morphine-induced effects in the CPu, which are mediated by MOR. Both types of receptors are highly expressed in the striosomes (Rivera *et al.*, 2002), suggesting a receptor-receptor interaction. The specific aims were to study:

1. Time-course effects of PD168,07 (D₄R agonist) and/or morphine (MOR agonist) acute administration on c-Fos, Fos B-ΔFos B and p-CREB expression in the rat caudate putamen.

2. Time-course effects of PD168,07 and/or morphine acute administration on dynorphin and enkephalin mRNA levels in the rat caudate putamen

3. Time-course and dose-response effects of PD168,077 on number of binding sites and affinity of MOR in the rat caudate putamen.

4. Dose-dependent effects of PD168,077 on morphine-induced locomotor activities in mice.

MATERIAL AND METHODS

1. Animals

Male Sprague-Dawley rats (CRIFA, Barcelona, Spain) weighing 150-250 g and male C57BL/6J mice (Charles River, Barcelona, Spain) weighing 20-30 g were maintained on a standard light/dark cycle (12/12 h) and constant room temperature (20 ± 2 °C). The animals had free access to food pellets and tap water. Animal care and use followed guidelines from the European Union Council Directive 86/609/EEC as well as the Spanish Government (Real Decreto 1201/2005). All efforts were made to minimize animal suffering and to reduce the number of animals used.

2. Drugs

The D_4R agonist PD168,077 maleate (*Tocris Bioscience*) was dissolved in 2% dimethyl sulfoxide (DMSO) and 0.9% NaCl and injected at 1 mg/kg (intraperitoneal, i.p.) in the studies made with rats. Besides, it was dissolved in 0.9% NaCl and injected at 0.06, 0.2 and 1 mg/kg (subcutaneous, s.c.) in mice studies. The D_4R antagonist L745,870 trihydrochloride (*Tocris Bioscience*) was dissolved in 0.9% NaCl and injected at 1 mg/kg (i.p.). Morphine sulphate was dissolved in water (*Sigma-Aldrich*) or 0.9% NaCl (*Salars*) and injected at 10 mg/kg (i.p. in rats and s.c. in mice).

3. Treatment Groups and Experimental Design

3.1. Experiment 1. Effects of PD168,077 and/or morphine on transcriptional factors expression in rat caudate putamen

This experiment was designed to analyze the expression pattern of c-Fos, Fos B- Δ Fos B and p-CREB in the CPu after PD168,077 and/or morphine acute administration. Immunohistochemistry and *in situ* hybridization techniques were used.

Time-course. Groups of 4 to 8 animals were established to study the effect of acute administration of PD168,077 and/or morphine at different times ($\frac{1}{2}$, 2, 4 and 6 h after treatment). As shown in **figure 5**, rats received a single injection of PD168,077 (1 mg/kg; i.p.) or its vehicle (2% DMSO in 0.9% NaCl; i.p.). After 30 min either morphine (10 mg/kg; i.p.) or its vehicle (distilled water; i.p.) were administered every 30 min for $1\frac{1}{2}$ h. Animals were sacrificed $\frac{1}{2}$, 2, 4 and 6 h after the first administration of morphine or its vehicle.

Specificity of D_4R effects. The specificity of PD168,077 effect was tested by the administration of the D_4R antagonist L745,870. This drug (1 mg/kg, i.p.) or its vehicle (0.9% NaCl; i.p.) were administered

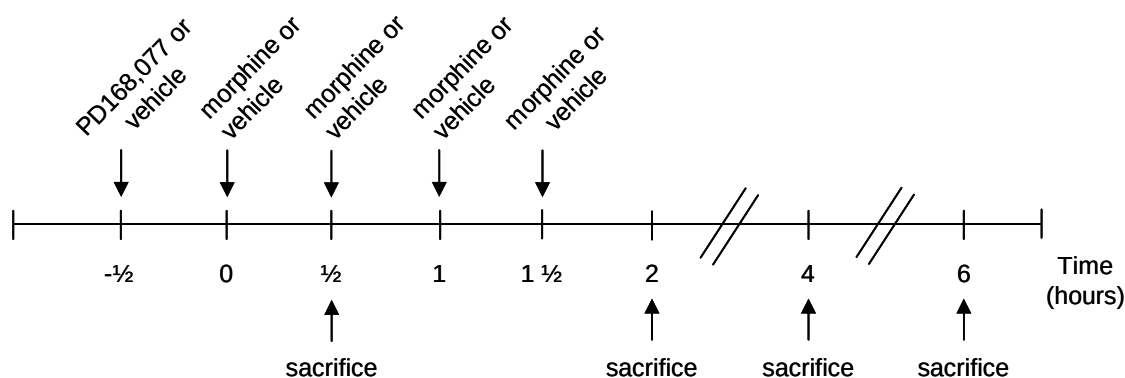


Figure 5. Experimental design for the time-course study of PD168,077 and morphine effects on transcriptions factors and opioid peptides expression.

15 min before PD168,077 (1mg/kg, i.p.) or its vehicle (2% DMSO in 0.9% NaCl). After ½ h, rats received 4 injections of morphine (10 mg/kg; i.p.) or its vehicle (distilled water; i.p.) every 30 minutes for 1½ h. Rats were sacrificed 2 h after the first injection of morphine or its vehicle (n=5-8 per group).

3.2. Experiment 2. Effects of PD168,077 and/or morphine on dynorphin and enkephalin mRNA levels in rat caudate putamen

The effects of PD168,077 and/or morphine administration on the expression of dynorphin and enkephalin mRNA in the rat CPu were analyzed in a time course using ISH techniques.

PD168,077 time-course. Animals (n=4-5 per group) received a single injection of PD168,077 (1 mg/kg; i.p.) and were sacrificed at ½, 2 and 4 h. Paired animals were injected with vehicle (2% DMSO in 0.9% NaCl) and sacrificed at the same times.

PD168,077 and morphine time-course. As it was made in the experiment 1, rats (n=5 per group) received a unique injection of PD168,077 (1 mg/kg; i.p.) or its vehicle (2% DMSO in 0.9% NaCl; i.p.) ½ h before morphine (10 mg/kg; i.p.) or its vehicle (distilled water; i.p.) injections and were sacrificed at ½, 2 and 4 h.

3.3. Experiment 3. Effects of PD168,077 on the number of binding sites and affinity of MOR in rat caudate putamen

To test whether PD168,077 has any effects on the number of binding sites and/or affinity of MOR in the CPu, saturation radioligand binding experiments were made.

Time-course. Rats (n=4-14 per group) were treated with PD168,077 (1 mg/kg; i.p.) and were sacrificed at different times (½, 2, 4 y 6 h). Paired animals were treated with the vehicle (2% DMSO in 0.9% NaCl).

Dose-response. Acute treatment of PD168,077 was performed at doses of 0.5, 1 and 3 mg/kg and rats (n=6-14 per group)

were sacrificed 2 h after the drug administration. Control animals received vehicle injection (2% DMSO in 0.9% NaCl).

3.4. Experiment 4. Dose-dependent effects of PD168,077 on morphine-induced locomotor activity in mice

To study the role of D₄R in morphine-induced locomotor activity, three doses of the agonist P168,077 (0.06, 0.2 and 1 mg/kg; s.c.) were tested. Mice (n=6-8 per group) were pretreated with one of the PD168,077 doses (s.c.) or its vehicle (0.9% NaCl; s.c.) 15 min before a single injection of morphine (10 mg/kg; s.c.) or its vehicle (0.9% NaCl; s.c.) was administered. Paired animals received both drugs vehicle.

4. Immunohistochemistry

Rats were deeply anesthetized with sodium pentobarbital (60 mg/kg, i.p.) at the corresponding time and were perfused transcardially with 0.1 M phosphate-buffered saline, pH 7.4 (PBS) followed by 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4 (PB). The brains were rapidly removed, overnight post-fixed in the same fixative, cryoprotected in 30% sucrose in PBS (72 h) and frozen in dry ice. Rostro-caudal series of coronal sections (30 µm thick) were obtained with a freezing microtome (CM 1325, Leica) and stored in PBS containing 0.02% sodium azide. Free-floating sections were taken from rostral (bregma +1.7 mm), middle (bregma +1.0 mm), and caudal (bregma +0.2 mm) levels of the CPu (Paxinos and Watson, 2001) and were processed for standard avidin-biotin immunohistochemical protocols. Specific polyclonal rabbit antibodies were used in this study to detect c-Fos (anti-c-Fos; 1:1000; Santa Cruz Biotechnology), Fos B-ΔFos B (anti-Fos B; 1:200; Santa Cruz Biotechnology) and p-CREB (anti-p-CREB; 1:500; Upstate). Sections were pre-treated for 15 minutes with 3% H₂O₂ and rinsed in 0.1 M PBS. Primary antibodies were diluted in PBS with 0.2% Triton X-100 (PBS-TX)

and 0.1% sodium azide. Incubation with each primary antibody was carried out for 24 h at room temperature. After being washed with PBS, the sections were incubated for 1 h in biotinylated goat anti-rabbit IgG (*Vector Laboratories Inc*) diluted 1:500 in PBS-TX. The sections were rinsed again with PBS and incubated for 1 h in peroxidase-conjugated streptavidin (*Sigma-Aldrich*) diluted 1:2000 in PBS-TX. Peroxidase activity was revealed with 0.05% 3,3'-diaminobenzidine (DAB, *Sigma-Aldrich*) and 0.02% H₂O₂ and the staining was intensified with 0.8% nickel ammonium sulphate. Sections were mounted on gelatin-coated slides, air dried, dehydrated with ethanol, cleared in xylene and coverslipped with DPX mounting medium.

4.1. Quantitative analysis

The number of c-Fos, Fos B-ΔFos B and p-CREB immunoreactive (IR) nuclei in rat CPu was quantified and compared based on drug treatment. Measures were made in different regions of the CPu throughout the rostro-caudal axis. c-Fos positive nuclei were measured in the dorso-medial (DM) quadrant and Fos B-ΔFos B and p-CREB positive nuclei were measured in the medial (DM and ventro-medial (VM) quadrants) and lateral (dorso-lateral (DL) and ventro-lateral (VL) quadrants) portions of the caudate putamen.

Nuclei were quantified in the two hemisphere of the brain using the image analysis computerized system ImageJ 1.34s (*National Institutes of Health, NIH*). Before counting, images were thresholded at a standardized grey-values scale level empirically determined to allow detection of stained cells from low to high density, with suppression of very lightly stained nuclei.

5. In Situ Hybridization

Animals were killed by decapitation. The brains were removed immediately, frozen in dry ice-cooled isopentane, and store at

-70 °C. Coronal brain sections (14 μm) were cut on a cryostat, thawed onto glass slides and stored at -20 °C until incubation. For detection of dynorphin mRNA (296-345) (Douglass *et al.*, 1989), enkephalin mRNA (235-282) (Zurawski *et al.*, 1986) and c-fos mRNA (489-538) (Curran *et al.*, 1987), 48-mer oligonucleotides complementary to described nucleotides were used.

The probes were 3'-end labelled with [α -³³P]dATP (*Perkin Elmer*) using terminal deoxynucleotidyl transferase (Tdt) (*Amersham Biosciences*). The hybridization cocktail contained 50% formamide, 4x SSC (1x SSC is 0.15M NaCl, 0.0015M sodium citrate; pH 7.0), 1x Denhardt's solution, 1% Sarcosyl, 0.02M Na₃PO₄ pH 7.0, 10% dextranulphate, 0.06 M DTT and 0.1 mg/ml of sheared salmon sperm DNA. Hybridization was performed for 18 h in a humidified chamber at 42 °C. Following hybridization, the sections were rinsed four times (20 min each) in 1x SSC at 60 °C. Finally, sections were rinsed in autoclaved water, dehydrated in alcohol and air-dried. Thereafter, the slides were exposed to film (*Kodak*) for 2-10 days.

5.1. Imagen analysis

Autoradiograms films were scanned (ScanMaker 9800XL, *Microtek International Inc*) and optical density values from *in situ* hybridization were quantified using ImageJ 1.34s (*NIH*). Measurements were performed in the overall CPu and its lateral and medial regions. A ¹⁴C standard (*Amersham Biosciences*) was used to correlate optical density readings on the autoradiograms to amount of radioactivity (nCi/g).

6. Radioligand Binding Experiments

Animals were killed by decapitation and the brains were removed immediately. The striatum was dissected out on ice, immediately frozen in dry ice-cooled isopentane and store at -70°C.

6.1. Membrane preparation

Dorsal striatums were homogenized (30s) and resuspended in 50 mM Tris-HCl pH 7.4. The homogenate was centrifugated at 20,000 rpm for 20 min at 4°C. The precipitated fraction was resuspended in 50 mM Tris-HCl pH 7.4, incubated for 30 min at 25°C and centrifuged at 20,000 rpm for 20 min at 4°C. The membrane pellet was then resuspended in 50 mM Tris-HCl pH 7.4. The final protein concentration was measured with the Bradford standardized protein assay.

6.2. Saturation experiments

The saturation experiments with the MOR agonist [^{3} H]DAMGO were carried out with 8 concentrations (0.1-14 nM) of [^{3} H]DAMGO (*Perkin Elmer*) at incubation for 60 minutes at room temperature. Non-specific binding is defined as binding in the presence of MOR antagonist naloxone (10 μ M).

The incubation was stopped by fast filtration through glass-fiber filters (GF/B, *Whatman*) followed by washing three times with cold destilated water with an automatic cell harvester (*Brandel*). The radioactivity content of the filters was detected by liquid scintillation spectrometry. Data from saturation experiments were analyzed by nonlinear regression analysis (*GraphPad Inc*) for the determination of the dissociation constant (K_d) and the number of receptors (B_{max}).

7. Behavioural Studies

The open field test was used to assess the animal's locomotor activity and test

PD168,077 and/or morphine treatments effects on it.

7.1. Open field apparatus

The open field consisted of 40x40 cm arena divided into 25 squares by lines drawn on the floor of the apparatus. The arena was situated in an experimental compartment illuminated with a fluorescent lamp. Mice were monitored by video tracking system equipped with a camera (*Smart, Panlab S.A.*), that was enabled to record and analyze locomotor activity.

7.2. Locomotor activity assay

Experiments were conducted between 8:00 and 14:00 hours. The mice were habituated to handling and to the open field before starting the experiment. After the administration of the corresponding treatment, each mouse was placed immediately into the central square of the arena and allowed to freely explore. Total distance moved was recorded for a 30 minutes session divided into three 10 minutes intervals. The apparatus was cleaned between tests with soapy water and dried.

8. Statistics

Drug effects were determined with one or two way ANOVA followed by *post hoc* Dunn and Bonferroni test respectively and with t Student test. These analyses were completed using Sigmastat[®] 2.03 (*SPSS Inc*). Probability levels of 5% ($p<0.05$), 1% ($p<0.01$) and 0.1% ($p<0.001$) were considered significant.

RESULTS

1. Study of c-Fos, Fos B-ΔFos B and p-CREB Expression Patterns in the Rat Caudate Putamen after Morphine and/or a D₄R Agonist Acute Treatment

We evaluated the effect of the acute treatment of morphine and/or the dopaminergic agonist PD168,077 in the expression of c-Fos, Fos B-Δfos B and p-CREB in rat CPu, considering the whole nucleus and different levels along its rostro-caudal axis. A time-course study was made using immunohistochemical and image analysis techniques. Besides, c-fos mRNA levels in the CPu were analyzed using *in situ* hybridization technique.

1.1. c-Fos

Time-course of changes in c-Fos expression after acute treatment of morphine or PD168,077

Acute administration of morphine resulted in a significant induction of c-Fos

immunoreactivity (IR) in the DM region of the CPu. The increase was maximal at 2 h (+76%, $p < 0.001$) (**Fig. 6A**), which is in close agreement with dates previously reported (Liu *et al.*, 1994; Garcia *et al.*, 1995). Along the rostro-caudal axis, morphine increased c-Fos IR at rostral, middle and caudal levels of the CPu at 2 h ($p < 0.001$) with no differences between them (data not shown). Regarding c-fos mRNA levels, no changes were detected at any point of the time-course study across the whole CPu (**Fig. 6B**).

Acute administration of PD168,077 resulted in a double effect on c-Fos expression. The number of IR nuclei was increased (+23.6%, $p < 0.01$) at 30 minutes and reduced (-20.3%, $p < 0.05$) 4 h after treatment (**Fig. 7A**). No changes were detected at 2 and 6 h. The increase was only significant at middle and caudal levels ($F = 20.2$; $p < 0.001$). The reduction observed 4 hours after drug treatment was significant only in caudal levels ($F = 9.6$; $p < 0.01$) (data not shown). No changes in c-fos mRNA levels were detected in the CPu at ½, 2, 4 h (**Fig. 7B**).

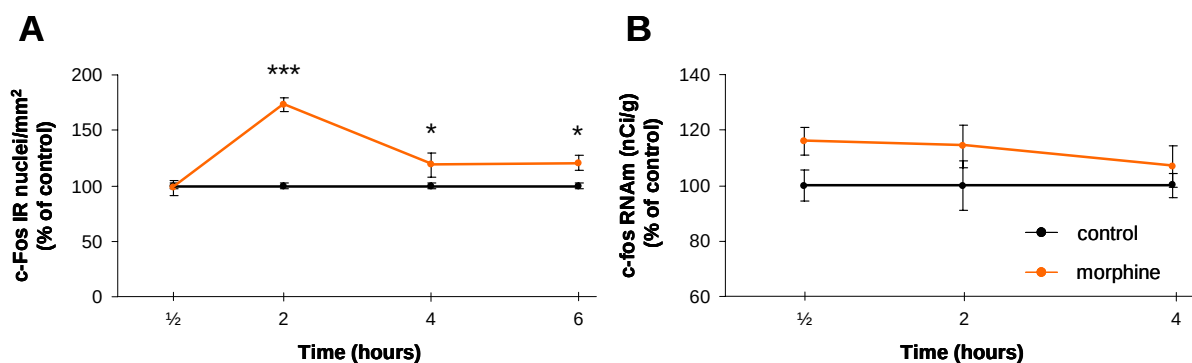


Figure 6. Time-course study of the number of c-Fos IR nuclei (**A**) and c-fos mRNA levels (nCi/g) (**B**) in rat caudate putamen ½, 2, 4 and 6 hours after acute morphine treatment. Values represent percent of control and are expressed as mean $\pm$ SEM. Two-way ANOVA (time $\times$ treatment) followed by *post hoc* Bonferroni test; *** $p < 0.001$; * $p < 0.05$ vs. control.

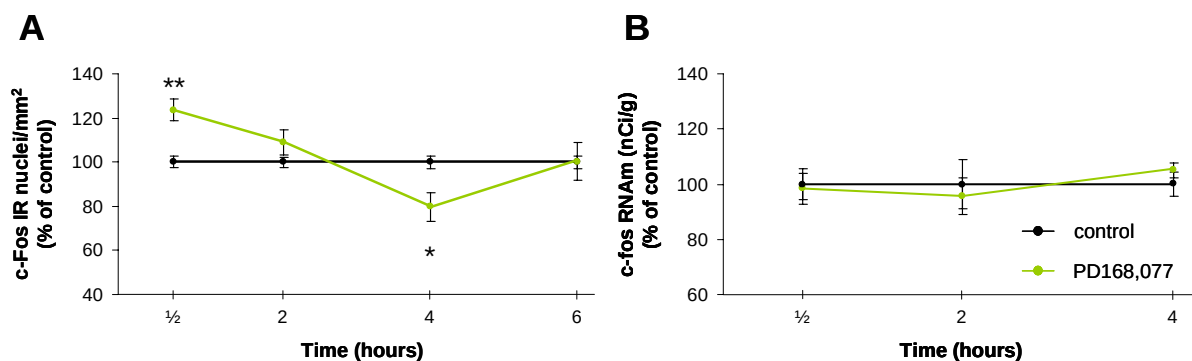


Figure 7. Time-course study of the number of c-Fos IR nuclei (A) and c-fos mRNA levels (nCi/g) (B) in the dorsomedial region of rat caudate putamen ½, 2, 4 and 6 hours after acute PD168,077 treatment. Values represent percent of control and are expressed as mean $\pm$ SEM. Two-way ANOVA (time $\times$ treatment) followed by *post hoc* Bonferroni test; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$ vs. control.

The administration of PD168,077 antagonistically modulates c-Fos induction by morphine

The number of c-Fos IR nuclei in the CPu after both PD168,077 and morphine coadministration was similar to the observed in the control group, so D₄R agonist blocks morphine-induced c-Fos expression in the CPu (Fig. 8). The same effect was observed in rostral, middle and caudal levels of the CPu (data not shown).

To test the specificity of D₄R effect on regulation of c-Fos morphine-induced expression, the D₄R antagonist L745,870

was administrated before PD168,077 and morphine. L745,870 suppressed the effect of the D₄R agonist on morphine-induced c-Fos expression since the number of c-Fos IR nuclei was similar in morphine and L745,870 + PD168,077 + morphine groups (Fig. 8).

Throughout the rostral-caudal axis, L745,870 significantly increased (+58.4%; $p < 0.001$) the number of c-Fos IR nuclei only in rostral levels of the CPu. On the other hand, the D₄R antagonist blocked PD168,077 effect over morphine-induced c-Fos expression with the same magnitude in all levels of the CPu (data not shown).

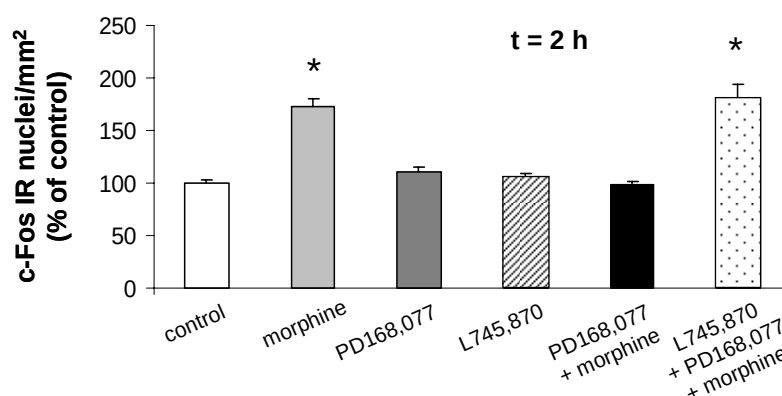


Figure 8. Specificity of PD168,077 effect. L745,870 blocks the effect of PD168,077 on the morphine-induced c-Fos expression in the CPu. Values represent percent of control group and are expressed as mean $\pm$ SEM. No parametric One-way ANOVA followed by *post hoc* Dunn test; * $p < 0.05$ vs. control, PD168,077, PD168,077 + morphine.

Time-course of changes in c-Fos expression after PD168,077 and morphine combined treatment

Although PD168,077 effect on morphine-induced c-Fos expression was analyzed at 2 hours after drugs administration, since maximal morphine-induced expression of this TF was found by this time, a time-course analysis was made to complete this study.

No changes were observed ½ h after both agonists administration (**Fig. 9A**). PD168,077 + morphine increased (+294.3%) the number of c-Fos IR nuclei in the CPu after 4 h. The same effect was observed at 6 h (+144.8%).

Along the rostro-caudal axis of the CPu (data not shown), the administration of both drugs did not alter c-Fos expression after ½ h. At 4 hours, the increase of IR nuclei was observed in rostral, middle and caudal levels and a rostro-caudal gradient ($p < 0.001$) was observed since the induction was higher in the rostral levels (+455.9%) than in the caudal ones (+146%). The intensity of c-Fos induction 6 h after PD168,077 + morphine treatment was the same in all levels.

The expression of c-fos mRNA was induced only 2 h after the coadministration of both PD168,077 and morphine (+18.2%,

$p < 0.001$), since no changes were observed at ½ and 4 h (**Fig. 9B**).

1.2. Fos B-ΔFos B

Time-course of changes in Fos B-ΔFos B expression after acute treatment of PD168,077 and/or morphine

Morphine induced Fos B-ΔFos B expression (+23.2%, $p < 0.001$) 4 h after its acute administration (**Fig. 10A**). No changes were observed at ½, 2 and 6 h. The increase of the number of IR nuclei was significant in rostral (+29.8%, $p < 0.001$) and middle (+29.7%, $p < 0.001$) levels but not in the caudal ones.

On the other hand, acute treatment of PD168,077 induced (+15.5%, $p < 0.001$) Fos B-ΔFos B expression at 30 minutes respect to control group (**Fig. 10B**). The analysis of this effect in the rostro-caudal axis of the CPu showed that the increase of Fos B-ΔFos B IR nuclei was significant only in caudal levels (+22.6%, $p < 0.01$). There were no differences between control animals and D₄R agonist-treated animals at 2, 4 and 6 h across the whole striatum and the rostro-caudal axis (data not shown).

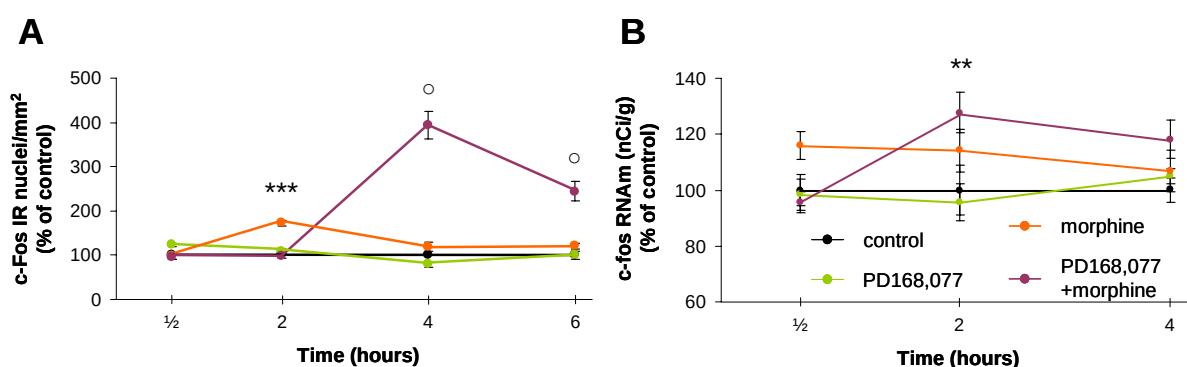


Figure 9. Time-course study of the number of c-Fos IR nuclei and c-fos mRNA levels (nCi/g) in the dorsomedial region of rat caudate putamen ½, 2 and 4 hours after PD168,077 + morphine treatment. Values represent percent of control and are expressed as mean ± SEM. Two-way ANOVA (time x treatment) followed by *post hoc* Bonferroni test; ** $p < 0.01$ PD168,077 + morphine vs. control, PD168,077; *** $p < 0.001$ morphine vs. control, PD168,077, PD168,077 + morphine; ○ $p < 0.001$ PD168,077 + morphine vs. control, morphine, PD168,077.

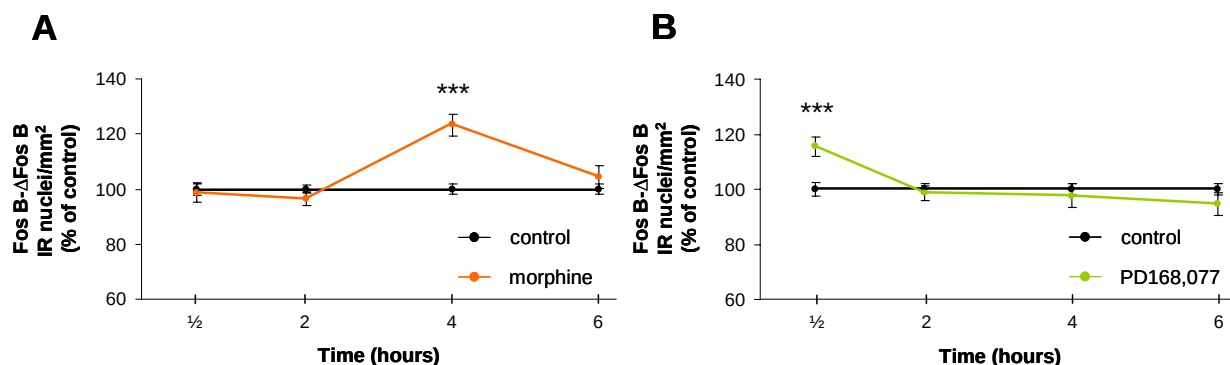


Figure 10. Time-course study of the number of Fos B-ΔFos B IR nuclei in the rat caudate putamen 1/2, 2, 4 and 6 hours after acute morphine (A) and PD168,077 (B) treatment. Values represent percent of control and are expressed as mean ± SEM. Two-way ANOVA (time x treatment) followed by *post hoc* Bonferroni test; *** $p < 0.001$; * $p < 0.05$ vs. control.

D₄R agonist PD168,077 does not modulates morphine-induced Fos B-ΔFos B expression

The administration of PD168,077 + morphine increased (+24.7%, $p < 0.05$) the number of Fos B-ΔFos B IR nuclei after 4 hours with the same intensity as the acute treatment of morphine did (+22.6%, $p < 0.05$) (Fig. 11A).

Throughout the rostral-caudal axis, both morphine and PD168,077 + morphine treatments induced Fos B-ΔFos B IR in the rostral levels of the CPu (morphine +29.8%, $p < 0.05$; PD168,077 + morphine +39.0%,

$p < 0.001$). In middle levels, only the opioid agonist increased the expression of this TFs, so PD168,077 blocked morphine effect. No changes due to the different drugs treatments were observed in caudal levels.

Time-course of changes in Fos B-ΔFos B expression after PD168,077 and morphine combined treatment

A time-course (1/2, 2, 4, 6 h) analysis of Fos B/ΔFos B expression after PD168,077 + morphine treatment was made to complete this study.

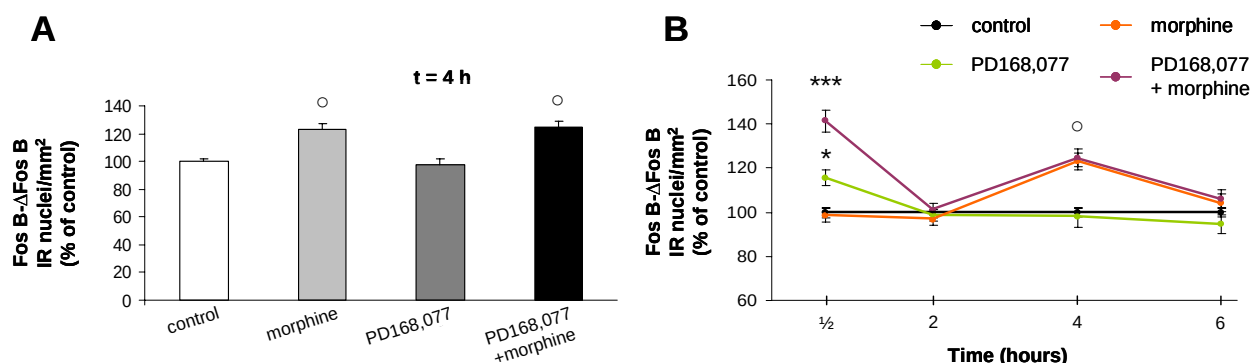


Figure 11. Number of Fos B-ΔFos B IR nuclei in the rat caudate putamen 4 (A) and 1/2, 2 and 6 (B) hours after acute morphine and/or PD168,077 treatment. Values represent percent of control and are expressed as mean ± SEM. A Non parametric one-way ANOVA followed by *post hoc* Dunn test; B Two-way ANOVA (time x treatment) followed by *post hoc* Bonferroni test; * $p < 0.05$ PD168,077 vs. control, morphine; *** $p < 0.001$ PD168,077 + morphine vs. control, PD168,077, morphine; ○ $p < 0.001$ PD168,077 + morphine or morphine vs. control, PD168,077.

After 30 min, the increase of Fos B- Δ Fos B IR was higher ($p < 0.001$) after both drugs administration (+41.4%, $p < 0.001$) than after PD168,077 treatment (+15.5%, $p < 0.05$) (**Fig. 11B**). Non significant changes were observed after 2 and 6 hours of treatments.

The Fos B- Δ Fos B IR induction by PD168,077 + morphine was significant in middle (41.4%; $p < 0.05$) and caudal levels (75.1%; $p < 0.001$), existing a rostro-caudal gradient ($p < 0.001$) along the axis. No changes were detected at 2 and 6 hours at any of the three levels of the CPu.

1.3. p-CREB

Time-course of changes in p-CREB expression after acute treatment of morphine or PD168,077

The acute administration of morphine had a double effect on p-CREB expression in rat CPu. The number of p-CREB IR nuclei decreased (-22.7%, $p < 0.001$) ½ hour after treatment and increased (+28.4%, $p < 0.001$) after 4 hours. The number of p-CREB IR nuclei did not changed 2 and 6 h after morphine administration (**Fig. 12A**).

The analysis made along the rostro-caudal axis showed that p-CREB was reduced in middle (-23.7%, $p < 0.01$) and caudal (-29.1%; $p < 0.001$) levels, without significant differences between them. The increase of its expression due to the treatment occurred on three levels of the CPu (rostral +31.3%, $p < 0.05$; middle +26.7%, $p < 0.05$; caudal +27.2%, $p < 0.05$).

The D₄R agonist did not modify the number of p-CREB IR nuclei considering the whole CPu at any time analyzed (**Fig. 12B**). No changes were observed in rostral, middle and caudal levels of this nucleus ½, 4 and 6 h after treatments. However, PD168,077 decreased significantly the p-CREB expression in caudal levels (-25.6%, $p < 0.01$).

Time-course of changes in p-CREB expression after PD168,077 and morphine combined treatment

A time-course analysis (½, 2, 4 and 6 hours) of PD168,077 effect on morphine-induced changes of p-CREB expression was made considering the whole nucleus and the three rostro-caudal levels.

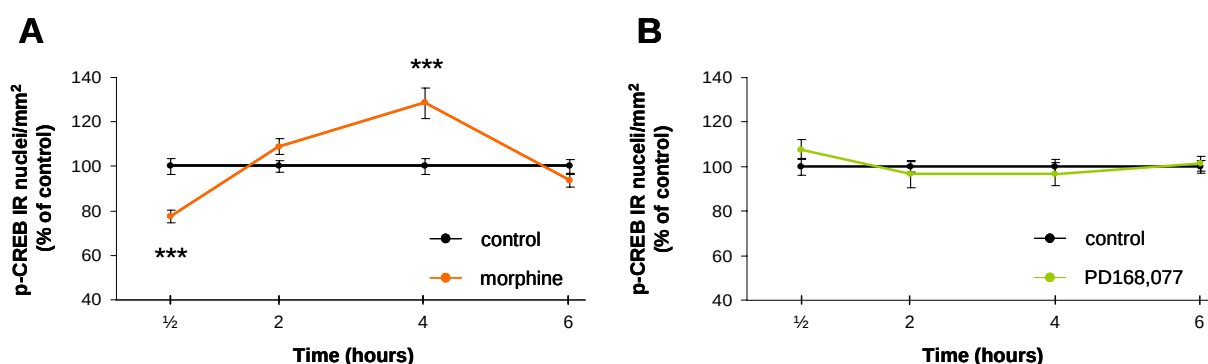


Figure 12. Time-course study of the number of p-CREB IR nuclei in the rat caudate putamen ½, 2, 4 and 6 hours after acute morphine (**A**) and PD168,077 (**B**) treatment. Values represent percent of control and are expressed as mean $\pm$ SEM. Two-way ANOVA (time $\times$ treatment) followed by *post hoc* Bonferroni test; *** $p < 0.001$ vs. control.

After ½ h, PD168,077 + morphine did not change the number of p-CREB IR nuclei respect to control and morphine (**Fig. 13**). Considering the rostro-caudal axis, the coadministration of both drugs reduced significantly (-32.0%, $p < 0.05$) p-CREB expression in the caudal levels of the CPu as morphine did (-29.1%, $p < 0.001$). The administration of both drugs increased (+16.6%, $p < 0.05$) the expression of this TF after 4 hours respect to control with the same intensity that the morphine treatment (+28.4%, $p < 0.001$) considering the whole CPu. Any drug treatment modified p-CREB expression at 2 and 6 h in the whole CPu or in the three levels.

2. Study of Dynorphin and Enkephalin mRNA Expression in the Rat Caudate Putamen after Morphine and/or a D₄R Agonist Acute Treatment

We evaluated the effect of morphine and/or PD168,077 acute treatments in the expression of dynorphin and enkephalin mRNA in rat CPu considering the whole nucleus and its lateral and medial areas. A time-course study was made using *in situ* hybridization techniques.

2.1. Enkephalin

Time-course of changes in enkephalin mRNA levels after morphine or PD168,077 acute treatments

The enkephalin mRNA has a homogenous distribution along the whole CPu, with not differences between striosomes and matrix compartments (**Fig. 14**).

Acute morphine treatment decreased enkephalin mRNA expression (-24.3%, $p < 0.01$) after ½ hour (**Fig. 14A,B**). This effect could be observed throughout the whole CPu, with no differences between lateral (-25.2%, $p < 0.01$) and medial (-22.1%, $p < 0.01$) regions.

On the other hand, the administration of D₄R agonist had a double effect on enkephalin mRNA levels in the CPu, since PD168,077 decreased it at ½ hour (-12.7%, $p < 0.01$) and increased it after 2 hours of the treatment (+11.7%, $p < 0.01$). In both lateral and medial regions PD168,077 also reduced enkephalin mRNA levels after ½ hour (lateral -10.7%, $p < 0.05$; medial 9.9 %, $p < 0.05$) and increased it after 2 hours (lateral +12.2%, $p < 0.05$; medial +12.8%, $p < 0.01$). No changes were detected at 4 hours across the CPu.

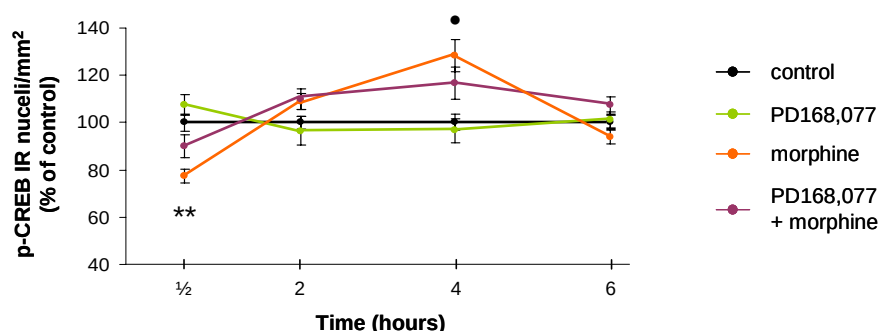


Figure 13. Time-course study of the number of p-CREB IR nuclei in the rat caudate putamen ½, 2, 4 and 6 hours after acute morphine + PD168,077 treatment. Values represent percent of control and are expressed as mean $\pm$ SEM. Two-way ANOVA (time $\times$ treatment) followed by *post hoc* Bonferroni test; ** $p < 0.01$ morfina vs. control, PD168,077; • $p < 0.001$ morfina vs. control, PD168,077, $p < 0.05$ PD168,077 + morfina vs. control, PD168,077.

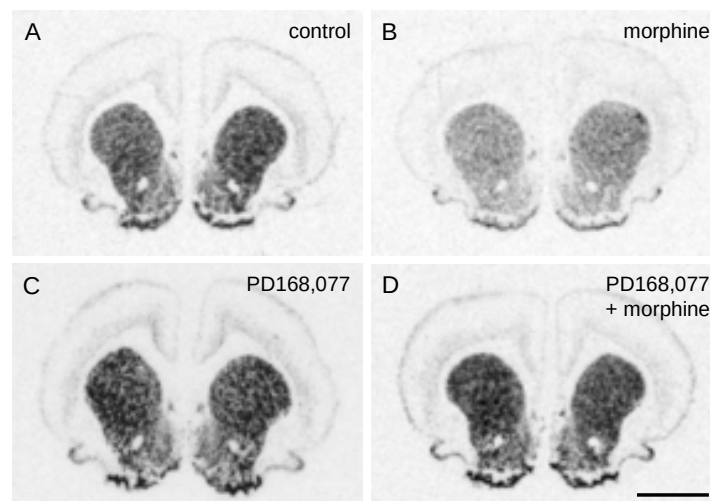


Figure 14. Representative autoradiograms of enkephalin mRNA expression in the rat caudate putamen in control and treated with morphine (B), PD168,077 (C) and PD168,077 + morphine (D) rats after ½ hour. Bar: 500 mm

Time-course of changes in enkephalin expression after PD168,077 and morphine combined treatment

The mRNA for enkephalin was increased (+24.4%, $p < 0.05$) ½ h after administration of both PD168,077 and morphine across the CPu (Fig. 14D). Non significant changes were observed after 2 or 4 h (data not shown).

In both lateral and medial regions of the nucleus, the coadministration of dopaminergic and opioid agonists increased enkephalin mRNA levels at 30 minutes (lateral +26.8%, $p < 0.05$; medial +23.3%, $p < 0.05$). After 2 hours, PD168,077 + morphine decreased this mRNA levels only in the medial region of the CPu (-22.3%, $p < 0.05$). No changes were observed 4 hours after the drugs treatment in any of the two areas of the CPu.

2.2. Dynorphin

Time-course of changes in dynorphin mRNA levels after morphine acute treatment but not due to PD168,077

The dynorphin mRNA is expressed in the entire CPu, but more abundant in the patch compartment as compared with the matrix (Fig. 15).

Morphine decreased (-31.1%, $p < 0.001$) dynorphin mRNA levels in the CPu after ½ hour (Fig. 15A, B), but no changes were observed after 2 and 4 h. This effect could be measured throughout the CPu, with no differences between lateral (-28.6%, $p < 0.001$) and medial (-38.8%, $p < 0.001$) areas.

On the other hand, dynorphin mRNA levels, as measured across the whole striatum, were not significantly altered over basal levels after PD168,077 acute administration at any time analyzed.

D₄R agonist PD168,077 modulates the morphine effects on dynorphin mRNA levels in rat CPu

After ½ h of both PD168,077 and morphine administration, dynorphin mRNA levels were similar to the control group and higher than in morphine-treated rats considering the whole CPu ($p < 0.01$) and its lateral ($p < 0.05$) and medial ($p < 0.001$) regions (Fig. 15D). Thus, the D₄R agonist antagonically modulated morphine effect.

No significant changes were observed at 2 h. However, 4 h after drugs administration, an increase of dynorphin mRNA levels (+18.7 %) was detected in the lateral area of the CPu respect to the control group ($p < 0.05$).

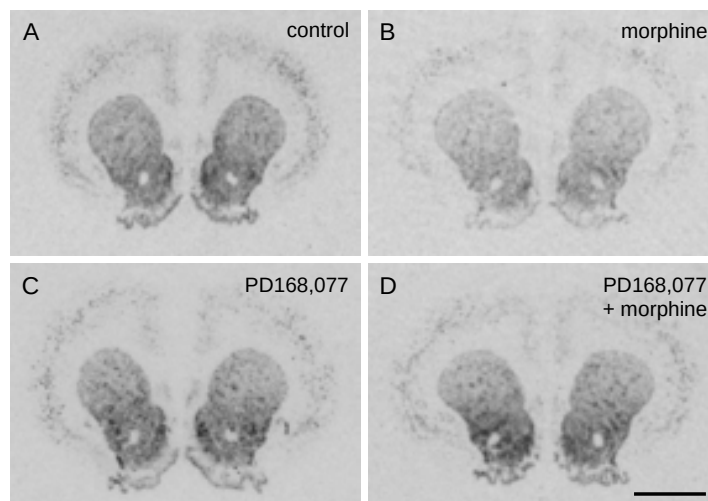


Figure 15. Representative autoradiograms of dynorphin mRNA expression in the rat caudate putamen in control and treated with morphine (B), PD168,077 (C) and PD168,077 + morphine (D) rats after ½ hour. Bar: 500 nm

3. Effects of PD168,077 in the Number of Binding Sites and Affinity of μ Opioid Receptors in Rat Caudate Putamen

Saturation experiments were carried out to evaluate the influence of PD168,077 on MOR affinity (K_d) and number of binding sites (B_{max}) in the rat CPu. Average values for MOR K_D and B_{max} were 1.72 nM and 212.44 fmol/mg of protein respectively in vehicle-treated animals (Fig. 16). Scatchard analysis revealed a straight line which is indicative of one set of binding sites (Fig. 16 inset).

Acute treatment of PD168,077 reduce the B_{max} value for MOR after 2 hours

Acute administration of D_4R agonist PD168,077 reduced (-23.70%; $p < 0.001$) the B_{max} value for MOR at 2 hours, but failed to alter the affinity (K_D) of this opioid receptor in the rat CPu (Fig. 17A-B). The values of the binding parameters for control group were $B_{max} = 221.28$ fmol/mg protein and $K_D = 1.9$ nM. In the D_4R agonist treated group, the

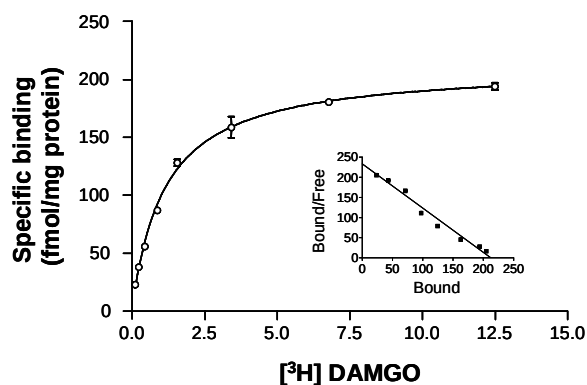


Figure 16. Representative saturation curve of specific binding of MOR agonist [³H]DAMGO in the rat caudate putamen. B_{max} and K_D values were obtained by non linear regression analysis.

values were $B_{max} = 74.44$ fmol/mg protein and $K_D = 1.6$ nM. No changes were observed 4 and 6 h after treatment.

The administration of PD168,077 did not altered B_{max} in a dose-dependent manner, since the doses of 0.5 and 3 mg/kg did not changed significantly the number of binding sites in the rat CPu respect to control group (Fig. 18A). As PD168,077 dose of 1 mg/kg, either the 0.5 mg/kg or 3 mg/kg did not modify MOR affinity (Fig. 18B).

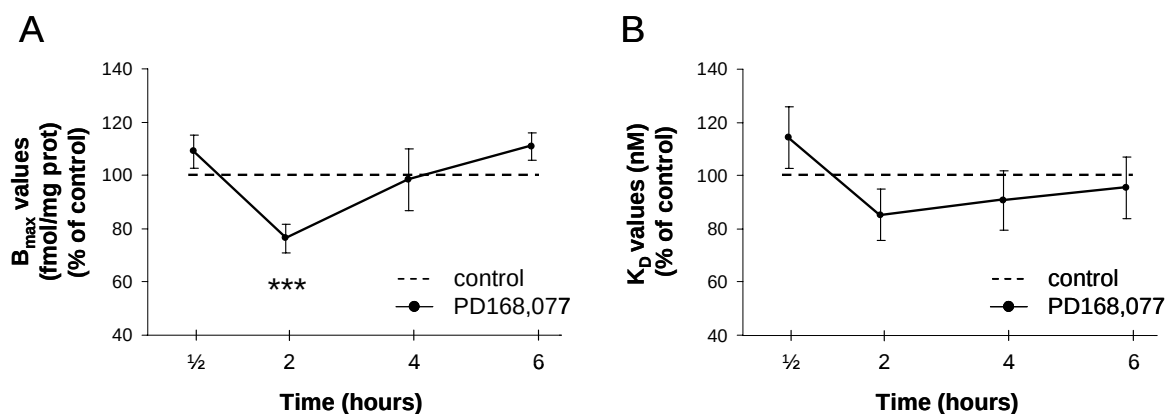


Figure 17. Time-course changes of number of binding site (B_{max}) and affinity (K_D) values for MOR in the rat caudate putamen after PD168,077 acute treatment. Values represent percent of control and are expressed as mean $\pm$ SEM. Two-way ANOVA (time $\times$ treatment) followed by *post hoc* Bonferroni test; *** $p < 0.001$ vs. control.

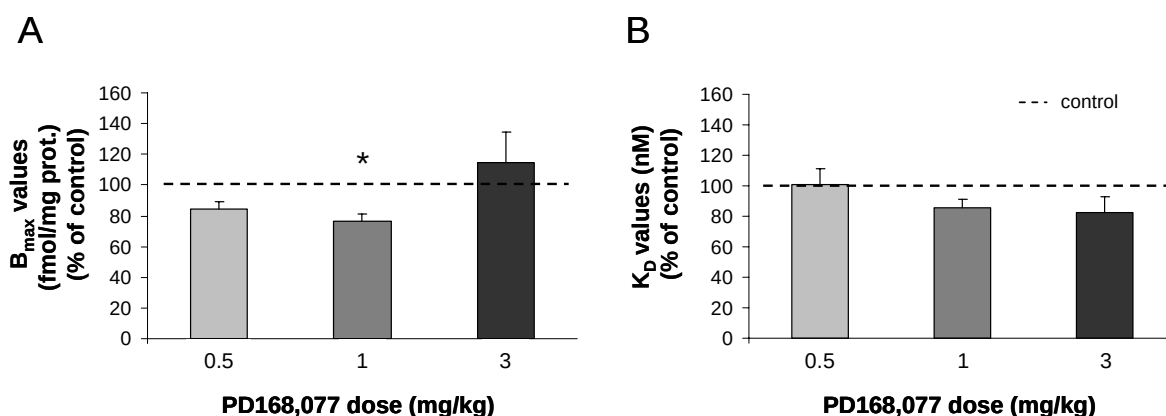


Figure 18. Dose-response changes of number of binding site (B_{max}) and affinity (K_D) values for MOR in the rat caudate putamen after PD168,077 acute treatment. Values represent percent of control and are expressed as mean $\pm$ SEM. Non parametric one-way ANOVA followed by *post hoc* Dunn test; * $p < 0.05$ vs. control.

4. Dose-dependent Effects of PD168,077 on Morphine-induced Locomotor Activity in Mice

The role of D_4R in the expression of morphine-induced locomotion in mice was studied using the open field activity assay and testing the dose-dependent effects of PD168,077.

Morphine, but not PD168,077, increases locomotor activity in mice

Morphine at 10 mg/kg induced an increase in mice total distance moved (measurement of locomotor activity) ($p < 0.001$) (**Fig. 19**) but any of the PD168,077 doses (0.06, 0.2, 1 mg/kg) tested produced statistically significant differences compared to control mice.

Dose-dependent effect of PD168,077 over morphine-induced locomotion

Mice were pretreated with PD168,077 (0.06, 0.2, 1 mg/kg) 15 min before morphine injection to test the role of D₄R in morphine-induced locomotion. PD168,077 (0.2 mg/kg) significantly abolished morphine-induced hiperlocomotion ($p < 0.05$) since it reduces the total distance moved respect to morphine-treated group (Fig. 19).

To further detailed analysis of the PD168,077 dose 0.2 mg/kg effects, locomotion activity was scored during 10

minutes intervals and compared between groups (Fig. 20). In the first interval (1-10 min), there were no differences among groups. However, in the second interval (11-20 min), only morphine administration significantly increased locomotion activity ($p < 0.001$), so D₄R blocked morphine-induced effects. In the last 10 minutes, both morphine and PD168,077 (0.2 mg/kg) + morphine treatments significantly increased mice locomotor activity respect to control group ($p < 0.01$), being higher the effect of morphine ($p < 0.001$).

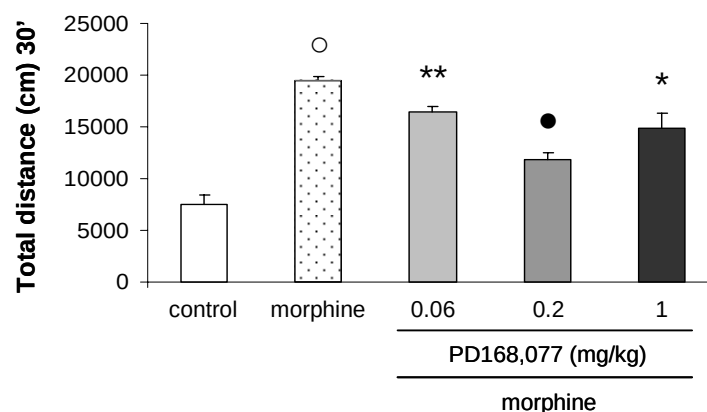


Figure 19. Effect of morphine and PD168,077 (0.06, 0.2, 1 mg/kg) on locomotor activity. Mice were pretreated with one dose of D₄R agonist or its vehicle 15 minutes before morphine administration. Total distance traveled was recorded for 30 minutes. Values are expressed as mean $\pm$ SEM. One-way ANOVA followed by *post hoc* Bonferroni test; ○ $p < 0.001$ vs. control, $p < 0.05$ vs. PD168,077 0.2 mg/kg; ** $p < 0.01$ vs. control; * $p < 0.05$ vs. control.

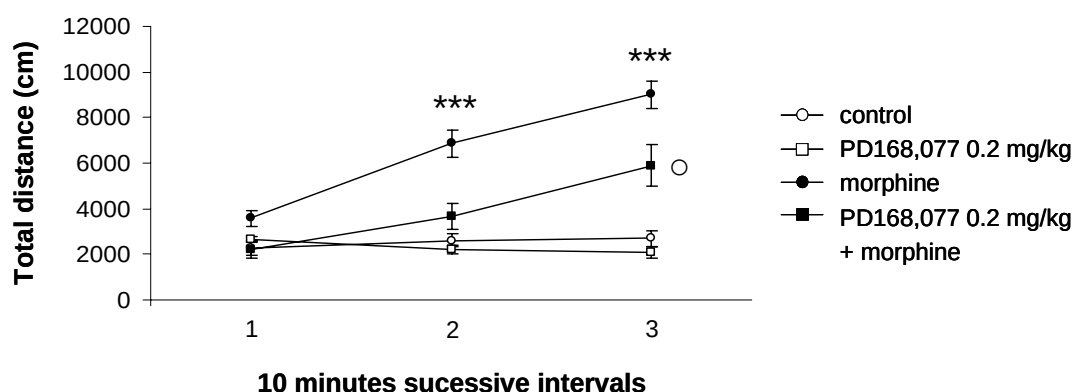


Figure 20. Effect of morphine and PD168,077 (0.2 mg/kg) on locomotor activity. Mice were pretreated with the dose 0.2 mg/kg of D₄R agonist or its vehicle 15 minutes before morphine administration. Graph presents the within-session scores in 3 successive 10-min intervals. Values are expressed as mean $\pm$ SEM. One-way ANOVA followed by *post hoc* Bonferroni test; *** $p < 0.001$ vs. control, PD168,077 0.2 mg/kg PD168,077 0.2 mg/kg + morphine; ○ $p < 0.001$ vs. control, PD168,077 0.2 mg/kg, morphine.

DISCUSSION

1. Methodological Considerations

Drugs

The study of each dopaminergic receptor subtype functions has been conditioned by the little amount of specific ligands available. Among all D₄R agonists and antagonists, PD168,077 maleate (PD168,077) (Glase *et al.*, 1997) and L745,870 trihydrochloride (L745,870) (Kulagowski *et al.*, 1996) were selected for our studies.

PD168,077 is a potent and specific D₄R agonist with >300-fold selectivity versus D₂ and D₃ receptors (Glase *et al.*, 1997). The doses used (1 mg/kg in rats; 0.06, 0.2 and 1 mg/kg in mice) were established by previous bibliography (Gago *et al.*, 2007; Nayak and Cassaday, 2003).

L745,870 is a D₄R antagonist with >900-fold selectivity over D₂R, D₃R, D₁R, D₅R, 5-TH₂ (Kulagowski *et al.*, 1996). This compound is able to block the effects of PD168,077 (Gago *et al.*, 2007; Glase *et al.*, 1997; Hernandez *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2003). The dose used was established by previous bibliography (Bristow *et al.*, 1997; Gago *et al.*, 2007; Patel *et al.*, 1997).

Morphine has been considered as a general agonist of opioid receptors but Raynor and colleagues (1994) demonstrated that it has a higher affinity for MOR than KOR and DOR. Besides, several studies indicates that MOR mediates morphine-induced analgesia, reward effect and withdrawal symptoms (Becker *et al.*, 2000; Matthes *et al.*, 1996; Ribeiro *et al.*, 2005; Sora *et al.*, 1997; Uhl *et al.*, 1999).

Drug administration

The experimental design used by Liu and colleagues (1994) was selected to study morphine effects on c-Fos expression in the CPu. These authors observed that repeated doses of morphine (four 10 mg/kg doses) were more effective than a single equivalent dose (40 mg/kg dose) to increase c-Fos

levels in the CPu and suggested that this effect may be related to the short half-life (30 to 40 min) of morphine in brain (Bhargava *et al.*, 1992). The same drug administration design was used to analyze the expression of Fos B-ΔFos B, p-CREB, dynorphin and enkephalin in the CPu.

To test D₄R and MOR interaction effects, animals received a PD168,077 injection 30 min before morphine doses and were sacrificed at ½, 2, 4 or 6 h after the first morphine injection. Because of this, animals that were treated only with D₄R agonist were sacrificed 1, 2½, 4½ y 6½ after drug administration, but it was assumed that the survival times were the same in both experimental groups.

Antibodies

The specificity and immunoreactivity pattern of the antibodies used to analyse c-Fos, Fos B-ΔFos B and p-CREB expression are widely described in literature, as it was mentioned in materials and methods section. It should be noted that Grande and colleagues (2004) demonstrated that the Santa Cruz Biotechnology antibody anti-Fos B (sc-7203) detects Fos B as well as ΔFos B. There are not available any antibodies that could recognize each of these proteins specifically.

Imagen analysis and quantification

Morphine mainly increased c-Fos expression in the DM region of the CPu. In order to compare the effects of the different drug treatments, the quantification of c-Fos IR nuclei was made only in this striatal region. Fos B-ΔFos B and p-CREB have a more homogeneous expression pattern which is not modified by morphine. Thus, the total number of IR nuclei for the TFs was the addition of nuclei quantified in both medial and lateral regions of the CPu.

On the other hand, both MOR and D₄R present a gradient of expression along the

rostral-caudal axis of the CPu (Arvidsson *et al.*, 1995; Rivera *et al.*, 2002; Svingos *et al.*, 1996), so drugs effects were also studied in rostral, middle and caudal levels of this nuclei.

Binding studies

Binding studies were made under saturation conditions using MOR agonist [³H]DAMGO, what lead us to know affinity (K_D) and density (B_{max}) values for MOR in the CPu. To test if the activation of D₄R modifies the pharmacological characteristics of these receptors, *in vivo* experiments were carried out since no changes were detected in experiments made under *in vitro* conditions (dates no shown). This fact indicates that the integrity of cell is essential for MOR and D₄R interaction and that signal transduction mechanisms could be implicated. Receptor-receptor interaction in membranes can not be excluded (Fuxe *et al.*, 2007).

Locomotor activity

The effect of morphine administration on locomotion is different in rat than in mouse. In rats, morphine produces a biphasic effect with motor inhibition, with frozen postures and trunk rigidity (opiate catalepsy), followed by hyperlocomotion (Vanderschuren *et al.*, 1997; Walter and Kuschinsky, 1989). In contrast, morphine only causes an increase of locomotion in mice, although the magnitude of the effect depends on mouse strains (Belknap *et al.*, 1989, 1998; Brase *et al.*, 1977; Cadoni *et al.*, 2000; Coudereau *et al.*, 1996; Kuribara, 1995; Murphy *et al.*, 2001; Oliverio and Castellano 1981). Thus, the study of D₄R role on the expression of morphine-induced hyperlocomotion was made in C57BL/6J mice.

2. Role of the Striatum in Drug Addiction

The CPu plays an important role in locomotor control and contributes to the integration of both sensorial and motor information (Graybiel, 1998; Graybiel *et al.*, 2000; Hikosaka *et al.*, 1999; White, 1997).

As it was mentioned before, the CPu comprises two compartments depending on afferent and efferent connexions (Gerfen, 1992; Graybiel and Ragsdale, 1978). Striosomes have been related to cognitive, reward and motivational functions (Courtney *et al.*, 1998; Eblen and Graybiel, 1995; Kunishio and Haber, 1994; White and Hiroi, 1998), while matrix regulates sensorial and motor information (Kunishio and Haber, 1994; White and Hiroi, 1998).

The Acb and the mesolimbic pathway, reward-related structures, have been implicated in motivational function and drug-related behaviours (Wise, 2002). However, the CPu and the nigrostriatal pathway have been widely identify with motor function, the expression of drug-induced stereotypes (Morelli *et al.*, 1989) and play an important role in drug-related habit formation (Graybiel, 1995, 1998; White, 1989). Recently, it has been proposed that the nigrostriatal pathway form an ascending spiral from the Acb shell to the CPu that creates a hierarchy of information flow (Haber *et al.*, 2000). Besides, the striatum provides an anatomical basis for a limbic/cognitive/motor interface, so actions and information regulated by Acb go under CPu regulation (Haber *et al.*, 2000).

Habit learning is an important key in the development of drug addiction (Zola-Morgan and Squire, 1993). Evidences from input/output connections, behaviours studies and from the analysis of gene expression after drug administration suggest that striosomes may play a critic role in learning

and habit acquisition process related to drug addiction (White and Hiroi, 1998; Canales, 2005). White and Hiroi (1998) showed that rats with electrodes in striosomes show a faster acquisition of new behaviours after electrical self-stimulation than rats with the electrodes in matrix. Studies made by Brown and colleagues (2002), using a [^{14}C]deoxyglucose metabolic mapping of striosomes and matrix in the CPu, observed that neutral behavioural states were associated with peak metabolic activity confined to the matrix. These results suggest that during relatively neutral behavioural conditions the balance of activity between the two compartments favours the matrix and that during reward-related behaviours the peak of metabolic activity is higher in the striosomes.

MORs mediate morphine effects (Matthes *et al.*, 1996; Sora *et al.*, 1997). In the CPu, these receptors are expressed in both types of striatal projections neurons located in striosomes (Guttenberg *et al.*, 1996; Mansour *et al.*, 1995; Moriwaki *et al.*, 1996), so this striatal compartment may modulate the expression of some of morphine effects.

3. Interaction of D_4 and μ Opioid Receptors in the Caudate Putamen

Although regional colocalization of D_4R and MOR in striosomes has been established (Rivera *et al.*, 2002), only indirect evidences suggest that both type of receptors are co-expressed in estriatonigral and estriatopallidal neurons (Arvidsson *et al.*, 1995; Guttenberg *et al.*, 1996; Mansour *et al.*, 1995; Moriwaki *et al.*, 1996; Rivera *et al.*, 2002, 2003).

Regional colocalization suggests that both receptors may interact physically in cell membranes (Bouvier, 2001; Fuxe *et al.*, 2007; Milligan, 2004), or regulating gene expression by TFs and second messengers pathways modulation (Fuxe *et al.*, 2007).

The results showed in this doctoral thesis demonstrate for the first time that D_4R and MOR interact in the CPu at different levels:

a) D_4R activation decreases the number of MOR binding sites in cell membranes in the CPu.

b) the activation of D_4Rs modifies the c-Fos, Fos B- Δ Fos B and p-CREB expression pattern induced by morphine.

c) D_4R activation with PD168,077 blocks morphine-induced effects on both enkephalin and dynorphin ARNm levels.

d) PD168,077 antagonistically modulates morphine-induced hyperlocomotion in mice.

Binding experiments helps to obtain evidences about receptor-receptor interaction at cell membrane level that implicates changes in receptors pharmacological characteristics (K_D y B_{max}). In our study we describe a decrease of MOR density 2 hours after PD168,077 acute administration, without changes in MOR affinity.

As we mentioned before, this effect was observed in *in vivo* conditions but not in *in vitro* ones, what suggest that intracellular mechanism are involved, although physical interaction between both types of receptors can not be excluded.

Several processes may explain this effect:

a) *Physical interaction between receptors may induce MOR internalization after D_4R activation.*

Receptor-receptor interaction concept was first described by Luigi Agnati and Kjell Fuxe in the 1980's (Agnati *et al.*, 1980; Fuxe *et al.*, 1981). Since then, many studies have described positive and negative cooperation between receptors and dimmers formation by the same type of receptors or by different family receptors subtypes (Angers *et al.*, 2002; Franco *et al.*, 2000; Fuxe *et al.*, 2007; Marshall *et al.*, 1999; Milligan, 2004).

D_4R and MOR may be expressed in the same cell and could physically interact: the internalization of D_4R is induced after its activation by dopamine (Cho *et al.*, 2006). This could lead to MOR desensibilization by kinases-mediated phosphorylation and internalization, what is known as heterologous desensibilization (El Kouhen *et al.*, 2001). In a previous work (Gago *et al.*,

2007), we showed using immunohistochemical techniques that PD168,077 acute administration decreases MOR IR in striosomes after 30 minutes. Taken together these evidences, we could suggest that as a consequence of D₄R activation, MOR receptors are internalized and rapidly degraded (since immunohistochemical techniques detects both active receptors in membrane and inactive receptors in cytosol), reducing the intracellular pool of MOR. Thus, desensitized receptors can not be replaced and the density in cell membrane is reduced. The absence of effects at 4 and 6 h may indicate that synthesized new MOR receptors have been incorporated to membrane.

GRKs and β -arrestins are implicated in D₁, D₂, D₃ and D₄ dopaminergic receptors desensitization (Cho *et al.*, 2006; Ito *et al.*, 1999; Itokawa *et al.*, 1996; Iwata *et al.*, 1999; Jiang y Sibley, 1999; Kabbani *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2001). The D₃R and D₄R desensitization relies more heavily on the GRKs cellular levels than other dopamine receptor subtypes (Cho *et al.*, 2006). Studies made in β -arrestin2 knockout mice (Bohn *et al.*, 1999, 2000) and in cell culture of striatal neurons that express high levels of GRK2 (Habersack-Debic *et al.*, 2005) confirm that MOR internalization is also regulated by these proteins (Beaulieu, 2005; Oakley *et al.*, 2000; Raehal and Bohn, 2005; Zhang *et al.*, 1998). So, since the same proteins are involved in both D₄R and MOR desensitization, it is possible that the activation of D₄R may cause changes in GRK and β -arrestins cellular levels that could lead MOR internalization.

As it was mentioned, acute tolerance is a process that implicates changes at cell membrane and second messengers levels and is the consequence of receptors desensitization process (Bilecki *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2003; Horner and Zadina, 2004; Narita *et al.*, 1995). It has been suggested that the slow recycling rate of MOR after morphine administration may contribute to development of opioid

tolerance and addiction (Borgland *et al.*, 2003; Keith *et al.*, 1996, 1998; Koch *et al.*, 2001, 2005). The fact that D₄R activation modifies MOR expression in cell membrane may indicate that these dopaminergic receptors could be implicated in the expression of opioid tolerance.

b) *MOR expression is regulated by D₄ receptors.*

D₄Rs activation may cause changes in transcription and transduction processes of MOR gene, inhibiting its expression. MOR gene is modulated by two promoters (Ko *et al.*, 1997; Liang *et al.*, 1995; Liang and Carr, 1997; Min *et al.*, 1994), so its regulation is complex. Chronic cocaine and haloperidol administration modulates MOR mRNA levels in Acb and CPu, so dopamine is involved in the regulation of its expression (Azaryan *et al.*, 1998; Delfs *et al.*, 1994). Previous results of our laboratory (Gago *et al.*, 2007) show that PD168,077 acute administration also reduces MOR IR in striosomes after 6 h. This effect was specific of D₄R since its antagonist L745,870 blocks it. Besides, no others D₂-like receptors may be involved since quipiroil (D₂/D₃ agonist) and raclopride (antagonist D₂/D₃) acute administration does not have any affect on MOR IR (Gago *et al.*, 2007), maybe because the low expression of D₂R and D₃R receptors in striosomes (Fuxe *et al.*, 2006; Levesque *et al.*, 1992).

However, our results show that no changes in number of MOR binding sites 6 h alter D₄R agonist administration. It could happen that transcription and translation process of MOR gene are blocked, but MOR located already in membranes are not affected.

c) *MOR internalization may be induced by endogenous opioid peptides binding.*

Dopamine oppositely regulates neuropeptides expression in striatonigral and striatopallidal neurons via D₁R and D₂R respectively (Angulo and McEwen, 1994; Gerfen, 1992; Gerfen and Wilson, 1996).

In the present work it has been described that the activation of D₄Rs produces an increase of enkephalin expression in the CPu 2 h after PD168,077 administration.

This peptide may bind to MOR, what could induce its internalization, and perhaps its degradation (Gerrits *et al.*, 2003; Monory *et al.*, 2000; Raynor *et al.*, 1994). Wang and colleagues (1997) have suggested that enkephalin may be the main ligand of MOR in the CPu since dendrites of neurons that express MOR receive connexions from enkephalin containing neuronal terminals (Wang *et al.*, 1996). This idea is supported by Kowalski and colleagues (1992) experiments that show that enkephalin levels are <10-fold than endorphin levels in the CPu.

Striatopallidal neurons may release enkephalin throughout their collateral axons in the CPu (Park *et al.*, 1980; Wilson and Groves, 1980). It is known that enkephalin and its derivate DAMGO induce a rapid and robust MOR internalization but not morphine (Arden *et al.*, 1995; Keith *et al.*, 1998). Thus, the increase of enkephalin expression may cause MOR activation and internalization, what is reflected in the reduction of B_{max} by PD168,077.

MORs are localized in dendrites and spiny dendrites (Arvidsson *et al.*, 1995; Moriwaki *et al.*, 1996) and D_4R are expressed in somas, dendrites and spiny dendrites (Rivera *et al.*, 2003) in striatal neurons. This fact suggests that different regulation of cellular functions could happen in both cell compartment what may explain the interaction of both receptors at different levels: at cell membrane level, as binding experiments and previous results (Gago *et al.*, 2007) indicate, and at intracellular signalling transduction pathways, since MOR expression may be regulated via transcriptions factors or endogenous peptides as the results collected in this thesis show.

3.1. Effects of μ opioid receptors activation

Among all transcription factors, c-Fos, Fos B, Δ Fos B and CREB play an important role in drug addiction (Guitart *et al.*, 1992; Gutstein *et al.*, 1998; Liu *et al.*, 1994; Nye

and Nestler, 1996; Widnell *et al.*, 1996) and in the effects of drugs of abuse on genes expression in Acb and CPu (Nestler, 2004a,b).

The cellular and molecular mechanisms that are trigger by morphine acute administration are not totally clear. Our results show that morphine increase rapidly and transiently c-Fos expression in the DM region of the CPu, with the maximal increase after 2 h (**Fig. 21**). This pattern of expression is in agreement with other authors results (Chang *et al.*, 1988; Curran *et al.*, 1996; Garcia *et al.*, 1995; Gutstein *et al.*, 1998 Liu *et al.*, 1994; Sharp *et al.*, 1995). However, no changes in c-fos mRNA levels were observed at any time ($\frac{1}{2}$, 2 y 4 h). It has been described that a single morphine injection causes an increase of c-Fos mRNA after 1 h (Ferguson *et al.*, 2004; Gutstein *et al.*, 1998). It would be necessary to check if a similar effect is obtained using our model of drug administration.

The c-fos gene is regulated by several upstream regulatory elements. Among them, there have been identified two AP-1 regions (Cochran, 1993), where AP-1 complexes bind (Morgan and Curran, 1991; Sheng and Greenberg, 1990). c-Fos binds to other proteins of Fos and Jun families and form AP-1 complexes, so it can regulate its own expression. Acute administration of morphine increases AP-1 binding (Liu *et al.*,

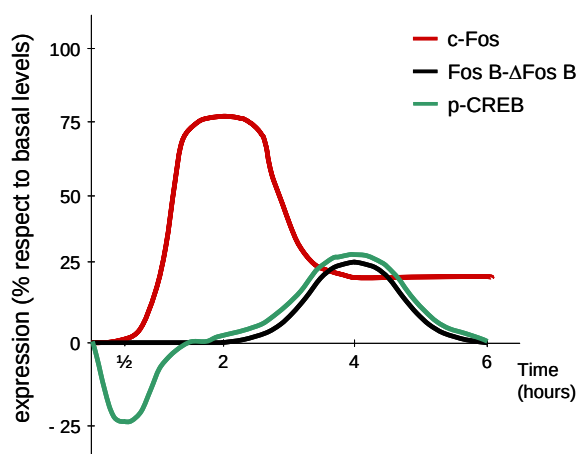


Figure 21. Diagram of morphine time-course effects on transcription factors expression in the rat caudate putamen.

1994) and AP-1-dependent transcription (Bilecki *et al.*, 2004) in the CPu and Acb, so c-Fos induction may be due to a positive self-regulation. Complementary studies would be necessary to analyze morphine acute effects on members of Jun family and to study their role in morphine-induced c-Fos expression.

Little is known about morphine-induced effects on Fos B and Δ Fos B expression. We have observed that acute administration of morphine increases Fos B and Δ FosB expression after 4 hours in the CPu (**Fig. 21**). However, Muller and Unterwald (2005) showed that a single injection of morphine (50 mg/kg; s.c.) does not modify these TFs expression in rat CPu. This fact may be due to drug administration protocol. Since Fos B and Δ Fos B induction occurs later in the time-course than the increase of c-Fos expression, it should be necessary to analyze if c-Fos is involved in the regulation of Fos B- Δ Fos B after morphine consume.

The c-fos gene (Kovacs, 1998; Sheng *et al.*, 1990), as fos b gene (Levine *et al.*, 2005), are regulated by CREB, so changes in the activity of this TF may cause modifications in both genes expression.

Our results show that the administration of morphine has two effects on Serine-133 (Ser-133) phosphorylated CREB expression in the CPu. It is observed a reduction of p-CREB after 30 min and an increase at 4 h (**Fig. 21**). The antibody used in this study specifically recognizes this p-CREB form, so the differences in its expression may be due to changes in the phosphorylation mechanisms, but a variation of total protein levels can not be excluded.

Guitart and colleagues (1992) demonstrated that morphine acutely reduces p-CREB levels in the LC after 30 min, which is in agreement with our results, and suggested that it is due to an inhibition of its phosphorylation. Morphine could modify CREB phosphorylation at Ser-133 by different mechanisms:

a) morphine reduces PKA cell levels (Guitart y Nestler, 1989; Nestler, 1992), what may reduce CREB phosphorylation.

b) in Acb and CPu, MOR IR neurons also express CaMKIV, a protein kinase implicated also in CREB phosphorylation (Ohmstede *et al.*, 1989). Chronic administration of morphine decreases CaMKIV and p-CREB levels in CPu and increases them in Acb, without changing total CREB expression (Nemmani *et al.*, 2005). This fact suggests that morphine acute administration could also reduce CaMKIV in the CPu.

The increase of p-CREB expression observed 4 h after MOR activation may be a compensatory effect that counteracts the 30 min reduction. Perhaps MOR desensibilization, which has been proposed above, may cause the return to basal levels of PKA expression and the increase of CREB phosphorylation.

It has been suggested that c-Fos expression relies on p-CREB (Berkowitz *et al.*, 1989; Fisch *et al.*, 1989; Ginty *et al.*, 1994; Sassone-Corsi *et al.*, 1988; Sheng *et al.*, 1990). Thus, Guitart and colleagues (1992) described that, in LC, morphine reduces c-Fos expression together with the reduction of p-CREB levels. This relationship is also observed after morphine chronic administration and induced withdrawal (Guitart *et al.*, 1992; Hayward *et al.*, 1990; Widnell *et al.*, 1994). However, this dependence is not clear in the CPu and Acb, maybe due to the limited studies made. Our results show that morphine-induced c-Fos expression in the CPu is p-CREB independent. Lonze and Ginty (2002) have suggested that although p-CREB is needed for c-fos gene regulation, a stimuli that induce a prolonged CREB phosphorylation cause only a transitory c-Fos expression, so there is a lack of correspondence between transcriptional activity of p-CREB and c-Fos expression. In agreement with this, Bilecki and colleagues (2004) observed that acute morphine administration increases CRE binding in a slower way and with less intensity than AP-1 binding, what suggests that c-Fos induction may be more associated to AP-1 regulation. Taken together all these evidences, we may say

that CREB is not the main regulator of c-Fos expression in the CPu after morphine acute administration. This supports the idea that CREB is involved in long-termed changes and c-Fos is associated to transitory effects. More experiments should be done to test if morphine acute treatment modifies total levels of CREB and the expression of kinases implicated in its phosphorylation and other elements of CREB family (CREM y ATF-1).

Cocaine and amphetamine also modify c-Fos, Fos B- Δ Fos B and p-CREB expression in the CPu (Carlezon *et al.*, 1998; Chen *et al.*, 1995; Cole *et al.*, 1995; Couceyro *et al.*, 1994; Di Benedetto *et al.*, 2007; Moratalla *et al.*, 1993; Persico *et al.*, 1993), what is due to their effects on dopamine release and turnover (Pierce and Kumaresan, 2006). Morphine increases dopamine release in Acb and CPu (Bontempi and Sharp, 1997; Di Chiara and Imperato, 1988a,b; Lacey *et al.*, 1989), but it is not exactly known which dopaminergic receptors are involved in this opioid drug effects, although D₁R seems to have a major role (Chartoff *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 1994; Muller y Unterwald, 2005).

AP-1 and CRE sequences have been detected in the promoter region of several genes such as dynorphin, enkephalin and tyrosine hydroxylase (TH) (Cambi *et al.*, 1989; Carlezon *et al.*, 1998; Cole *et al.*, 1995; Douglass *et al.*, 1994; Draisci and Iadarola 1989; Konradi *et al.*, 1993 Kumer and Vrana, 1996; Sakai *et al.*, 2002; Turgeon *et al.*, 1997; Yoon and Chikaraishi, 1992). Variations on the expression of TFs that form AP-1 complexes could cause changes in these target genes expression (Abraham and Brewer, 2001; Bronstein *et al.*, 1994; Lonze and Ginty, 2002; Mayr and Montminy, 2001; Nestler *et al.*, 2001).

Our results demonstrate that morphine reduces both enkephalin and dynorphin mRNA levels in a similar way in the CPu, what is not in agreement with other authors results (Przewlocka *et al.*, 1996; Turchan *et al.*, 1997; Yukhananov and Handa, 1997). The reason may be the dose and drug administration procedures used.

The reduction of both endogenous opioid peptides and p-CREB expression happens at the same time, so this is a new evidence that confirms that CREB is involved in the expression of both opioid peptides.

On the other hand, the expression of opioid receptors is regulated by their endogenous ligands (Mavridis and Besson, 1999). Chronic administration of naloxone induces both enkephalin and dynorphin mRNA expression in the CPu, what may be the result of a direct action of naloxone on MOR and DOR located in striatal neurons (Mavridis and Besson, 1999). MOR is expressed by striatonigral and striatopallidal neurons (Guttenberg *et al.*, 1996), what is in agreement with the fact that morphine modulates both peptides expression.

3.2. Effects of D₄ receptors activation

Dopamine regulates TFs expression and their activity (Berke *et al.*, 1998; Cole *et al.*, 1994; Doucet *et al.*, 1996; Konradi *et al.*, 1996).

Due to the limited D₄R selective ligands available, the role of this receptor on signalling pathway and neuropeptides expression in the CPu are not well known. In the present work, it has been shown that PD168,077 causes an increase of c-Fos expression in the CPu after 30 min and reduces it after 4 h, while D₄R activation induces Fos B y Δ Fos B levels only after ½ h (Fig. 22).

In contrast, D₄Rs activation did not modify c-fos mRNA along the time, so

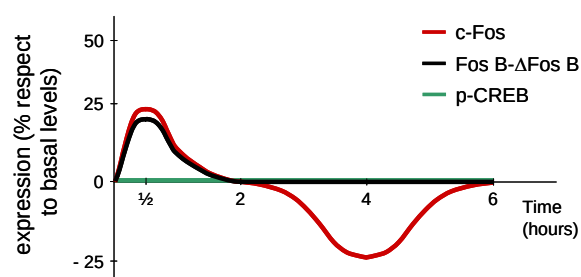


Figure 22. Diagram of time-course effects of dopaminergic D₄ receptors activation on transcription factors expression in rat caudate putamen.

changes in c-Fos protein expression may happen at transduction process level or at different times than the ones tested in this work.

D₄R belongs to D₂-like receptors family. Several studies have compared the effects on c-Fos expression in the CPu of a few D₂ ligands. Raclopride (D₂/D₃ antagonist) increases c-Fos levels with less intensity than Haloperidol (D₂ antagonist), which induces Fos B also (Berke *et al.*, 1998; Dragunow *et al.*, 1990; MacGibbon *et al.*, 1995; Miller, 1990; Wan *et al.*, 1995). The

D₂R/D₃R agonist quinlorane (Le Moine *et al.*, 1997) decreases c-fos mRNA levels. However, clozapine (non-selective D₄R antagonist) does not have any effect on c-Fos (Nguyen *et al.*, 1992; Robertson y Fibiger, 1992). Thus, D₄Rs play a different role in the regulation of c-Fos expression than D₂R and D₃R.

Besides, D₁ and D₂ receptors regulate c-fos and fos b genes in an opposite way in the CPu: acute administration of SKF38393 (D₁ agonist) increase c-Fos and reduces Fos B and eticlopride (D₂ antagonist) induce c-Fos expression (Berke *et al.*, 1998; Robertson *et al.*, 1990, 1992). These differences may be due to the pharmacological properties of receptors (Missale *et al.*, 1998; Seeman y Van Tol, 1994) and their different distribution pattern in striatal projection neurons (Robertson *et al.*, 1989; 1992).

Respect to p-CREB, PD168,077 did not have effects on its expression (**Fig. 22**). After unilateral 6-hydroxydopamine (6-OHDA) lesion of the SN, the administration of L-DOPA increases p-CREB levels in the ipsilateral CPu, and this response was antagonistically regulated by SCH 23390 (D₁ antagonist) pre-treatment, but not with eticlopride (Cole *et al.*, 1994). Besides, the D₁R agonist SKF 38393, but not quinpirole, reproduces this effect (Cole *et al.*, 1994), so p-CREB expression is mainly regulated by D₁-like receptors. However, treatment with clozapine decreases p-CREB phosphorylation at Ser-133 of CREB (Pozzi *et al.*, 2003), so it can not be excluded that

D₂-like receptors take part in the regulation of this TF expression and phosphorylation.

To date, the studies have been made using non-specific ligands for D₁- or D₂-like subtypes. Thus, new experiments would be necessary to compared PD168,077 effect with the changes produced by other dopaminergic receptor selective ligands that are now available what would help to determine D₄R functions.

Dynorphin and enkephalin expression in the CPu is regulated by dopaminergic receptors (Bronstein *et al.*, 1994; Mavridis and Besson, 1999). D₁Rs in striatonigral neurons are involved in the regulation of dynorphin (Moratalla *et al.*, 1996b; Gerfen *et al.*, 1990, 1991) while D₂Rs, which are expressed in striatopallidal neurons, modulate enkephalin (Gerfen *et al.*, 1990, 1991; Steiner and Gerfen, 1999).

D₄Rs are expressed in both types of projections neurons (Rivera *et al.*, 2003). The results presented in this thesis show that the activation of this dopaminergic receptor subtype modifies mRNA enkephalin levels only. PD168,077 treatment has a double effect on it since it reduces this peptide mRNA levels after 30 min and increases it after 4 h. This fact, together with the absence of effect on dynorphin mRNA levels, indicates that the D₄Rs effects are similar to the described for D₂Rs.

3.3. Effects of both D₄ and μ opioid receptors activation

We have described for the first time that D₄R modulates morphine-induced effects on gene expression, what is a new evidence of the crucial role of dopamine in the modulation of morphine effects in the CPu (Liu *et al.*, 1994, Cook and Wirtshafter, 1998).

The time-course effects of both receptors interaction is complex. Thus, at short-term points ($\frac{1}{2}$ and 2 h) their coactivation blocks each drugs effects on c-Fos expression (**Fig. 23**), but after 4 and 6 h, PD168,077 and morphine coadministration induce this TF expression (**Fig. 23**).

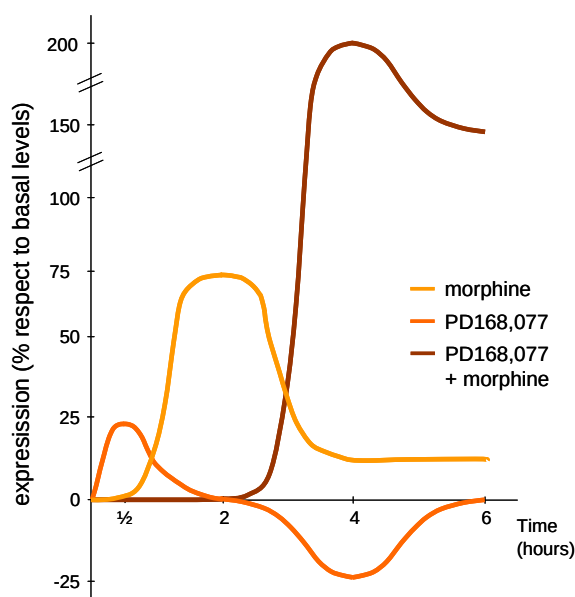


Figure 23. Diagram of time-course effects of dopaminergic D_4 and μ opioid receptors activation on c-Fos expression in rat caudate putamen.

Several mechanisms may explain these phenomena:

a) MOR endocytosis, which may happen after D_4 Rs activation, could avoid morphine-mediated changes in intracellular signalling pathways and different genes expression.

b) Morphine administration increases dopamine levels in the CPu (Bontempi and Sharp, 1997; Di Chiara and Imperato, 1988a; Lacey *et al.*, 1989). It has been suggested that dopamine binds to D_1 Rs and induces c-Fos expression (Liu *et al.*, 1994). The agonist PD168,077 may act as an indirect inhibitor of D_1 Rs since its administration attenuates morphine-induced dopamine liberation in the CPu (dates of our laboratory not shown). The administration of D_2/D_3 agonist quinpirole prevents morphine-induced c-Fos expression (Cook and Wirtshafter 1998), so it could be concluded that it is a common effect for D_2 -like receptors.

c) D_4 Rs may modify MOR intracellular signalling pathway through changing kinases levels in the cell. D_1 Rs activates cAMP signalling pathway (Hemmings *et al.*, 1984) and stimulate the phosphorylation of the protein DARPP-32 at the residue Threonine-34 (Thr-34) (Borgkvist and Fisione,

2007), which modulates PP-1 and PKA activity (Svenningsson *et al.*, 2004). However, this effect is blocked by DAMGO (MOR agonist) administration (Lindskog *et al.*, 1999), what suggests that dopaminergic and opioid receptors may interact at intracellular signalling pathways level.

Dopaminergic agonists and morphine induce c-Fos mainly in striatonigral neurons (Cenci *et al.*, 1992; Ferguson *et al.*, 2004; Robertson *et al.*, 1990). Although there are not direct evidences, these striatal neurons may express together MOR, D_1 R and D_4 R (Georges *et al.*, 1999; Gerfen *et al.*, 1990; Harrison *et al.*, 1990, 1992; Le Moine *et al.*, 1991, 1995; Noble and Cox, 1995; Rivera *et al.*, 2003; Yung *et al.*, 1995), so it is possible that all these receptor interact through the mechanisms exposed above.

On the other hand, the coactivation of D_4 Rs and MOR increases c-Fos expression after 4 and 6 h (Fig. 24), and also increase c-fos mRNA levels at 2 h. This may be due to a compensatory mechanism, but it would be necessary more experiments to test which molecular mechanisms can cause this positive synergism.

The coadministration of PD168,077 and morphine promotes a stronger increase of Fos B- Δ Fos B after ½ h than the one induced by PD168,077 (Fig. 25), so it could be the result of a synergic mechanisms

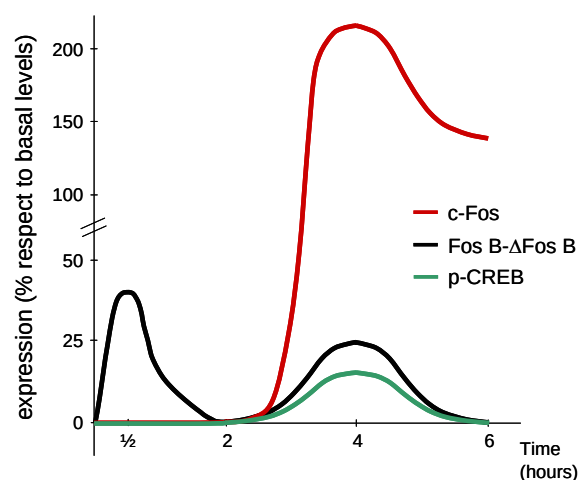


Figure 24. Diagram of time-course effects of dopaminergic D_4 and μ opioid receptors activation on transcription factors expression in rat caudate putamen.

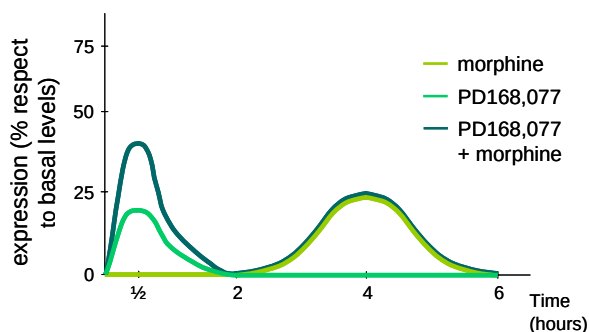


Figure 25. Diagram of time-course effects of dopaminergic D₄ and μ opioid receptors activation on Fos B- Δ Fos B expression in rat caudate putamen.

between D₄Rs and MORs. However, D₄Rs activation does not block morphine-induced Fos B- Δ Fos B expression at 4 h (**Fig. 25**).

As Fos B and Δ Fos B can not be distinguished by the antibody used in this work, it can not be excluded that the observed effects would reflect variations of one of the isoforms but not the other.

On the other hand, D₄Rs activation did not have a clear effect on morphine-induced changes in p-CREB levels at 30 min and did not modified the increase after 4 h (**Fig. 26**).

Fos B and Δ Fos B are associated to movement disorders (Kelz and Nestler, 2000) and the generation of neurological adaptations related to drug addiction (Chen *et al.*, 1997; Nestler, 2004) and CREB is a key element in learning and memory processes (Dash *et al.*, 1990; Davis *et al.*, 2000; Pham *et al.*, 1999). As these TFs are associated to

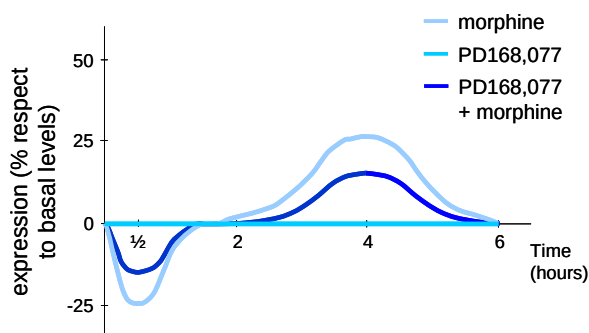


Figure 26. Diagram of time-course effects of dopaminergic D₄ and μ opioid receptors activation on p-CREB expression in rat caudate putamen.

long-term effects, it makes sense that acute activation of D₄Rs has not clear effects on morphine-induced changes in their expression.

On the other hand, D₄R agonist administration blocked the reduction of dynorphin mRNA levels observed ½ h after morphine administration. In the case of enkephalin mRNA levels, D₄R does not only modulate antagonistically the reduction caused by morphine, but the coadministration of PD168,077 and morphine induces its expression after 2 h. As both striatopallidal and striatonigral neurons express D₄Rs (Rivera *et al.*, 2003), and its activation modules morphine-induced changes in enkephalin and dynorphin expression in the CPU, these dopaminergic receptors are involved in the regulation of both striatal output pathways.

4. Estructural Complexity of the Caudate Putamen

The CPU presents a very high complex structural organization due to the afferent and efferent projections and the pattern of expression of several neurochemical markers.

D₄R and MOR distribution in the CPU presents a gradient of expression along the rostro-caudal axis (Arvidsson *et al.*, 1995; Kaneko *et al.*, 1995; Mansour *et al.*, 1995; Rivera *et al.*, 2002; Svingos *et al.*, 1996). Thus, as other authors have made before, the effects on TFs and neuropeptides expression of PD168,077 and morphine were analyzed in rostral, middle and caudal levels of the CPU (Grande *et al.*, 2004; Pavon *et al.*, 2006; Rivera *et al.*, 2002; Sgambato *et al.*, 1997).

The changes caused by morphine acute administration were homogeneously observed along the whole CPU except in some points of the time-course studies, so the rostro-caudal gradient of MOR expression is not reflected by morphine effects (Arvidsson *et al.*, 1995; Kaneko *et al.*, 1995; Mansour *et al.*, 1995).

The effects of PD168,077 administration were mainly observed in the middle and caudal levels, what reflect the higher expression of D₄R in caudal levels than in the rostral ones (Rivera *et al.*, 2002).

The effects of the coadministration of both ligands were also analyzed along the rostro-caudal axis. In this case, the influence of the distribution of D₄R and MOR was different depending on the TF or the time analyzed, so it can not be established a final conclusion.

However, there is a fact that should be pointed out. Although MOR has a parched distribution in the striosomes (Arvidsson *et al.*, 1995; Kaneko *et al.*, 1995; Mansour *et al.*, 1995; Moriwaki *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 1996), and D₄R is also more abundant in this striatal compartment than in the matrix (Rivera *et al.*, 2002), their effects on c-Fos, Fos B-ΔFos B and p-CREB expression do not present a patchy distribution. For example, morphine-induced c-Fos expression is observed in DM and VL regions of the CPu. Fos B and ΔFos B are expressed along the whole CPu, although a latero-medial gradient is observed, and p-CREB is expressed homogenously. Besides, c-Fos expression pattern after morphine administration is different from the observed after other drugs treatment: cocaine induces c-Fos homogeneously in all CPu regions and amphetamine causes a patch pattern (Graybiel *et al.*, 1990). This phenomenon may reflect the activation of different dopamine receptors and different intracellular signalling cascades (Graybiel *et al.*, 1990).

Corticostratial projections are topographically organized, so somatosensorial and motor cortical areas project to dorsal and lateral regions of CPu while limbic ones send their projections to ventral and medial regions (Gerfen and Wilson, 1996). This distribution is maintained throughout the basal ganglia (Gerfen and Wilson, 1996). On the other hand, D₄Rs localized in the matrix, but not in the striosomes, present a latero-medial gradient of expression (Rivera *et al.*, 2002), while

MOR are more abundant in dorsal than in ventral regions (Mansour *et al.*, 1995).

The analysis of enkephalin and dynorphin mRNAs expression was made in detail in lateral and medial regions of the CPu. No differences were observed between lateral and medial regions after PD168,077 or morphine acute treatment. However, the coadministration of both ligands reduces enkephalin mRNA levels and increases dynorphin mRNA expression in the medial region but not in the lateral one. Because of this, we may suggest that the distribution of the input and output projections of the CPu may have an important role in the regulation of these peptides expression.

The analysis of TFs and neuropeptides expression along rostro-caudal and latero-medial axes reflects the complexity of CPu organization and the interaction of D₄R and MOR: the effects of PD168,077 and morphine do not depend only on the distribution of the receptor in the nucleus. The understanding of the CPu organization will provide greater information of its functions, so the study of this nucleus should be always performed considering the different striatal regions and compartments.

5. Dopaminergic D₄ and μ Opioid Receptors Interaction in other Brain Nuclei and the Role of other Neurotransmission Systems

CPu functions are regulated by glutamatergic and dopaminergic inputs that arise from the cortex and the SNC respectively (Gerfen *et al.*, 1987; Gerfen, 1989). D₄Rs and MORs are expressed in SN, cortex and GP (Ariano *et al.*, 1997a; Defagot *et al.*, 1997a,b; Mansour *et al.*, 1987, 1994a,b, 1995; Mrzljak *et al.*, 1996; Peckys and Landwehrmeyer, 1999; Rivera *et al.*, 2003; Rubinstein *et al.*, 1997; Sharif and Hughes, 1989; Tempel and Zukin, 1987), so these receptors could interact in these brain nuclei since morphine and PD168,077 have been systemically administered.

Substantia nigra

In SNC, D₄Rs are localized in cell perikarya (the kind of neuron is unknown) (Defagot *et al.*, 1997b), but in the SNR are expressed in axonal terminals of GABAergic striatal neurons (Mrzljak *et al.*, 1996; Rivera *et al.*, 2003). On the other hand, MOR is expressed in both regions of SN (Mansour *et al.*, 1995) in fibres and axonal varicosities of GABAergic neurons, which regulate dopaminergic neurons located in SNC (Bontempi and Sharp, 1997; Di Chiara and Imperato, 1988a; Lacey *et al.*, 1989). Thus, both types of receptors are involved in the regulation of dopaminergic nigrostriatal pathway, so their activation could contribute to the observed changes in the CPu.

Afferent projections of the SN also participate in the control of nigrostriatal pathway. Previous results of our laboratory (Rivera *et al.*, 2003) suggest that the synthesis of D₄R expressed in SNR occurs in striatonigral neurons, so these dopaminergic receptors are transported through neuronal axons to the SNR, although there is a little contribution from the prefrontal cortex that arise through corticonigral projections (Naito and Kita, 1994). Thus, D₄Rs are involved in the regulation of glutamatergic and GABAergic inputs in SN.

The released dopamine in the CPu by nigrostriatal neurons regulates dynorphin biosynthesis in this nucleus (Engber *et al.*, 1992; Jiang *et al.*, 1990; Li *et al.*, 1990). At the same time, this opioid neuropeptide acts as a modulator of nigrostriatal pathway since striatonigral neurons release dynorphin in the SN, which regulates neuronal activity (Di Chiara and Imperato, 1988b; Herrera-Marschitz *et al.*, 1986; Maisonneuve *et al.*, 1994; Mulder *et al.*, 1984; Reid *et al.*, 1988; Schlosser *et al.*, 1995; Spanagel *et al.*, 1993).

Dynorphin is the main endogenous ligand of KOR (Gerrits *et al.*, 2003; Raynor *et al.*, 1994). In the SN, this receptor subtype is expressed in both SNC and SNR (DePaoli *et al.*, 1994; Mansour *et al.*, 1994a,c; Minami *et*

al., 1993), being more abundant in SNC (Fallon *et al.*, 1985; Mansour *et al.*, 1994c, 1996).

It has been suggested that striatonigral neurons release dynorphin in the SN (Fallon *et al.*, 1985; Weiss-Wunder and Chesselet, 1990), where binds to KORs that are localized in SNR GABAergic neurons and in SNC dopaminergic neurons (Pickel *et al.*, 1993). GABAergic neurons connect to the dopaminergic ones inhibiting their activity (Spangler *et al.*, 1997).

The reduction of dynorphin mRNA levels in the CPu by morphine may cause a decrease of the peptide expression and a minor liberation in SN (**Fig. 27**). This could explain the increase of the firing rate of dopaminergic nigrostriatal neurons 2 h after morphine acute administration described by other authors (Bontempi and Sharp, 1997; Di Chiara and Imperato, 1988a) and the increase of TH IR in the CPu as we have observed (dates of our laboratory not shown). Several evidences support this hypothesis. Thus, the administration of naltorphine blocks KORs and increases morphine-induced locomotor sensitization and dopamine liberation in the striatum (Spanagel and Shippenberg, 1993). The activation of these opioid receptors reduces the firing rate of dopaminergic neurons in the SN (Walker *et al.*, 1987) and the liberation of dopamine in the striatum (Manzanares *et al.*, 1991) together with the reduction of reward properties of morphine (Suzuki *et al.*, 1999).

KOR-dynorphin regulation mechanism of nigrostriatal pathway is complementary to MOR mechanism (**Fig. 27**). The activation of these opioid receptors by morphine inhibits GABAergic neurons, which causes the disinhibition of dopaminergic neurons, increasing the liberation of dopamine in the CPu.

Although D₄Rs activation did not modify dynorphin mRNA levels, the administration of PD168,077 blocks its morphine-induced reduction, so these dopaminergic receptors could counteract the increase of dopamine liberation in the CPu. In fact, results of our

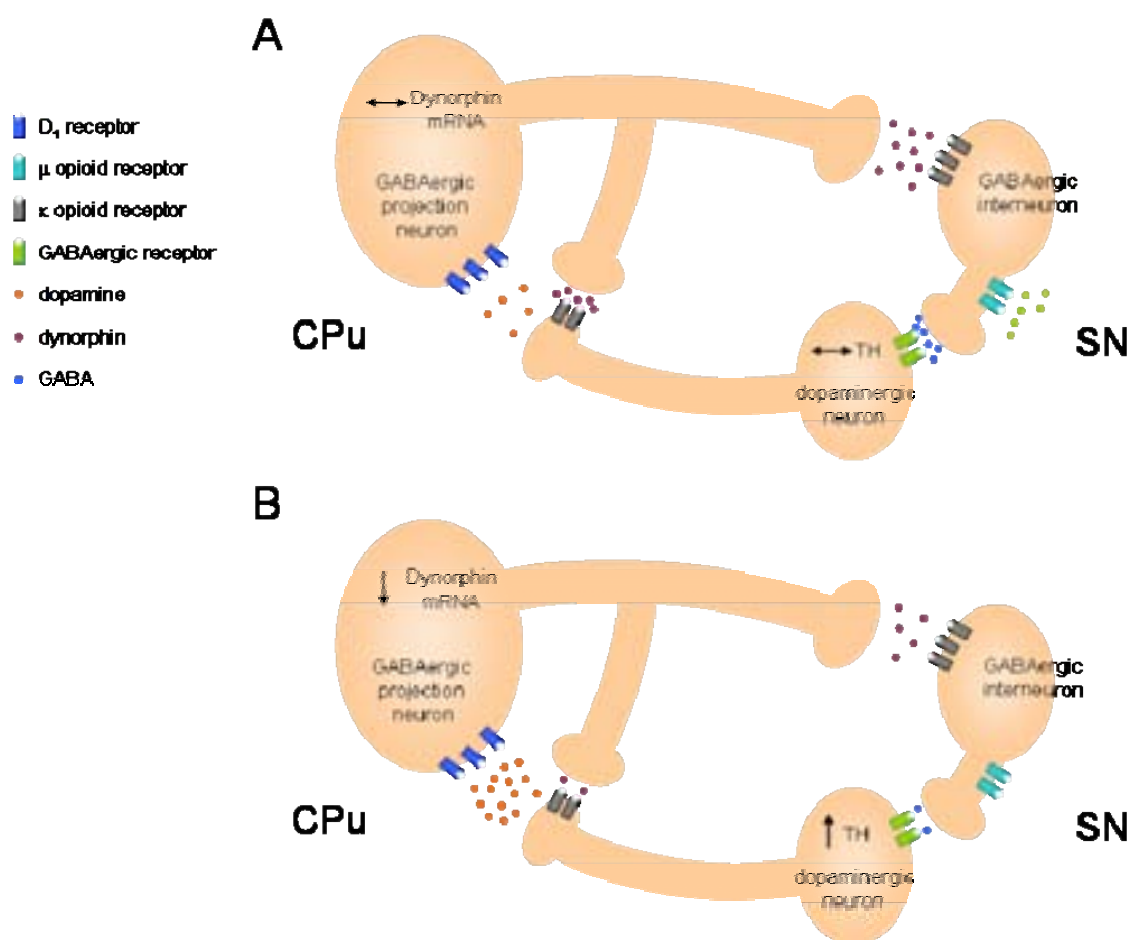


Figure 27. Esquematic diagram of morphine acute administration effects on striatonigral and nigrostriatal pathways. Morphine reduces dynorphin expression on striatonigral neurons in the caudate putamen and binds to MOR in GABAergic interneurons in the substantia nigra (A), inhibiting them (B). Dopaminergic neurons in the substantia nigra become disinhibited (B), increasing dopamine liberation rate in the caudate putamen.

Abbreviations: CPu, caudate putamen; SN, substantia nigra; TH, tyrosine hydroxylase

laboratory show that PD168,077 blocks morphine-induced increase of TH IR in the CPu (dates not shown). Besides, it can not be excluded the possibility that D₄Rs may cause MOR internalization in SN neurons, contributing to the blockage of morphine effects. It would be necessary to identify the type of neurons where D₄R and MOR are localized in the SN and test if these receptors are coexpressed in the same cells.

Globus Pallidus

In the CPu, estriatopallidal neurons express enkephalin (Cuello and Paxinos, 1978; Gerfen and Young, 1988), so this neuropeptide participates in the regulation of

striatopallidal pathway (Curran and Watson, 1995; Gerfen and Young, 1988; Gerfen and Wilson, 1996; Reiner and Anderson 1990.).

Enkephalin is the main ligand of DORs. In the CPu, these receptors have an abundant and homogeneous expression and can be localized in collateral axons of striatal neurons, so they act as autoreceptors (Mansour *et al.*, 1993) and enkephalin could self-regulate its expression. In the GP, no DOR mRNA has been detected and the number of binding sites is low (Mansour *et al.*, 1993) (Mansour *et al.*, 1993, 1994a,b,c, 1995).

It has been postulated that in the GP enkephalin exerts an indirect excitatory effect since it is able to inhibit the release of

GABA by striatopallidal neurons (Mavridis and Besson, 1999). Thus, both neuroactive substances exert opposite effects on GP excitability and locomotion regulation (Mavridis and Besson, 1999).

GP MORs are also involved in locomotor activity control (Dewar *et al.*, 1985). Enkephalin also binds MOR with high affinity (Gerrits *et al.*, 2003; Monory *et al.*, 2000; Raynor *et al.*, 1994), so it could activate these opioid receptors in the GP and regulate this nucleus. The reduction of enkephalin mRNA levels in the CPu by morphine could modify both types of receptors activity in the CPu and GP.

D₄Rs are expressed in both LGP and MGP in axonal terminals of GABAergic neurons and in some of pallidal neurons (Ariano *et al.*, 1997a; Mauger *et al.*, 1998; Mrzljak *et al.*, 1996; Rivera *et al.*, 2003). These receptors are synthesized in striatal neuronal somes and are transported to their terminals (Rivera *et al.*, 2003) in the GP. Since these dopaminergic receptors are expressed in pallidal neurons (Defagot *et al.*, 1997b) as MORs, it is possible that both types of receptors are expressed in the same neurons. This cellular distribution of receptors, together with the fact that activation of D₄Rs blocks morphine-induced

reduction of enkephalin expression in the CPu, suggests that it may exist a receptor-receptor interaction between them in the GP.

Cortex

In cortex, both glutamatergic pyramidal neurons, which project to CP and SN (Carter, 1982), and GABAergic interneurons, express D₄R (Ariano *et al.*, 1997a; Khan *et al.*, 1998; Mrzljak *et al.*, 1996; Rubinstein *et al.*, 1997).

D₄R knockout mice show cortical hyperexcitability (Rubinstein *et al.*, 2001), effect that wild type mice show after PNU-101387G (D₄R antagonist) (Rubinstein *et al.*, 2001). These evidences suggest that D₄R may act as an inhibitory modulator of cortical glutamatergic and GABAergic activity and regulates excitatory output projections to basal ganglia (Rubinstein *et al.*, 2001; Tarazi *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 2002). In agreement with this, Wang and colleagues (2003) suggested that D₄R and NMDA glutamatergic receptors interact in prefrontal cortex (**Fig. 28A**). NMDA channels activity is regulated by a complex phosphorylation/desphosphorylation process mediated by PKA, PP-1 and CaMKII (Lieberman and Mody, 1994; Raman *et al.*,

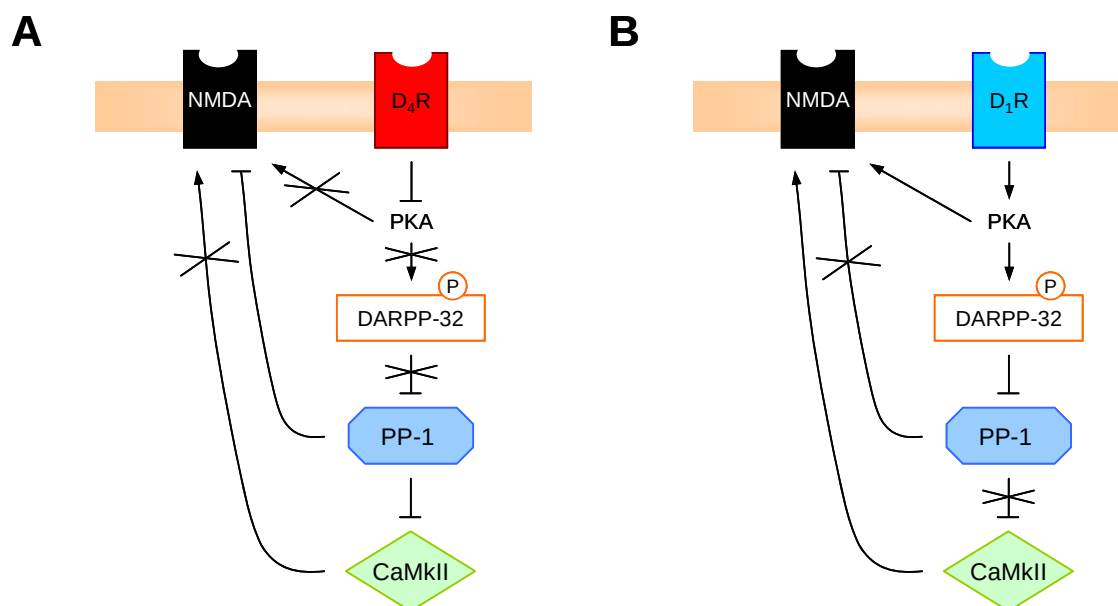


Figure 28. Diagram of dopaminergic D₄ (A) and D₁ (B) receptors activation effects on NMDA receptor expression in cortical and striatal neurons respectively.

1996; Westphal *et al.*, 1999). D₄Rs activation implies a reduction of PKA activity and consequently the disinhibition of PP-1, what reduces CaMKII autophosphorylation. The consequence is the blockade of the current through NMDA channels. Besides, PKA and CaMKII are mediators of NMDA receptors intracellular trafficking in the cell (Crump *et al.*, 2001; Slepnev *et al.*, 1998) (**Fig. 28A**), so the reduction of these proteins activity induces the internalization of these glutamatergic receptors and reduces their expression in cell membranes. Because of this, PD168,077 effects in the CPU may be mediated by presynaptic inhibition of corticostriatal neurotransmission.

Pyramidal neurons of the prefrontal cortex establish connexions with striosomal neurons in the CPU and MOR is expressed in dendrites and spiny dendrites of these striatal neurons but also in a few cortical axons (Berendse *et al.*, 1992; Donoghue and Herkenham, 1986; Gerfen, 1984, 1989; Kincaid and Wilson, 1996; Wang *et al.*, 1996; Wang y Pickel, 1998), so these receptors could be involved in the postsynaptic regulation of corticostriatal neurotransmission. All these evidences support again the idea of a D₄R-MOR interaction.

Interaction between D₄ receptors and other types of receptors in the CPU

D₄Rs could also interact with other dopaminergic or non-dopaminergic receptors in the CPU to regulate morphine-induced effects.

In the CPU, D₁Rs regulates the number of NMDA receptors in cell membrane (Flores-Hernandez *et al.*, 2000; Keefe and Ganguly, 1998; Snyder *et al.*, 1998) since the activation of these dopaminergic receptors increases the density of glutamatergic receptors (Flores-Hernandez *et al.*, 2000) (**Fig. 28B**). Although there are no studies about D₄R effects on NMDA receptors in striatal neurons, D₁R and D₄R may oppositely regulate these receptors

trafficking and modulate glutamatergic transmission postsynaptically. One fact that supports this idea is that D₁R and NMDA receptors are more abundant in the CPU in D₄R knockout mice than in wild type mice (Gan *et al.*, 2004), what may reflect a compensatory process that counteract the lack of D₄R.

NMDA and MOR receptors are expressed in the same striatal neurons (Wang and Pickel, 2000). Thus, effects on cortical glutamatergic transmission caused by D₄Rs may produce changes in striosomal neurons, what can have an influence on morphine effects.

Glutamate metabotropic receptors (mGlu) are highly expressed in striatal projection neurons (Albin *et al.*, 1992; Martin *et al.*, 1992; Shigemoto *et al.*, 1992; Testa *et al.*, 1994). These receptors could also be involved in PD168,077 and/or morphine-induced effects since mGlu activation increases enkephalin and dynorphin expression in the CPU (Wang and McGinty, 1998). Besides, the increase of glutamate release in the CPU contribute to the stimulation of nigrostriatal terminals in the CPU (Westerink *et al.*, 1992) or to the activation of dopaminergic neurons in the SN, causing an increase of dopamine liberation in the CPU (Nieoullon *et al.*, 1978; Overton and Clark, 1992; Taber and Fibiger, 1993). Thus, D₄R may alter nigrostriatal dopaminergic neurons via the induction of glutamate liberation. The administration of naloxone (antagonist of opioid receptors) (Zukin *et al.*, 1982) and CTOP (MOR antagonist) (Toll, 1992) causes a rise of glutamate liberation in the striatum. Thus, the tonic inhibition of glutamatergic neurotransmission that could occur in normal physiologic conditions (You *et al.*, 1999) may be modified by morphine administration.

All the evidences exposed in this study that are summarized in **figure 29**, suggest that D₄Rs could modulate TFs and neuropeptides expression in the CPU and regulates morphine-induced changes not only via their direct activation in this nucleus,

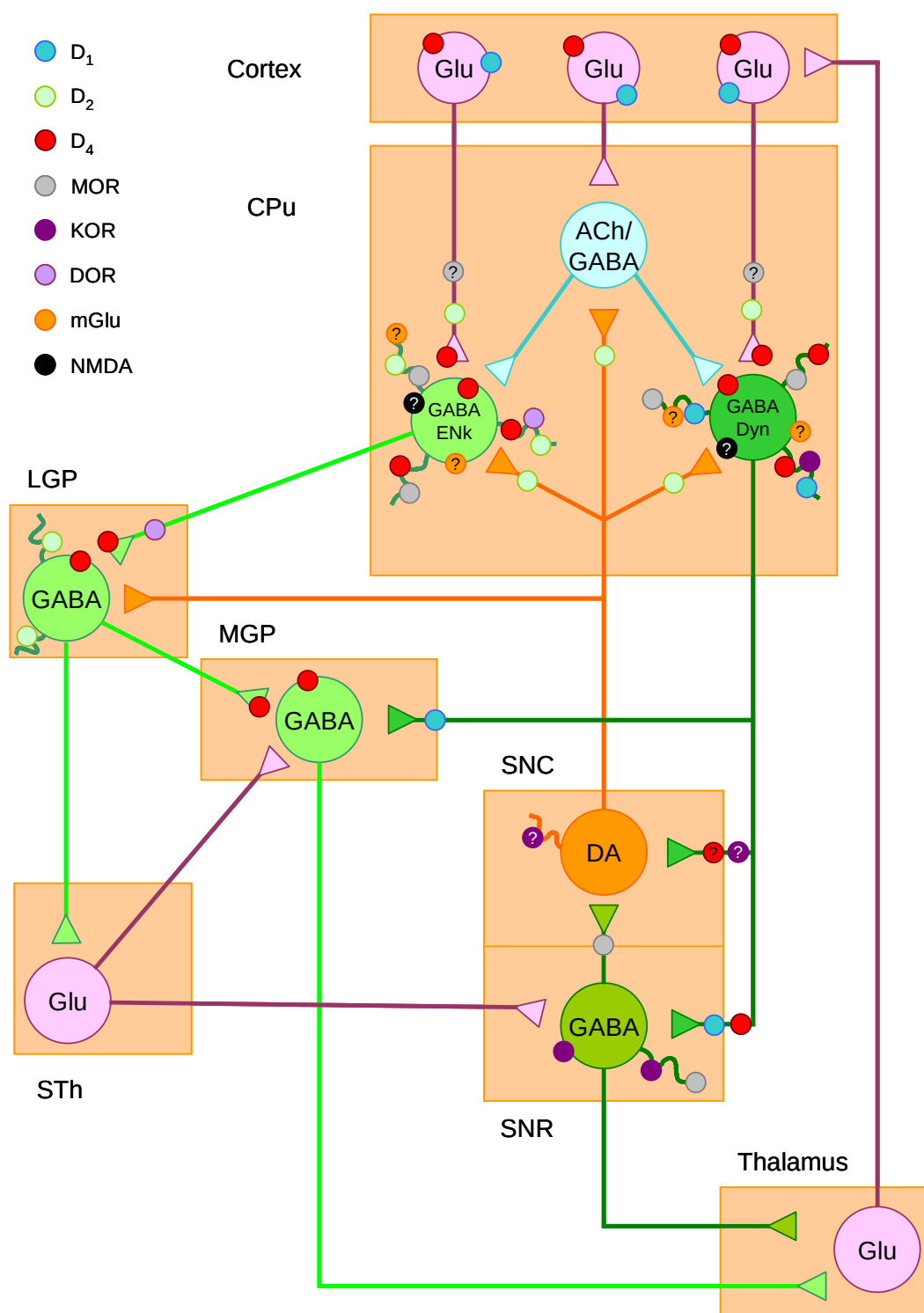


Figure 29. Representative and simplify diagram of D₁, D₂, NMDA, mGlu, δ and κ opioid receptors localization in cortex and basal ganglia nuclei that may have an influence on D₄ and μ opioid receptors interaction.

Abbreviations: ACh, acetylcholine; CPu, caudate putamen; DA, dopamine; DOR, δ opioid receptor; Dyn, dynorphin; Enk, enkephalin; Glu, glutamate; GABA, gamma-aminobutyric acid; KOR, κ opioid receptor; LGP, lateral globus pallidus; MOR, μ opioid receptor; MGP, medial globus pallidus; STh, subthalamic nucleus; SNR, substantia nigra pars reticulata; SNC, substantia nigra pars compacta

but through their interaction with MOR and other neurotransmission systems. The input connections that receive the CPu can also influence D₄Rs functions, what shows the complexity of dopaminergic receptors role in the regulation of CPu functions.

6. Locomotor Activity

Several authors have developed a hypothesis that explains how dopamine controls locomotor activity through its receptors located in the CPu and Acb (Flaherty and Graybiel, 1993; Parent and Hazrati, 1995a,b). Briefly, the activation of the striatal neurons of the direct pathway leads to disinhibition of thalamocortical neurons and increases motor activity. When the indirect pathway is activated, it promotes inhibition of thalamocortical neurons, thereby reducing motor activity (Albin *et al.*, 1989; Alexander *et al.*, 1990; Bolam *et al.*, 2000; Gerfen, 1992; Graybiel, 1990; Hauber, 1998; Joel and Weiner, 1997; Kalivas *et al.*, 1983). However, striosomes/matrix organization has also an influence in motor activity control (Gerfen, 1984; Graybiel, 1990; Graybiel and Ragsdale, 1978; Graybiel *et al.*, 2000). Thus, GABAergic neurons in striosome innervate dopaminergic neurons in the SNC (Gerfen, 1984; Jimenez-Castellanos y Graybiel, 1987, 1989), so they critically control dopaminergic neurotransmission via the nigrostriatal pathway.

The dopaminergic system plays a role in the regulation of motor activity and mediates behavioural responses related to drugs use (Koob, 1996; Uhl *et al.*, 1998). Mesolimbic and nigrostriatal pathways, that project to Acb and CPu respectively, modulate morphine-induced hyperlocomotion (Wise and Bozarth, 1987), although contradicting data have been also reported since non-dopamine dependent mechanisms can be also implicated (Kalivas *et al.*, 1983; Murphy *et al.*, 2001).

In this work it has been demonstrated that morphine acute administration induces an increase of locomotor activity in mice, as

other authors have described before (Belknap *et al.*, 1998; Cadoni *et al.*, 2000; Coudereau *et al.*, 1996; Kuribara, 1995; Murphy *et al.*, 2001). Time intervals analysis indicates that locomotor activity increases gradually along the 30 min assay. Several studies show that the 10 mg/kg dose of morphine causes a higher increase of dopamine liberation in the Acb than in the CPu (Bassareo *et al.*, 1996; Di Chiara and Imperato, 1988a,b, 1995; Murphy *et al.*, 2001; Pontieri *et al.*, 1995), so dopamine is involved in the expression of this effect.

It has been also shown that D₄Rs activation has no effects on locomotor activity, although PD168,077 administration blocks the morphine effects on locomotion. Studies made in neonatal 6-OHDA-lesioned mice show that these animals are hyperactive, effect that is blocked by the administration of several D₄R antagonists (CP-293,019 L-745,870, U-101,958) (Zhang *et al.*, 2001, 2002a,b). 6-OHDA-lesioned D₄R knockout mice do not show this hyperactivity (Avalle *et al.*, 2004), what suggests that these dopaminergic receptors are involved in the expression of motor activity. The reduction of morphine-induced hyperlocomotion by D₄Rs can be due to the activation of the striatopallidal pathway or to the inhibition of the striatonigral one. Although D₄Rs are expressed in both types of striatal neurons, their activation may have stronger effects on neurons that project to GP, exerting a major control over striatopallidal pathway. More experiments would be necessary to test PD168,077 and morphine-induced changes in mice on enkephalin and dynorphin expression and dopamine liberation rate in CPu that could explain the observed effect on locomotion activity.

Several authors have suggest that D₄Rs are implicated in the expression of hyperactivity induced by acute administration of ethanol (Drago *et al.*, 1998; Robinson and Berridge, 1993; Thrasher *et al.*, 1999), cocaine and amphetamine (Katz *et al.*, 2003; Kruzich *et al.*, 2004; Robinson and Berridge, 1993), so our results support

the idea that these dopaminergic receptors are implicated in drug addiction process.

On the other hand, effects become persistently enhanced and repetitive after a long-term drugs exposure. This phenomenon is termed as behavioural sensitization (Bartoletti *et al.*, 1983; Canales and Gaybiel, 2000; Pierce and Kalivas, 1997; Post and Rose, 1976; Robinson and Becker, 1986; Shuster *et al.*, 1975; Stewart and Badani, 1993; Vanderschuren and Kalivas, 2000). It is not clear if D₄Rs are implicate in the expression of stereotypes and locomotor sensitization because chronic administration of amphetamines and ethanol studies do not support this idea (Eravci *et al.*, 1997; Quadros *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2000). However, Feldpausch and colleagues (1998) showed that these dopaminergic receptors are associated to behavioural sensitization to morphine. More experiments would be necessary to test the role of D₄Rs in the expression of hyperlocomotion and cognitive and locomotor stereotypes after several drugs chronic administration.

7. Role of D₄ Receptor in Drug Addiction Development

Although the dopaminergic system has been associated to locomotor disorders such as Parkinson disease, it is nowadays linked to several other disorders such as schizophrenia, attention deficit hyperactivity disorder (ADHD) and addiction (Tarazi *et al.*, 2004).

Polimorfisms genetics studies have associated D₄R to ADHD (Benjamin *et al.*,

1996; Carrasco *et al.*, 2006; Ebstein *et al.*, 1996; Faraone *et al.*, 2000, 2001; Grady *et al.*, 2003; LaHoste *et al.*, 1996; Rowe *et al.*, 1998; Swanson *et al.*, 1998). This syndrome includes deficit of attention, impulsivity and behavioural hyperactivity (Faraone *et al.*, 2000; Searight *et al.*, 2000; Wender *et al.*, 2001). The role of noradrenergic (Biederman and Spencer, 1999), dopaminergic (Solanto, 2002) and serotonergic (Spivak *et al.*, 1999) systems has been studied, but any of them explain the dysfunctions by themself.

Besides, several authors have associated ADHD with substance-use disorders (Davids y Gastpar, 2003; Ponce *et al.*, 2000). The personality profile of ADHD subjects could predispose them to substances addiction (Franques *et al.*, 2003; Le Bon *et al.*, 2004). Nadal and colleagues (2005) studies a link morphine place conditioning with exploratory and sensation seeking tendencies which may be indicate sings of predisposition to drug abuse (Stansfield and Kirstein, 2006). The fact that D₄R knockout mice show a reduced exploratory activity (Dulawa *et al.*, 1999) and the high expression of D₄R in striosomes (Rivera *et al.*, 2002) suggest that this dopaminergic receptor may be involved in reward-associated motor learning and novelty seeking linked to addiction.

The results showed in this doctoral thesis indicate for the first time that D₄R play an important role in the regulation of acute morphine effects and constitute the first studies about this dopaminergic subtype receptor and MOR interaction mechanisms.

CONCLUSIONS

1. Morphine acute administration causes a transitory increase of c-Fos expression in the dorso-medial region of the caudate putamen, but does not modify mRNA levels of c-fos. Besides, morphine induces Fos B and Δ Fos B expression at 4 hours and reduces p-CREB levels at 30 minutes in this nucleus.
2. PD168,077 acute administration also causes a rapid and transient induction of c-Fos and does not modify mRNA levels in the caudate putamen. This dopaminergic agonist increases Fos B and Δ Fos B expression but does not have any effects on p-CREB level considering the whole caudate putamen.
3. Within the first two hours after treatments, the activation of dopaminergic D₄ receptors blocks morphine-induced effects on c-Fos and p-CREB expression.
4. After the second hour, c-Fos mRNA and protein expression are induced in the caudate putamen by the coactivation of both D₄ and μ opioid receptors.
5. Morphine reduces enkephalin and dynorphin mRNA levels in the caudate putamen, but PD168,077 also modifies enkephalin levels. The activation of D₄ receptors antagonistically modulates morphine-induced effects on both opioid peptides expression.
6. The activation of dopaminergic D₄ receptors reduces the density of μ opioid receptors in cellular membranes of the caudate putamen, but does not modify receptors affinity.
7. PD168,077 administration does not alter mice locomotor activity, but it reduces morphine-induced hyperlocomotion.
8. The results shown in this thesis demonstrate for the first time that dopaminergic D₄ receptors interact with μ opioid receptors in the caudate putamen, suggesting that this dopaminergic receptor subtype may play a critical role in the expression of morphine effects in early stages of this drug use.

REFERENCES

- Abraham KE, Brewer KL (2001) Expression of c-fos mRNA is increased and related to dynorphin mRNA expression following excitotoxic spinal cord injury in the rat. *Neurosci Lett* 307(3):187-91.
- Aghajanian GK, Wang YY (1986) Pertussis toxin blocks the outward currents evoked by opiate and alpha 2-agonists in locus coeruleus neurons. *Brain Res* 371(2):390-4.
- Agnati LF, Fuxe K, Zini I, Lenzi P, Hokfelt T (1980) Aspects on receptor regulation and isoreceptor identification. *Med Biol* 58(4):182-7.
- Airavaara M, Mijatovic J, Vihavainen T, Piepponen TP, Saarma M, Ahtee L (2006) In heterozygous GDNF knockout mice the response of striatal dopaminergic system to acute morphine is altered. *Synapse* 59(6):321-9.
- Akil H, Watson SJ, Young E, Lewis ME, Khachaturian H, Walker JM (1984) Endogenous opioids: biology and function. *Annu Rev Neurosci* 7:223-55.
- Albin RL, Young AB, Penney JB (1989) The functional anatomy of basal ganglia disorders. *Trends Neurosci* 12(10):366-75.
- Albin, RL, Makowiec RL, Hollingsworth ZR, Dure IV LS, Penney JB, Young AB (1992) Excitatory amino acid binding sites in the basal ganglia of the rat: A quantitative autoradiographic study. *Neuroscience* 46:35-48.
- Alexander GE, Crutcher MD, DeLong MR (1990) Basal ganglia-thalamocortical circuits: parallel substrates for motor, oculomotor, "prefrontal" and "limbic" functions. *Prog Brain Res* 85:119-46.
- Angers S, Salahpour A, Bouvier M (2002) Dimerization: an emerging concept for G protein-coupled receptor ontogeny and function. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 42:409-35.
- Angulo JA, McEwen BS (1994) Molecular aspects of neuropeptide regulation and function in the corpus striatum and nucleus accumbens. *Brain Res Rev* 19(1):1-28.
- Ariano MA, Wang J, Noblett KL, Larson ER, Sibley DR (1997a) Cellular distribution of the rat D4 dopamine receptor protein in the CNS using anti-receptor antisera. *Brain Res* 752(1-2):26-34.
- Arvidsson U, Riedl M, Chakrabarti S, Lee JH, Nakano AH, Dado RJ, Loh HH, Law PY, Wessendorf MW, Elde R (1995) Distribution and targeting of a mu-opioid receptor (MOR1) in brain and spinal cord. *J Neurosci* 15(5 Pt 1):3328-41.
- Azaryan AV, Clock BJ, Rosenberger JG, Cox BM (1998) Transient upregulation of mu opioid receptor mRNA levels in nucleus accumbens during chronic cocaine administration. *Can J Physiol Pharmacol* 76(3):278-83.
- Avale ME, Falzone TL, Gelman DM, Low MJ, Grandy DK, Rubinstein M (2004) The dopamine D4 receptor is essential for hyperactivity and impaired behavioral inhibition in a mouse model of attention deficit/hyperactivity disorder. *Mol Psychiatry* 9(7):718-26.
- Bassareo V, Tanda G, Petromilli P, Giua C, Di Chiara G (1996) Non-psychostimulant drugs of abuse and anxiogenic drugs activate with differential selectivity dopamine transmission in the nucleus accumbens and in the medial prefrontal cortex of the rat. *Psychopharmacology (Berl)* 124(4):293-9.
- 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(10):1193-6.
- Bayer SA (1990) Neurogenetic patterns in the medial limbic cortex of the rat related to anatomical connections with the thalamus and striatum. *Exp Neurol* 107(2):132-42.
- Becker A, Grecksch G, Brodemann R, Kraus J, Peters B, Schroeder H, Thiemann W, Loh HH, Holt V (2000) Morphine self-administration in mu-opioid receptor-deficient mice. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 361(6):584-9.
- Beckstead RM, Kersey KS (1985) Immunohistochemical demonstration of differential substance P-, met-enkephalin-, and glutamic-acid-decarboxylase-containing cell body and axon distributions in the corpus striatum of the cat. *J Comp Neurol* 232(4):481-98.
- Beitner DB, Duman RS, Nestler EJ (1989) A novel action of morphine in the rat locus coeruleus: persistent decrease in adenylate cyclase. *Mol Pharmacol* 35(5):559-64.
- Belknap JK, Noordewier B, Lame M (1989) Genetic dissociation of multiple morphine effects among C57BL/6J, DBA/2J and C3H/HeJ inbred mouse strains. *Physiol Behav* 46(1):69-74.
- Belknap JK, Riggan J, Cross S, Young ER, Gallaher EJ, Crabbe JC (1998) Genetic

- determinants of morphine activity and thermal responses in 15 inbred mouse strains. *Pharmacol Biochem Behav* 59(2):353-60.
- Benjamin J, Li L, Patterson C, Greenberg BD, Murphy DL, Hamer DH (1996) Population and familial association between the D4 dopamine receptor gene and measures of Novelty Seeking. *Nat Genet* 12(1):81-4.
- Berendse HW, Galis-de Graaf Y, Groenewegen HJ (1992) Topographical organization and relationship with ventral striatal compartments of prefrontal corticostriatal projections in the rat. *J Comp Neurol* 316(3):314-47.
- Berger MA, Defagot MC, Villar MJ, Antonelli MC (2001) D4 dopamine and metabotropic glutamate receptors in cerebral cortex and striatum in rat brain. *Neurochem Res* 26(4):345-52.
- Berke JD, Paletzki RF, Aronson GJ, Hyman SE, Gerfen CR (1998) A complex program of striatal gene expression induced by dopaminergic stimulation. *J Neurosci* 18(14):5301-10.
- Berke JD, Hyman SE (2000) Addiction, dopamine, and the molecular mechanisms of memory. *Neuron* 25(3):515-32.
- Berkowitz LA, Riabowol KT, Gilman MZ (1989) Multiple sequence elements of a single functional class are required for cyclic AMP responsiveness of the mouse c-fos promoter. *Mol Cell Biol* 9(10):4272-81.
- Berridge MJ (1997) Elementary and global aspects of calcium signalling. *J Exp Biol* 200(Pt 2):315-9.
- Beaulieu JM (2005) Morphine-induced mu-opioid receptor internalization: a paradox solved in neurons. *J Neurosci* 25(44):10061-3.
- Bhargava HN, Villar VM, Rahmani NH, Larsen AK (1992) Time course of the distribution of morphine in brain regions and spinal cord after intravenous injection to spontaneously hypertensive and normotensive Wistar-Kyoto rats. *J Pharmacol Exp Ther* 261(3):1008-14.
- Biederman J, Spencer T (1999) Attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD) as a noradrenergic disorder. *Biol Psychiatry* 46(9):1234-42.
- Bilecki W, Wawrzczak-Bargiela A, Przewlocki R (2004) Activation of AP-1 and CRE-dependent gene expression via mu-opioid receptor. *J Neurochem* 90(4):874-82.
- Bilecki W, Zapart G, Ligeza A, Wawrzczak-Bargiela A, Urbanski MJ, Przewlocki R (2005) Regulation of the extracellular signal-regulated kinases following acute and chronic opioid treatment. *Cell Mol Life Sci* 62(19-20):2369-75.
- Bloodworth D (2005) Issues in opioid management. *Am J Phys Med Rehabil* 84(3 Suppl):S42-55.
- Bodnar RJ, Klein GE (2005) Endogenous opiates and behaviour: 2004. *Peptides* 26(12):2629-711.
- Bohn LM, Lefkowitz RJ, Gainetdinov RR, Peppel K, Caron MG, Lin FT (1999) Enhanced morphine analgesia in mice lacking beta-arrestin 2. *Science* 286(5449):2495-8.
- 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(6813):720-3.
- Bolam JP, Hanley JJ, Booth PA, Bevan MD (2000) Synaptic organisation of the basal ganglia. *J Anat* 196 (Pt 4):527-42.
- Bontempi B, Sharp FR (1997) Systemic morphine-induced Fos protein in the rat striatum and nucleus accumbens is regulated by mu opioid receptors in the substantia nigra and ventral tegmental area. *J Neurosci* 17(21):8596-612.
- Borgkvist A, Fisone G (2007) Psychoactive drugs and regulation of the cAMP/PKA/DARPP-32 cascade in striatal medium spiny neurons. *Neurosci Biobehav Rev* 31(1):79-88.
- Borgland SL, Connor M, Osborne PB, Furness JB, Christie MJ (2003) Opioid agonists have different efficacy profiles for G protein activation, rapid desensitization, and endocytosis of mu-opioid receptors. *J Biol Chem* 278(21):18776-84.
- Bouvier M (2001) Oligomerization of G-protein-coupled transmitter receptors. *Nat Rev Neurosci* 2(4):274-86.
- Brase DA, Loh HH, Way EL (1977) Comparison of the effects of morphine on locomotor activity, analgesia and primary and protracted physical dependence in six mouse strains. *J Pharmacol Exp Ther* 201(2):368-74.
- Breuer O, Lawhorn C, Miller T, Smith DM, Brown LL (2005) Functional architecture of the mammalian striatum: mouse vascular and striosome organization and their anatomic relationships. *Neurosci Lett* 385(3):198-203.
- Bristow LJ, Collinson N, Cook GP, Curtis N, Freedman SB, Kulagowski JJ, Leeson PD, Patel S, Ragan CI, Ridgill M, Saywell KL, Tricklebank MD (1997) L-745,870, a subtype selective dopamine D4 receptor antagonist, does not exhibit a neuroleptic-like profile in

- rodent behavioral tests. *J Pharmacol Exp Ther* 283(3):1256-63.
- Bronstein DM, Ye H, Pennypacker KR, Hudson PM, Hong JS (1994) Role of a 35 kDa fos-related antigen (FRA) in the long-term induction of striatal dynorphin expression in the 6-hydroxydopamine lesioned rat. *Mol Brain Res* 23(3):191-203.
- Brown LL, Feldman SM, Smith DM, Cavanaugh JR, Ackermann RF, Graybiel AM (2002) Differential metabolic activity in the striosome and matrix compartments of the rat striatum during natural behaviors. *J Neurosci* 22(1):305-14.
- Brownstein MJ, Mroz EA, Tappaz ML, Leeman SE (1977) On the origin of substance P and glutamic acid decarboxylase (GAD) in the substantia nigra. *Brain Res* 135(2):315-23.
- Busch SJ, Sassone-Corsi P (1990) Fos, Jun and CREB basic-domain peptides have intrinsic DNA-binding activity enhanced by a novel stabilizing factor. *Oncogene* 5(10):1549-56.
- Cadoni C, Solinas M, Di Chiara G (2000) Psychostimulant sensitization: differential changes in accumbal shell and core dopamine. *Eur J Pharmacol* 388(1):69-76.
- Cambi F, Fung B, Chikaraishi D (1989) 5' flanking DNA sequences direct cell-specific expression of rat tyrosine hydroxylase. *J Neurochem* 53(5):1656-9.
- Canales JJ, Graybiel AM (2000) Patterns of gene expression and behavior induced by chronic dopamine treatments. *Ann Neurol* 47(4 Suppl 1):S53-9.
- Canales JJ (2005) Stimulant-induced adaptations in neostriatal matrix and striosome systems: transiting from instrumental responding to habitual behavior in drug addiction. *Neurobiol Learn Mem* 83(2):93-103.
- Carlezon WA Jr, Thome J, Olson VG, Lane-Ladd SB, Brodtkin ES, Hiroi N, Duman RS, Neve RL, Nestler EJ (1998) Regulation of cocaine reward by CREB. *Science* 282(5397):2272-5.
- Carrasco X, Rothhammer P, Moraga M, Henriquez H, Chakraborty R, Aboitiz F, Rothhammer F (2006) Genotypic interaction between DRD4 and DAT1 loci is a high risk factor for attention-deficit/hyperactivity disorder in Chilean families. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 141(1):51-4.
- Carter CJ (1982) Topographical distribution of possible glutamatergic pathways from the frontal cortex to the striatum and substantia nigra in rats. *Neuropharmacology* 21(5):379-83.
- Cenci MA, Campbell K, Wictorin K, Bjorklund A (1992) Striatal c-fos induction by cocaine or apomorphine occurs preferentially in output neurons projecting to the substantia nigra in the rat. *Eur J Neurosci* 4(4):376-80.
- Chang SL, Squinto SP, Harlan RE (1988) Morphine activation of c-fos expression in rat brain. *Biochem Biophys Res Commun* 157(2):698-704.
- Chang L, Karin M (2001) Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature* 410(6824):37-40.
- Chao J, Nestler EJ (2004) Molecular neurobiology of drug addiction. *Annu Rev Med* 55:113-32.
- Chartoff EH, Mague SD, Barhight MF, Smith AM, Carlezon WA Jr (2006) Behavioral and molecular effects of dopamine D1 receptor stimulation during naloxone-precipitated morphine withdrawal. *J Neurosci* 26(24):6450-7.
- Chen L, Huang LY (1991) Sustained potentiation of NMDA receptor-mediated glutamate responses through activation of protein kinase C by a mu opioid. *Neuron* 7(2):319-26.
- Chen Y, Mestek A, Liu J, Hurley JA, Yu L (1993) Molecular cloning and functional expression of a mu-opioid receptor from rat brain. *Mol Pharmacol* 44(1):8-12.
- Chen J, Nye HE, Kelz MB, Hiroi N, Nakabeppu Y, Hope BT, Nestler EJ (1995) Regulation of delta FosB and FosB-like proteins by electroconvulsive seizure and cocaine treatments. *Mol Pharmacol* 48 (5):880-9.
- Chen J, Kelz MB, Hope BT, Nakabeppu Y, Nestler EJ (1997) Chronic Fos-related antigens: stable variants of deltaFosB induced in brain by chronic treatments. *J Neurosci* 17(13):4933-41.
- Chen LE, Gao C, Chen J, Xu XJ, Zhou DH, Chi ZQ (2003) Internalization and recycling of human mu opioid receptors expressed in Sf9 insect cells. *Life Sci* 73(1):115-28.
- Childers SR (1991) Opioid receptor-coupled second messenger systems. *Life Sci* 48(21):1991-2003.
- Cho DI, Beom S, Van Tol HH, Caron MG, Kim KM (2006) Characterization of the desensitization properties of five dopamine receptor subtypes and alternatively spliced variants of dopamine D2 and D4 receptors. *Biochem Biophys Res Commun* 350(3):634-40.
- Claing A, Laporte SA, Caron MG, Lefkowitz RJ (2002) Endocytosis of G protein-coupled receptors: roles of G protein-coupled receptor

- kinases and beta-arrestin proteins. *Prog Neurobiol* 66(2):61-79.
- Cochran BH (1993) Regulation of immediate early gene expression. *NIDA Res Monogr* 125:3-24.
- Cohen DR, Curran T (1988) Fra-1: a serum-inducible, cellular immediate-early gene that encodes a fos-related antigen. *Mol Cell Biol* 8(5):2063-9.
- Cole DG, Kobierski LA, Konradi C, Hyman SE (1994) 6-Hydroxydopamine lesions of rat substantia nigra up-regulate dopamine-induced phosphorylation of the cAMP-response element-binding protein in striatal neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 91(20):9631-5.
- Cole RL, Konradi C, Douglass J, Hyman SE (1995) Neuronal adaptation to amphetamine and dopamine: molecular mechanisms of prodynorphin gene regulation in rat striatum. *Neuron* 14(4):813-23.
- Connor M, and Henderson G (1996) Delta- and mu-opioid receptor mobilization of intracellular calcium in SH-SY5Y human neuroblastoma cells. *Br J Pharmacol* 117: 333-40.
- Cook DF, Wirtshafter D (1998) Quinpirole attenuates striatal c-fos induction by 5-HT, opioid and muscarinic receptor agonists. *Eur J Pharmacol* 349(1):41-7.
- Couceyro P, Pollock KM, Drews K, Douglass J (1994) Cocaine differentially regulates activator protein-1 mRNA levels and DNA-binding complexes in the rat striatum and cerebellum. *Mol Pharmacol* 46(4):667-76.
- Coudereau JP, Debray M, Monier C, Bourre JM, Frances H (1996) Effect of isolation on morphine-induced running and changes in body temperature. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 20(5):827-38.
- Courtney SM, Petit L, Maisog JM, Ungerleider LG, Haxby JV (1998) An area specialized for spatial working memory in human frontal cortex. *Science* 279(5355):1347-51.
- Crump FT, Dillman KS, Craig AM (2001) cAMP-dependent protein kinase mediates activity-regulated synaptic targeting of NMDA receptors. *J Neurosci* 21(14):5079-88.
- Cuello AC, Paxinos G (1978) Evidence for a long Leu-enkephalin striopallidal pathway in rat brain. *Nature* 271(5641):178-80.
- Curran T, Gordon MB, Rubino KL, Sambucetti LC (1987) Isolation and characterization of the c-fos(rat) cDNA and analysis of post-translational modification in vitro. *Oncogene* 2(1):79-84.
- Curran EJ, Watson SJ Jr (1995) Dopamine receptor mRNA expression patterns by opioid peptide cells in the nucleus accumbens of the rat: a double in situ hybridization study. *J Comp Neurol* 361(1):57-76.
- Curran EJ, Akil H, Watson SJ (1996) Psychomotor stimulant- and opiate-induced c-fos mRNA expression patterns in the rat forebrain: comparisons between acute drug treatment and a drug challenge in sensitized animals. *Neurochem Res* 21(11):1425-35.
- Dash PK, Hochner B, Kandel ER (1990) Injection of the cAMP-responsive element into the nucleus of Aplysia sensory neurons blocks long-term facilitation. *Nature* 345(6277):718-21.
- Davids E, Gastpar M (2003). Attention-deficit/hyperactivity disorder and substance abuse. *Psychiatr Prax* 30(4):182-6.
- Davis S, Vanhoutte P, Pages C, Caboche J, Laroche S (2000) The MAPK/ERK cascade targets both Elk-1 and cAMP response element-binding protein to control long-term potentiation-dependent gene expression in the dentate gyrus in vivo. *J Neurosci* 20(12):4563-72.
- De Cesare D, Fimia GM, Sassone-Corsi P (1999) Signaling routes to CREM and CREB: plasticity in transcriptional activation. *Trends Biochem Sci* 24(7):281-5.
- Defagot MC, Antonelli MC (1997a) Autoradiographic localization of the putative D4 dopamine receptor in rat brain. *Neurochem Res* 22(4):401-7.
- Defagot MC, Malchiodi EL, Villar MJ, Antonelli MC (1997b) Distribution of D4 dopamine receptor in rat brain with sequence-specific antibodies. *Mol Brain Res* 45(1):1-12.
- Defagot MC, Falzone TL, Low MJ, Grandy DK, Rubinstein M, Antonelli MC (2000) Quantitative analysis of the dopamine D4 receptor in the mouse brain. *J Neurosci Res* 59(2):202-8.
- Delfs JM, Yu L, Ellison GD, Reisine T, Chesselet MF (1994) Regulation of mu-opioid receptor mRNA in rat globus pallidus: effects of enkephalin increases induced by short- and long-term haloperidol administration. *J Neurochem* 63, 777-80.
- DePaoli AM, Hurley KM, Yasada K, Reisine T, Bell G (1994) Distribution of kappa opioid receptor mRNA in adult mouse brain: an in situ hybridization histochemistry study. *Mol Cell Neurosci* 5(4):327-35.

- Desban M, Gauchy C, Kemel ML, Besson MJ, Glowinski J (1989) Three-dimensional organization of the striosomal compartment and patchy distribution of striatonigral projections in the matrix of the cat caudate nucleus. *Neuroscience* 29(3):551-66.
- Devine DP, Leone P, Wise RA (1993) Mesolimbic dopamine neurotransmission is increased by administration of mu-opioid receptor antagonists. *Eur J Pharmacol* 243(1):55-64.
- Dewar D, Jenner P, Marsden CD (1985) Behavioural effects in rats of unilateral and bilateral injections of opiate receptor agonists into the globus pallidus. *Neuroscience* 15(1):41-6.
- Di Benedetto M, D'Addario C, Candeletti S, Romualdi P (2007) Alterations of CREB and DARPP-32 phosphorylation following cocaine and monoaminergic uptake inhibitors. *Brain Res* 1128(1):33-9.
- Di Chiara G, Imperato A (1986) Preferential stimulation of dopamine release in the nucleus accumbens by opiates, alcohol, and barbiturates: studies with transcerebral dialysis in freely moving rats. *Ann NY Acad Sci* 473:367-81.
- Di Chiara G, Imperato A (1988a) Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely moving rats. *Proc Natl Acad Sci USA* 85(14):5274-8.
- Di Chiara G, Imperato A (1988b) Opposite effects of mu and kappa opiate agonists on dopamine release in the nucleus accumbens and in the dorsal caudate of freely moving rats. *J Pharmacol Exp Ther* 244(3):1067-80.
- Di Chiara G, North RA (1992) Neurobiology of opiate abuse. *Trends Pharmacol Sci* 13(5):185-93.
- Donoghue JP, Herkenham M (1986) Neostriatal projections from individual cortical fields conform to histochemically distinct striatal compartments in the rat. *Brain Res* 365(2):397-403.
- Doucet JP, Nakabeppu Y, Bedard PJ, Hope BT, Nestler EJ, Jasmin BJ, Chen JS, Iadarola MJ, St-Jean M, Wigle N, Blanchet P, Grondin R, Robertson GS (1996) Chronic alterations in dopaminergic neurotransmission produce a persistent elevation of deltaFosB-like protein(s) in both the rodent and primate striatum. *Eur J Neurosci* 8(2):365-81.
- Douglass J, McMurray CT, Garrett JE, Adelman JP, Calavetta L (1989) Characterization of the rat prodynorphin gene. *Mol Endocrinol* 3(12):2070-8.
- Douglass J, McKinzie AA, Pollock KM (1994) Identification of multiple DNA elements regulating basal and protein kinase A-induced transcriptional expression of the rat prodynorphin gene. *Mol Endocrinol* 8(3):333-44.
- Drago J, Padungchaichot P, Accili D, Fuchs S. (1998) Dopamine receptors and dopamine transporter in brain function and addictive behaviors: insights from targeted mouse mutants. *Dev Neurosci* 20(2-3):188-203.
- Dragunow M, Faull R (1989) The use of c-fos as a metabolic marker in neuronal pathway tracing. *J Neurosci* 9:261-5.
- Dragunow M, Williams M, Faull RL (1990) Haloperidol induces Fos and related molecules in intrastriatal grafts derived from fetal striatal primordia. *Brain Res* 530(2):309-11.
- Draisci G, Iadarola MJ (1989) Temporal analysis of increases in c-fos, preprodynorphin and preproenkephalin mRNAs in rat spinal cord. *Mol Brain Res* 6(1):31-7.
- Dulawa SC, Grandy DK, Low MJ, Paulus MP, Geyer MA (1999) Dopamine D4 receptor-knock-out mice exhibit reduced exploration of novel stimuli. *J Neurosci* 19(21):9550-6.
- Dunah AW, Standaert DG (2001) Dopamine D1 receptor-dependent trafficking of striatal NMDA glutamate receptors to the postsynaptic membrane. *J Neurosci* 21(15):5546-58.
- Eblen F, Graybiel AM (1995) Highly restricted origin of prefrontal cortical inputs to striosomes in the macaque monkey. *J Neurosci* 15(9):5999-6013.
- Ebstein RP, Novick O, Umansky R, Priel B, Osher Y, Blaine D, Bennett ER, Nemanov L, Katz M, Belmaker RH (1996) Dopamine D4 receptor (D4DR) exon III polymorphism associated with the human personality trait of Novelty Seeking. *Nat Genet* 12(1):78-80.
- Ebstein RP, Benjamin J, Belmaker RH (2000) Personality and polymorphisms of genes involved in aminergic neurotransmission. *Eur J Pharmacol* 410(2-3):205-214.
- El Kouhen R, Burd AL, Erickson-Herbrandson LJ, Chang CY, Law PY, Loh HH (2001) Phosphorylation of Ser363, Thr370, and Ser375 residues within the carboxyl tail differentially regulates mu-opioid receptor internalization. *J Biol Chem* 276(16):12774-80.
- Elliott AC (2001) Recent developments in non-excitable cell calcium entry. *Cell Calcium* 30(2):73-93.

- Engber TM, Boldry RC, Kuo S, Chase TN (1992) Dopaminergic modulation of striatal neuropeptides: differential effects of D1 and D2 receptor stimulation on somatostatin, neuropeptide Y, neurotensin, dynorphin and enkephalin. *Brain Res* 581(2):261-8.
- Eravci M, Grosspietsch T, Pinna G, Schulz O, Kley S, Bachmann M, Wolffgramm J, Gotz E, Heyne A, Meinhold H, Baumgartner A (1997) Dopamine receptor gene expression in an animal model of 'behavioral dependence' on ethanol. *Mol Brain Res* 50(1-2):221-9.
- Evans CJ, Keith DE Jr, Morrison H, Magendzo K, Edwards RH (1992) Cloning of a delta opioid receptor by functional expression. *Science* 258(5090):1952-5.
- Everitt BJ, Robbins TW (2005) Neural systems of reinforcement for drug addiction: from actions to habits to compulsion. *Nat Neurosci* 8(11):1481-9.
- Fallon JH, Leslie FM, Cone RI (1985) Dynorphin-containing pathways in the substantia nigra and ventral tegmentum: a double labeling study using combined immunofluorescence and retrograde tracing. *Neuropeptides* 5(4-6):457-60.
- Falzone TL, Gelman DM, Young JI, Grandy DK, Low MJ, Rubinstein M (2002) Absence of dopamine D4 receptors results in enhanced reactivity to unconditioned, but not conditioned, fear. *Eur J Neurosci* 15(1):158-64.
- Faraone SV, Biederman J, Spencer T, Wilens T, Seidman LJ, Mick E, Doyle AE (2000) Attention-deficit/hyperactivity disorder in adults: an overview. *Biol Psychiatry* 48(1):9-20.
- Faraone SV, Doyle AE, Mick E, Biederman J (2001) Meta-analysis of the association between the 7-repeat allele of the dopamine D(4) receptor gene and attention deficit hyperactivity disorder. *Am J Psychiatry* 158(7):1052-7.
- Feldpausch DL, Needham LM, Stone MP, Althaus JS, Yamamoto BK, Svensson KA, Merchant KM (1998) The role of dopamine D4 receptor in the induction of behavioral sensitization to amphetamine and accompanying biochemical and molecular adaptations. *J Pharmacol Exp Ther* 286(1):497-508.
- Ferguson SS, Downey WE 3rd, Colapietro AM, Barak LS, Menard L, Caron MG (1996) Role of beta-arrestin in mediating agonist promoted G protein coupled receptor Internalization. *Science* 271(5247):363-6.
- Ferguson SS (2001) Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitization and signaling. *Pharmacol Rev* 53(1):1-24.
- Ferguson SM, Thomas MJ, Robinson TE (2004) Morphine-induced c-fos mRNA expression in striatofugal circuits: modulation by dose, environmental context, and drug history. *Neuropsychopharmacology* 29(9):1664-74.
- Fink JS, Smith GP (1980) Mesolimbocortical dopamine terminal fields are necessary for normal locomotor and investigatory exploration in rats. *Brain Res* 199(2):359-84.
- Fisch TM, Prywes R, Simon MC, Roeder RG (1989) Multiple sequence elements in the c-fos promoter mediate induction by cAMP. *Genes Dev* 3(2):198-211.
- Flaherty AW, Graybiel AM (1993) Output architecture of the primate putamen. *J Neurosci* 13(8):3222-37.
- Flores-Hernandez J, Cepeda C, Hernandez-Echeagaray E, Calvert CR, Jokel ES, Fienberg AA, Greengard P, Levine MS (2002) Dopamine enhancement of NMDA currents in dissociated medium-sized striatal neurons: role of D1 receptors and DARPP-32. *J Neurophysiol* 88(6):3010-20.
- Franco R, Ferre S, Agnati L, Torvinen M, Gines S, Hillion J, Casado V, Lledo P, Zoli M, Lluís C, Fuxe K (2000) Evidence for adenosine/dopamine receptor interactions: indications for heteromerization. *Neuropsychopharmacology* 23(4 Suppl):S50-9.
- Franques P, Auriacombe M, Piquemal E, Verger M, Brisseau-Gimenez S, Grabot D, Tignol J (2003) Sensation seeking as a common factor in opioid dependent subjects and high risk sport practicing subjects. A cross sectional study. *Drug Alcohol Depend* 69(2):121-6.
- Fukuda K, Kato S, Mori K, Nishi M, Takeshima H, Iwabe N, Miyata T, Houtani T, Sugimoto T (1994) cDNA cloning and regional distribution of a novel member of the opioid receptor family. *FEBS Lett* 343(1):42-6.
- Fukuda K, Kato S, Morikawa H, Shoda T, Mori K (1996) Functional coupling of the delta-, mu-, and kappa-opioid receptors to mitogen-activated protein kinase and arachidonate release in Chinese hamster ovary cells. *J Neurochem* 67:1309-16.
- Furlan AD, Sandoval JA, Mailis-Gagnon A, Tunks E (2006) Opioids for chronic noncancer pain: a meta-analysis of effectiveness and side effects. *CMAJ* 174(11):1589-94.

- Fuxe K, Agnati LF, Benfenati F, Cimmino M, Algeri S, Hokfelt T, Mutt V (1981) Modulation by cholecystokinins of 3H-spiroperidol binding in rat striatum: evidence for increased affinity and reduction in the number of binding sites. *Acta Physiol Scand* 113(4):567-9.
- Fuxe K, Agnati LF, Kalia M, Goldstein M, Andersson K y Härfstrand A (1985) Dopaminergic systems in the brain and pituitary. The dopaminergic system (Flückiger E, Müller EE, Thorner MO, eds.) Springer-Verlag, Berlin 11-25.
- Fuxe K, Manger P, Genedani S, Agnati L (2006) The nigrostriatal DA pathway and Parkinson's disease. *J Neural Transm Suppl* 70:71-83.
- Fuxe K, Canals M, Torvinen M, Marcellino D, Terasmaa A, Genedani S, Leo G, Guidolin D, Diaz-Cabiale Z, Rivera A, Lundstrom L, Langel U, Narvaez J, Tanganelli S, Lluís C, Ferre S, Woods A, Franco R, Agnati LF (2007) Intramembrane receptor-receptor interactions: a novel principle in molecular medicine. *J Neural Transm* 114(1):49-75.
- Gago B, Fuxe K, Agnati L, Penafiel A, De La Calle A, Rivera A (2007) Dopamine D(4) receptor activation decreases the expression of mu-opioid receptors in the rat striatum. *J Comp Neurol* 502(3):358-366.
- Gan L, Falzone TL, Zhang K, Rubinstein M, Baldessarini RJ, Tarazi FI (2004) Enhanced expression of dopamine D(1) and glutamate NMDA receptors in dopamine D(4) receptor knockout mice. *J Mol Neurosci* 22(3):167-78.
- Garcia MM, Brown HE, Harlan RE (1995) Alterations in immediate-early gene proteins in the rat forebrain induced by acute morphine injection. *Brain Res* 692(1-2):23-40.
- Georges F, Stinus L, Bloch B, Le Moine C (1999) Chronic morphine exposure and spontaneous withdrawal are associated with modifications of dopamine receptor and neuropeptide gene expression in the rat striatum. *Eur J Neurosci* 11:481-90.
- Gerfen CR (1984) The neostriatal mosaic: compartmentalization of corticostriatal input and striatonigral output systems. *Nature* 311(5985):461-4.
- Gerfen CR, Herkenham M, Thibault J (1987) The neostriatal mosaic: II. Patch- and matrix-directed mesostriatal dopaminergic and non-dopaminergic systems. *J Neurosci* 7(12):3915-34.
- Gerfen CR, Young WS 3rd (1988) Distribution of striatonigral and striatopallidal peptidergic neurons in both patch and matrix compartments: an in situ hybridization histochemistry and fluorescent retrograde tracing study. *Brain Res* 460(1):161-7.
- Gerfen CR (1989) The neostriatal mosaic: striatal patch-matrix organization is related to cortical lamination. *Science* 246(4928):385-8.
- 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(4986):1429-32.
- Gerfen CR, McGinty JF, Young WS 3rd (1991) Dopamine differentially regulates dynorphin, substance P, and enkephalin expression in striatal neurons: in situ hybridization histochemical analysis. *J Neurosci* 11(4):1016-31.
- Gerfen CR (1992) The neostriatal mosaic: multiple levels of compartmental organization in the basal ganglia. *Annu Rev Neurosci* 15: 285-320.
- Gerfen CR, Wilson CJ (1996) The basal ganglia, en *Handbook of Chemical Neuroanatomy* (Swanson LW, Björklund A y Hökfelt T, eds) Elsevier Science, Amsterdam 12:371-468.
- Gerrits MA, Lesscher HB, van Ree JM (2003) Drug dependence and the endogenous opioid system. *Eur Neuropsychopharmacol* 13(6):424-34.
- Ginty DD, Bonni A, Greenberg ME (1994) Nerve growth factor activates a Ras-dependent protein kinase that stimulates c-fos transcription via phosphorylation of CREB. *Cell* 77(5):713-25.
- Glase SA, Akunne HC, Georgic LM, Heffner TG, MacKenzie RG, Manley PJ, Pugsley TA, Wise LD (1997) Substituted [(4-phenylpiperazinyl)-methyl]benzamides: selective dopamine D4 agonists. *J Med Chem* 40(12):1771-2.
- Gonzalez GA, Montminy MR (1989) Cyclic AMP stimulates somatostatin gene transcription by phosphorylation of CREB at serine 133. *Cell* 59(4):675-80.
- Grady DL, Chi HC, Ding YC, Smith M, Wang E, Schuck S, Flodman P, Spence MA, Swanson JM, Moyzis RK (2003) High prevalence of rare dopamine receptor D4 alleles in children diagnosed with attention-deficit hyperactivity disorder. *Mol Psychiatry* 8(5):536-45.
- Grande C, Zhu H, Martin AB, Lee M, Ortiz O, Hiroi N, Moratalla R (2004) Chronic treatment with atypical neuroleptics induces striosomal FosB/DeltaFosB expression in rats. *Biol Psychiatry* 55(5):457-63.
- Graybiel AM, Ragsdale CW Jr (1978) Histochemically distinct compartments in the

- striatum of human, monkeys, and cat demonstrated by acetylthiocholinesterase staining. *Proc Natl Acad Sci USA* 75(11):5723-6.
- Graybiel AM (1990) Neurotransmitters and neuromodulators in the basal ganglia. *Trends Neurosci* 13(7):244-54.
- Graybiel AM, Moratalla R, Robertson HA (1990) Amphetamine and cocaine induce drug-specific activation of the c-fos gene in striosome-matrix compartments and limbic subdivisions of the striatum. *Proc Natl Acad Sci USA* 87(17):6912-6.
- Graybiel AM (1995) Building action repertoires: memory and learning functions of the basal ganglia. *Curr Opin Neurobiol* 5(6):733-41.
- Graybiel AM (1998) The basal ganglia and chunking of action repertoires. *Neurobiol Learn Mem* 70(1-2):119-36.
- Graybiel AM, Canales JJ, Capper-Loup C (2000) Levodopa-induced dyskinesias and dopamine-dependent stereotypies: a new hypothesis. *Trends Neurosci* 23(10 Suppl):S71-7.
- Greenberg ME, Ziff EB (1984) Stimulation of 3T3 cells induces transcription of the c-fos proto-oncogene. *Nature* 311(5985):433-8.
- Guitart X, Nestler EJ (1989) Identification of morphine- and cyclic AMP-regulated phosphoproteins (MARPPs) in the locus coeruleus and other regions of rat brain: regulation by acute and chronic morphine. *J Neurosci* 9(12):4371-87.
- 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(3):1168-71.
- Gutstein HB, Thome JL, Fine JL, Watson SJ, Akil H (1998) Pattern of c-fos mRNA induction in rat brain by acute morphine. *Can J Physiol Pharmacol* 76(3):294-303.
- Guttenberg ND, Klop H, Minami M, Satoh M, Voorn P (1996) Co-localization of mu opioid receptor is greater with dynorphin than enkephalin in rat striatum. *Neuroreport* 7(13):2119-24.
- Haber SN, Fudge JL, McFarland NR (2000) Striatonigrostriatal pathways in primates form an ascending spiral from the shell to the dorsolateral striatum. *J Neurosci* 20(6):2369-82.
- Haberstock-Debic H, Kim KA, Yu YJ, von Zastrow M (2005) Morphine promotes rapid, arrestin-dependent endocytosis of mu-opioid receptors in striatal neurons. *J Neurosci* 25(34):7847-57.
- Han W, Hata H, Imbe H, Liu QR, Takamatsu Y, Koizumi M, Murphy NP, Senba E, Uhl GR, Sora I, Ikeda K (2006) Increased body weight in mice lacking mu-opioid receptors. *Neuroreport* 17(9):941-4.
- Harlan RE, Kailas SR, Tagoe CE, Garcia MM (2004) Morphine actions in the rat forebrain: role of protein kinase C. *Brain Res Bull* 62(4):285-95.
- Harrison MB, Wiley RG, Wooten GF (1990) Selective localization of striatal D1 receptors to striatonigral neurons. *Brain Res* 528(2):317-22.
- Harrison MB, Wiley RG, Wooten GF (1992) Changes in D2 but not D1 receptor binding in the striatum following a selective lesion of striatopallidal neurons. *Brain Res* 590(1-2):305-10.
- Hauber W (1998) Involvement of basal ganglia transmitter systems in movement initiation. *Prog Neurobiol* 56(5):507-40.
- Hayward MD, Duman RS, Nestler EJ (1990) Induction of the c-fos proto-oncogene during opiate withdrawal in the locus coeruleus and other regions of rat brain. *Brain Res* 525(2):256-66.
- Hemmings HC Jr, Greengard P, Tung HY, Cohen P (1984) DARPP-32, a dopamine-regulated neuronal phosphoprotein, is a potent inhibitor of protein phosphatase-1. *Nature* 310(5977):503-5.
- Herkenham M, Pert CB (1981) Mosaic distribution of opiate receptors, parafascicular projections and acetylcholinesterase in rat striatum. *Nature* 291(5814):415-8.
- Hernandez A, Ibanez-Sandoval O, Sierra A, Valdiosera R, Tapia D, Anaya V, Galarraga E, Bargas J, Aceves J (2006) Control of the subthalamic innervation of the rat globus pallidus by D2/3 and D4 dopamine receptors. *J Neurophysiol* 96(6):2877-88.
- Herrera-Marschitz M, Christensson-Nylander I, Sharp T, Staines W, Reid M, Hokfelt T, Terenius L, Ungerstedt U (1986) Striato-nigral dynorphin and substance P pathways in the rat. II. Functional analysis. *Exp Brain Res* 64(1):193-207.
- Hikosaka O, Nakahara H, Rand MK, Sakai K, Lu X, Nakamura K, Miyachi S, Doya K (1999) Parallel neural networks for learning sequential procedures. *Trends Neurosci* 22: 464-71.

- Hope BT, Nye HE, Kelz MB, Self DW, Iadarola MJ, Nakabeppu Y, Duman RS, Nestler EJ (1994) Induction of a long-lasting AP-1 complex composed of altered Fos-like proteins in brain by chronic cocaine and other chronic treatments. *Neuron* 13:1235-44.
- Horner KA, Zadina JE (2004) Internalization and down-regulation of mu opioid receptors by endomorphins and morphine in SH-SY5Y human neuroblastoma cells. *Brain Res* 1028(2):121-32.
- Hyman SE, Malenka RC (2001) Addiction and the brain: the neurobiology of compulsion and its persistence. *Nat Rev Neurosci* 2(10):695-703.
- Ito K, Haga T, Lameh J, Sadee W (1999) Sequestration of dopamine D2 receptors depends on coexpression of G-protein-coupled receptor kinases 2 or 5. *Eur J Biochem* 260(1):112-9.
- Ito K, Toru M, Ito K, Tsuga H, Kameyama K, Haga T, Arinami T, Hamaguchi H (1996) Sequestration of the short and long isoforms of dopamine D2 receptors expressed in Chinese hamster ovary cells. *Mol Pharmacol* 49(3):560-6.
- Iwata K, Ito K, Fukuzaki A, Inaki K, Haga T (1999) Dynamin and rab5 regulate GRK2-dependent internalization of dopamine D2 receptors. *Eur J Biochem* 263(2):596-602.
- Jiang HK, McGinty JF, Hong JS (1990) Differential modulation of striatonigral dynorphin and enkephalin by dopamine receptor subtypes. *Brain Res* 507(1):57-64.
- Jiang D, Sibley DR (1999) Regulation of D(1) dopamine receptors with mutations of protein kinase phosphorylation sites: attenuation of the rate of agonist-induced desensitization. *Mol Pharmacol* 56(4):675-83.
- Jimenez-Castellanos J, Graybiel AM (1987) Subdivisions of the dopamine-containing A8-A9-A10 complex identified by their differential mesostriatal innervation of striosomes and extrastriosomal matrix. *Neuroscience* 23(1):223-42.
- Jimenez-Castellanos J, Graybiel AM (1989) Evidence that histochemically distinct zones of the primate substantia nigra pars compacta are related to patterned distributions of nigrostriatal projection neurons and striatonigral fibers. *Exp Brain Res* 74(2):227-38.
- Jin W, Lee NM, Loh HH, and Thayer SA (1994) Opioids mobilize calcium from inositol 1,4,5-trisphosphate-sensitive stores in NG108-15 cells. *J Neurosci* 14:1920-29.
- Joel D, Weiner I (1997) The connections of the primate subthalamic nucleus: indirect pathways and the open-interconnected scheme of basal ganglia-thalamocortical circuitry. *Brain Res Rev* 23(1-2):62-78.
- Johnson SW, North RA (1992) Opioids excite dopamine neurons by hyperpolarization of local interneurons. *J Neurosci* 12(2):483-8.
- Johnson GL, Lapadat R (2002) Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science* 298(5600):1911-2.
- Kabbani N, Negyessy L, Lin R, Goldman-Rakic P, Levenson R (2002) Interaction with neuronal calcium sensor NCS-1 mediates desensitization of the D2 dopamine receptor. *J Neurosci* 22(19):8476-86.
- 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(5871):245-9.
- Kalivas PW, Widerlov E, Stanley D, Breese G, Prange AJ Jr (1983) Enkephalin action on the mesolimbic system: a dopamine-dependent and a dopamine-independent increase in locomotor activity. *J Pharmacol Exp Ther* 227(1):229-37.
- Kalivas PW, Sorg BA, Hooks MS (1993) The pharmacology and neural circuitry of sensitization to psychostimulants. *Behav Pharmacol* 4(4):315-334.
- Kaneko T, Minami M, Satoh M, Mizuno N (1995) Immunocytochemical localization of mu-opioid receptor in the rat caudate-putamen. *Neurosci Lett* 184(3):149-52.
- Katz JL, Chausmer AL, Elmer GI, Rubinstein M, Low MJ, Grandy DK (2003) Cocaine-induced locomotor activity and cocaine discrimination in dopamine D4 receptor mutant mice. *Psychopharmacology (Berl)* 170(1):108-14.
- Kebabian JW, Calne DB (1979) Multiple receptors for dopamine. *Nature* 277(5692):93-6.
- Keefe KA, Ganguly A (1998) Effects of NMDA receptor antagonists on D1 dopamine receptor-mediated changes in striatal immediate early gene expression: evidence for involvement of pharmacologically distinct NMDA receptors. *Dev Neurosci* 20(2-3):216-28.
- 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(32):19021-4.
- Keith DE, Anton B, Murray SR, Zaki PA, Chu PC, Lissin DV, Montelliet-Agius G, Stewart PL, Evans CJ, von Zastrow M (1998) mu-Opioid receptor internalization: opiate drugs have differential effects on a conserved endocytic mechanism in vitro and in the mammalian brain. *Mol Pharmacol* 53(3):377-84.
- Kelz MB, Nestler EJ (2000) DeltaFosB: a molecular switch underlying long-term neural plasticity. *Curr Opin Neurol* 13:715-720.
- Khan ZU, Gutierrez A, Martin R, Penafiel A, Rivera A, De La Calle A (1998) Differential regional and cellular distribution of dopamine D2-like receptors: an immunocytochemical study of subtype-specific antibodies in rat and human brain. *J Comp Neurol* 402(3):353-71.
- Kieffer BL, Befort K, Gaveriaux-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(24):12048-52.
- Kim KM, Valenzano KJ, Robinson SR, Yao WD, Barak LS, Caron MG (2001) Differential regulation of the dopamine D2 and D3 receptors by G protein-coupled receptor kinases and beta-arrestins. *J Biol Chem* 276(40):37409-14.
- Kincaid AE, Wilson CJ (1996) Corticostriatal innervation of the patch and matrix in the rat neostriatum. *J Comp Neurol* 374(4):578-92.
- Ko JL, Minnerath SR, Loh HH (1997) Dual promoters of mouse mu-opioid receptor gene. *Biochem. Biophys. Res Commun* 234(2):351-7.
- Koch T, Schulz S, Pfeiffer M, Klutzny M, Schroder H, Kahl E, Holt V (2001) C-terminal splice variants of the mouse mu-opioid receptor differ in morphine-induced internalization and receptor resensitization. *J Biol Chem* 276(33):31408-14.
- Koch T, Widera A, Bartzsch K, Schulz S, Brandenburg LO, Wundrack N, Beyer A, Grecksch G, Holt V (2005) Receptor endocytosis counteracts the development of opioid tolerance. *Mol Pharmacol* 67(1):280-7.
- Konradi C, Kobierski LA, Nguyen TV, Heckers S, Hyman SE (1993) The cAMP-response-element-binding protein interacts, but Fos protein does not interact, with the proenkephalin enhancer in rat striatum. *Proc Natl Acad Sci USA* 90(15):7005-9.
- Konradi C, Cole RL, Heckers S, Hyman SE (1994) Amphetamine regulates gene expression in rat striatum via transcription factor CREB. *J Neurosci* 14(9):5623-34.
- Konradi C, Leveque JC, Hyman SE (1996) Amphetamine and dopamine-induced immediate early gene expression in striatal neurons depends on postsynaptic NMDA receptors and calcium. *J Neurosci* 16(13):4231-9.
- Koob GF (1992) Drugs of abuse: anatomy, pharmacology and function of reward pathways. *Trends Pharmacol Sci* 13(5):177-84.
- Koob GF (1996) Hedonic valence, dopamine and motivation. *Mol Psychiatry* 1(3):186-9.
- Koob GF, Le Moal M (1997) Drug abuse: hedonic homeostatic dysregulation. *Science* 278(5335):52-8.
- Kotler M, Cohen H, Segman R, Gritsenko I, Nemanov L, Lerer B, Kramer I, Zer-Zion M, Kletz I, Ebstein RP (1997) Excess dopamine D4 receptor (D4DR) exon III seven repeat allele in opioid-dependent subjects. *Mol Psychiatry* 2(3):251-4.
- Kovacs KJ (1998) c-Fos as a transcription factor: a stressful (re)view from a functional map. *Neurochem Int* 33(4):287-97.
- Kowalski C, Micheau J, Corder R, Gaillard R, Conte-Devolx B (1992) Age-related changes in cortico-releasing factor, somatostatin, neuropeptide Y, methionine enkephalin and beta-endorphin in specific rat brain areas. *Brain Res* 582(1):38-46.
- Kruzich PJ, Suchland KL, Grandy DK (2004) Dopamine D4 receptor-deficient mice, congenic on the C57BL/6J background, are hypersensitive to amphetamine. *Synapse* 53(2):131-9.
- Kulagowski JJ, Broughton HB, Curtis NR, Mawer IM, Ridgill MP, Baker R, Emms F, Freedman SB, Marwood R, Patel S, Patel S, Ragan CI, Leeson PD (1996) 3-((4-(4-Chlorophenyl)piperazin-1-yl)-methyl)-1H-pyrrolo-2,3-b-pyridine: an antagonist with high affinity and selectivity for the human dopamine D4 receptor. *J Med Chem* 39(10):1941-2.
- Kumer SC, Vrana KE (1996) Intricate regulation of tyrosine hydroxylase activity and gene expression. *J Neurochem* 67(2):443-62.
- Kunishio K, Haber SN (1994) Primate cingulostriatal projection: limbic striatal versus sensorimotor striatal input. *J Comp Neurol* 350(3):337-56.
- Kuribara H (1995) Modification of morphine sensitization by opioid and dopamine receptor

- antagonists: evaluation by studying ambulation in mice. *Eur J Pharmacol* 275(3):251-8.
- Kurose H, Katada T, Amano T, Ui M (1983) Specific uncoupling by islet-activating protein, pertussis toxin, of negative signal transduction via alpha-adrenergic, cholinergic, and opiate receptors in neuroblastoma x glioma hybrid cells. *J Biol Chem* 258(8):4870-5.
- Lacey MG, Mercuri NB, North RA (1989) Two cell types in rat substantia nigra zona compacta distinguished by membrane properties and the actions of dopamine and opioids. *J Neurosci* 9(4):1233-41.
- Lachowicz JE, Shen Y, Monsma FJ Jr, Sibley DR (1995) Molecular cloning of a novel G protein-coupled receptor related to the opiate receptor family. *J Neurochem* 64(1):34-40.
- LaHoste GJ, Swanson JM, Wigal SB, Glabe C, Wigal T, King N, Kennedy JL (1996) Dopamine D4 receptor gene polymorphism is associated with attention deficit hyperactivity disorder. *Mol Psychiatry* 1(2):121-4.
- Law PY, Wong YH, Loh HH (2000) Molecular mechanisms and regulation of opioid receptor signaling. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 40:389-430.
- Le Bon O, Basiaux P, Streel E, Tecco J, Hanak C, Hansenne M, Ansseau M, Pelc I, Verbanck P, Dupont S (2004) Personality profile and drug of choice; a multivariate analysis using Cloninger's TCI on heroin addicts, alcoholics, and a random population group. *Drug Alcohol Depend* 73(2):175-82.
- Le Moine C, Normand E, Bloch B (1991) Phenotypical characterization of the rat striatal neurons expressing the D1 dopamine receptor gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 88(10):4205-9.
- Le Moine C, Bloch B (1995) D1 and D2 dopamine receptor gene expression in the rat striatum: sensitive cRNA probes demonstrate prominent segregation of D1 and D2 mRNAs in distinct neuronal populations of the dorsal and ventral striatum. *J Comp Neurol* 355(3):418-26.
- Le Moine C, Svenningsson P, Fredholm BB, Bloch B (1997) Dopamine-adenosine interactions in the striatum and the globus pallidus: inhibition of striatopallidal neurons through either D2 or A2A receptors enhances D1 receptor-mediated effects on c-fos expression. *J Neurosci* 17(20):8038-48.
- Leone P, Pocock D, Wise RA (1991) Morphine-dopamine interaction: ventral tegmental morphine increases nucleus accumbens dopamine release. *Pharmacol Biochem Behav* 39(2):469-72.
- Levesque D, Diaz J, Pilon C, Martres MP, Giros B, Souil E, Schott D, Morgat JL, Schwartz JC, Sokoloff P (1992) Identification, characterization, and localization of the dopamine D3 receptor in rat brain using 7-[3H]hydroxy-N,N-di-n-propyl-2-aminotetralin. *Proc Natl Acad Sci USA* 89(17):8155-9.
- Levine AA, Guan Z, Barco A, Xu S, Kandel ER, Schwartz JH (2005) CREB-binding protein controls response to cocaine by acetylating histones at the fosB promoter in the mouse striatum. *Proc Natl Acad Sci USA* 102(52):19186-91.
- Li SJ, Jiang HK, Stachowiak MS, Hudson PM, Owyang V, Nanry K, Tilson HA, Hong JS (1990) Influence of nigrostriatal dopaminergic tone on the biosynthesis of dynorphin and enkephalin in rat striatum. *Brain Res Mol Brain Res* 8(3):219-25.
- Li S, Zhu J, Chen C, Chen YW, Deriel JK, Ashby B, Liu-Chen LY (1993) Molecular cloning and expression of a rat kappa opioid receptor. *Biochem J* 295:629-33.
- Li LY, Chang KJ (1996) The stimulatory effect of opioids on mitogen-activated protein kinase in Chinese hamster ovary cells transfected to express mu-opioid receptors. *Mol Pharmacol* 50:599-602.
- Liang Y, Mestek A, Yu L, Carr LG (1995) Cloning and characterization of the promoter region of the mouse mu opioid receptor gene. *Brain Res* 679(1):82-8.
- Liang Y, Carr LG (1997) Transcription of the mouse mu-opioid receptor gene is regulated by two promoters. *Brain Res* 769(2):372-4.
- Lieberman DN, Mody I (1994) Regulation of NMDA channel function by endogenous Ca(2+)-dependent phosphatase. *Nature* 369(6477):235-9.
- Lindskog M, Svenningsson P, Fredholm B, Greengard P, Fisone G (1999) Mu- and delta-opioid receptor agonists inhibit DARPP-32 phosphorylation in distinct populations of striatal projection neurons. *Eur J Neurosci* 11(6):2182-6.
- Liu J, Nickolenko J, Sharp FR (1994) Morphine induces c-fos and junB in striatum and nucleus accumbens via D1 and N-methyl-D-aspartate receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 91(18):8537-41.
- Liu JG, Anand KJ (2001) Protein kinases modulate the cellular adaptations associated with opioid tolerance and dependence. *Brain Res Rev* 38(1-2):1-19.

- Loh HH, AP Smith AP (1990) Molecular characterization of opioid receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 30:123-147.
- Lonze BE, Ginty DD (2002) Function and regulation of CREB family transcription factors in the nervous system. *Neuron* 35(4):605-23.
- Lovenberg TW, Nichols DE, Nestler EJ, Roth RH, Mailman RB (1991) Guanine nucleotide binding proteins and the regulation of cyclic AMP synthesis in NS20Y neuroblastoma cells: role of D1 dopamine and muscarinic receptors. *Brain Res* 556(1):101-7.
- MacGibbon GA, Lawlor PA, Hughes P, Young D, Dragunow M (1995) Differential expression of inducible transcription factors in basal ganglia neurons. *Mol Brain Res* 34(2):294-302.
- Maisonneuve IM, Archer S, Glick SD (1994) U50,488, a kappa opioid receptor agonist, attenuates cocaine-induced increases in extracellular dopamine in the nucleus accumbens of rats. *Neurosci Lett* 181(1-2):57-60.
- 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(8):2445-64.
- Mansour A, Thompson RC, Akil H, Watson SJ (1993) Delta opioid receptor mRNA distribution in the brain: comparison to delta receptor binding and proenkephalin mRNA. *J Chem Neuroanat* 6(6):351-62.
- Mansour A, Fox CA, Burke S, Meng F, Thompson RC, Akil H, Watson SJ (1994a) Mu, delta, and kappa opioid receptor mRNA expression in the rat CNS: an in situ hybridization study. *J Comp Neurol* 350(3):412-38.
- Mansour A, Fox CA, Thompson RC, Akil H, Watson SJ (1994b) mu-Opioid receptor mRNA expression in the rat CNS: comparison to mu-receptor binding. *Brain Res* 643(1-2):245-65.
- Mansour A, Fox CA, Meng F, Akil H, Watson SJ (1994c) Kappa 1 receptor mRNA distribution in the rat CNS: comparison to kappa receptor binding and prodynorphin mRNA. *Mol Cell Neurosci* 5(2):124-44.
- Mansour A, Fox CA, Burke S, Akil H, Watson SJ (1995) Immunohistochemical localization of the cloned mu opioid receptor in the rat CNS. *J Chem Neuroanat* 8(4):283-305.
- Mansour A, Burke S, Pavlic RJ, Akil H, Watson SJ (1996) Immunohistochemical localization of the cloned kappa 1 receptor in the rat CNS and pituitary. *Neuroscience* 71(3):671-90.
- Manzanares J, Lookingland KJ, Moore KE (1991) Kappa opioid receptor-mediated regulation of dopaminergic neurons in the rat brain. *J Pharmacol Exp Ther* 256(2):500-5.
- Marshall FH, Jones KA, Kaupmann K, Bettler B (1999) GABAB receptors - the first 7TM heterodimers. *Trends Pharmacol Sci* 20(10):396-9.
- Martin LJ, Blackstone CD, Haganir RL, Price DL (1992) Cellular localization of a metabotropic glutamate receptor in rat brain. *Neuron* 9:259-270.
- Martin KC, Kandel ER (1996) Cell adhesion molecules, CREB, and the formation of new synaptic connections. *Neuron* 17(4):567-70.
- Mason JN, Kozell LB, Neve KA (2002) Regulation of dopamine D(1) receptor trafficking by protein kinase A-dependent phosphorylation. *Mol Pharmacol* 61(4):806-16.
- Matsumoto M, Hidaka K, Tada S, Tasaki Y, Yamaguchi T (1995) Full-length cDNA cloning and distribution of human dopamine D4 receptor. *Mol Brain Res* 29(1):157-62.
- Matthes HW, Maldonado R, Simonin F, Valverde O, Slowe S, Kitchen I, Befort K, Dierich A, Le Meur M, Dolle P, Tzavara E, Hanoune J, Roques BP, Kieffer BL (1996) Loss of morphine-induced analgesia, reward effect and withdrawal symptoms in mice lacking the mu-opioid-receptor gene. *Nature* 383(6603):819-23.
- Matthews RT, German DC (1984) Electrophysiological evidence for excitation of rat ventral tegmental area dopamine neurons by morphine. *Neuroscience* 11(3):617-25.
- Matthews RP, Guthrie CR, Wailes LM, Zhao X, Means AR, McKnight GS (1994) Calcium/calmodulin-dependent protein kinase types II and IV differentially regulate CREB-dependent gene expression. *Mol Cell Biol* 14(9):6107-16.
- Mauger C, Sivan B, Brockhaus M, Fuchs S, Civelli O, Monsma F Jr (1998) Development and characterization of antibodies directed against the mouse D4 dopamine receptor. *Eur J Neurosci* 10(2):529-37.
- Mavridis M, Besson MJ (1999) Dopamine-opiate interaction in the regulation of neostriatal and pallidal neuronal activity as assessed by opioid precursor peptides and glutamate decarboxylase messenger RNA expression. *Neuroscience* 92(3):945-66.
- Mayr B, Montminy M (2001) Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2(8):599-609.

- Meador-Woodruff JH, Haroutunian V, Powchik P, Davidson M, Davis KL, Watson SJ (1997) Dopamine receptor transcript expression in striatum and prefrontal and occipital cortex. Focal abnormalities in orbitofrontal cortex in schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry* 54(12):1089-95.
- Meck WH (2006) Neuroanatomical localization of an internal clock: A functional link between mesolimbic, nigrostriatal, and mesocortical dopaminergic systems. *Brain Res* 1109(1):93-107.
- 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(3 Pt 2):2396-406.
- Meunier JC (1997) Nociceptin/orphanin FQ and the opioid receptor-like ORL1 receptor. *Eur J Pharmacol* 340(1):1-15.
- Miller JC (1990) Induction of c-fos mRNA expression in rat striatum by neuroleptic drugs. *J Neurochem* 54(4):1453-5.
- Milligan G (2004) G protein-coupled receptor dimerization: function and ligand pharmacology. *Mol Pharmacol* 66(1):1-7.
- Min BH, Augustin LB, Felsheim RF, Fuchs JA, Loh HH (1994) Genomic structure analysis of promoter sequence of a mouse mu opioid receptor gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 91(19):9081-5.
- Minami M, Hosoi Y, Toya T, Katao Y, Maekawa K, Katsumata S, Yabuuchi K, Onogi T, Satoh M (1993) In situ hybridization study of kappa-opioid receptor mRNA in the rat brain. *Neurosci Lett* 162(1-2):161-4.
- Missale C, Nash SR, Robinson SW, Jaber M, Caron MG (1998) Dopamine receptors: from structure to function. *Physiol Rev* 78(1):189-225.
- Mollereau C, Parmentier M, Mailleux P, Butour JL, Moisand C, Chalon P, Caput D, Vassart G, Meunier JC (1994) ORL1, a novel member of the opioid receptor family. Cloning, functional expression and localization. *FEBS Lett* 341(1):33-8.
- Monory K, Bourin MC, Spetea M, Tomboly C, Toth G, Matthes HW, Kieffer BL, Hanoune J, Borsodi A (2000) Specific activation of the mu opioid receptor (MOR) by endomorphin 1 and endomorphin 2. *Eur J Neurosci* 12(2):577-84.
- Montminy M (1997) Transcriptional regulation by cyclic AMP. *Annu Rev Biochem* 66:807-22.
- Moratalla R, Vickers EA, Robertson HA, Cochran BH, Graybiel AM (1993) Coordinate expression of c-fos and jun B is induced in the rat striatum by cocaine. *J Neurosci* 13(2):423-33.
- Moratalla R, Xu M, Tonegawa S, Graybiel AM (1996) Cellular responses to psychomotor stimulant and neuroleptic drugs are abnormal in mice lacking the D1 dopamine receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 93(25):14928-33.
- Morelli M, Fenu S, Di Chiara G (1989). Substantia nigra as a site of origin of dopamine-dependent motor syndromes induced by stimulation of mu and delta opioid receptors. *Brain Res* 487(1):120-30.
- Morgan JI, Curran T (1991) Stimulus-transcription coupling in the nervous system: involvement of the inducible proto-oncogenes fos and jun. *Annu Rev Neurosci* 14:421-51.
- Moriwaki A, Wang JB, Svingos A, Van Bockstaele E, Cheng P, Pickel V, Uhl GR (1996) mu Opiate receptor immunoreactivity in rat central nervous system. *Neurochem Res* 21(11):1315-31.
- Mrzljak L, Bergson C, Pappay M, Huff R, Levenson R, Goldman-Rakic PS (1996) Localization of dopamine D4 receptors in GABAergic neurons of the primate brain. *Nature* 381(6579):245-8.
- Mulder AH, Wardeh G, Hogenboom F, Frankhuyzen AL (1984) Kappa- and delta-opioid receptor agonists differentially inhibit striatal dopamine and acetylcholine release. *Nature* 308(5956):278-80.
- Muller DL, Unterwald EM (2005) D1 dopamine receptors modulate deltaFosB induction in rat striatum after intermittent morphine administration. *J Pharmacol Exp Ther* 314(1):148-54.
- Mumberg D, Lucibello FC, Schuermann M, Muller R (1991) Alternative splicing of fosB transcripts results in differentially expressed mRNAs encoding functionally antagonistic proteins. *Genes Dev* 5(7):1212-23.
- Murphy NP, Lam HA, Maidment NT (2001) A comparison of morphine-induced locomotor activity and mesolimbic dopamine release in C57BL6, 129Sv and DBA2 mice. *J Neurochem* 79(3):626-35.
- Nadal R, Rotllant D, Marquez C, Armario A (2005) Perseverance of exploration in novel environments predicts morphine place conditioning in rats. *Behav Brain Res* 165(1):72-9.
- Naito A, Kita H (1994) The cortico-nigral projection in the rat: an anterograde tracing

- study with biotinylated dextran amine. *Brain Res* 637(1-2):317-22.
- 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(5703):423-7.
- Narita M, Narita M, Mizoguchi H, Tseng LF (1995) Inhibition of protein kinase C, but not of protein kinase A, blocks the development of acute antinociceptive tolerance to an intrathecally administered mu-opioid receptor agonist in the mouse. *Eur J Pharmacol* 280(2):R1-3.
- Nayak S, Cassaday HJ (2003) The novel dopamine D4 receptor agonist (PD 168,077 maleate): doses with different effects on locomotor activity are without effect in classical conditioning. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 27(3):441-9.
- Nemmani KV, Lalonde J, Mogil JS (2005) Region-specific changes of calcium/calmodulin-dependent protein kinase IV in the mouse brain following chronic morphine treatment. *Neuroreport* 16(9):879-82
- Nestler EJ (1992) Molecular mechanisms of drug addiction. *J Neurosci* 12(7):2439-50.
- Nestler EJ, Hope BT, Widnell KL (1993a) Drug addiction: a model for the molecular basis of neural plasticity. *Neuron* 11(6):995-1006.
- Nestler EJ, Bergson CM, Gultart X, Hope BT (1993b) Regulation of neural gene expression in opiate and cocaine addiction. *NIDA Res Monogr* 125:92-116.
- Nestler EJ, Barrot M, Self DW (2001) Δ FosB: A sustained molecular switch for addiction. *PNAS* 98(20):11042-46.
- Nestler EJ (2004a) Historical review: Molecular and cellular mechanisms of opiate and cocaine addiction. *Trends Pharmacol Sci* 25(4):210-8.
- Nestler EJ (2004b) Molecular mechanisms of drug addiction. *Neuropharmacology* 47(Suppl 1):24-32.
- Nguyen TV, Kosofsky BE, Birnbaum R, Cohen BM, Hyman SE (1992) Differential expression of c-fos and zif268 in rat striatum after haloperidol, clozapine, and amphetamine. *Proc Natl Acad Sci USA* 89(10):4270-4.
- Nieoullon A, Cheramy A, Glowinski J (1978) Release of dopamine evoked by electrical stimulation of the motor and visual areas of the cerebral cortex in both caudate nuclei and in the substantia nigra in the cat. *Brain Res* 145(1):69-83.
- Nishina H, Sato H, Suzuki T, Sato M, Iba H (1990) Isolation and characterization of fra-2, an additional member of the fos gene family. *Proc Natl Acad Sci USA* 87(9):3619-23.
- Noble F, Cox BM (1995) Differential regulation of D₁ dopamine receptor- and of A_{2a} adenosine receptor-stimulated adenylyl cyclase by μ -, δ_1 - and δ_2 -opioid agonists in rat caudate-putamen. *J Neurochem* 65: 125-33.
- 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(5846):202-6.
- Nye HE, Nestler EJ (1996) Induction of chronic Fos-related antigens in rat brain by chronic morphine administration. *Mol Pharmacol* 49:636-45.
- Oak JN, Oldenhof J, Van Tol HH (2000) The dopamine D(4) receptor: one decade of research. *Eur J Pharmacol* 405(1-3):303-27.
- Oakley RH, Laporte SA, Holt JA, Caron MG, Barak LS (2000) Differential affinities of visual arrestin, beta arrestin1, and beta arrestin2 for G protein-coupled receptors delineate two major classes of receptors. *J Biol Chem* 275(22):17201-10.
- Ohmstede CA, Jensen KF, Sahyoun NE (1989) Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase enriched in cerebellar granule cells. Identification of a novel neuronal calmodulin-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 264(10):5866-75.
- Oliverio A, Castellano C (1981) Behavioral effects of opiates: a pharmacogenetic analysis. *Curr Dev Psychopharmacol* 6:45-64.
- Overton P, Clark D (1992) Ionophoretically administered drugs acting at the N-methyl-D-aspartate receptor modulate burst firing in A9 dopamine neurons in the rat. *Synapse* 10(2):131-40.
- Parent A, Hazrati LN (1995a) Functional anatomy of the basal ganglia. I. The cortico-basal ganglia-thalamo-cortical loop. *Brain Res Rev* 20(1):91-127.
- Parent A, Hazrati LN (1995b) Functional anatomy of the basal ganglia. II. The place of subthalamic nucleus and external pallidum in basal ganglia circuitry. *Brain Res Rev* 20(1):128-54.
- Park MR, Lighthall JW, Kitai ST (1980) Recurrent inhibition in the rat neostriatum. *Brain Res* 194(2):359-69.

- Patel S, Freedman S, Chapman KL, Emms F, Fletcher AE, Knowles M, Marwood R, Mcallister G, Myers J, Curtis N, Kulagowski JJ, Leeson PD, Ridgill M, Graham M, Matheson S, Rathbone D, Watt AP, Bristow LJ, Rupniak NM, Baskin E, Lynch JJ, Ragan CI (1997) Biological profile of L-745,870, a selective antagonist with high affinity for the dopamine D4 receptor. *J Pharmacol Exp Ther* 283(2):636-47.
- Pavon N, Martin AB, Mendiadua A, Moratalla R (2006) ERK phosphorylation and FosB expression are associated with L-DOPA-induced dyskinesia in hemiparkinsonian mice. *Biol Psychiatry* 59(1):64-74.
- Paxinos G and Watson C (2001) The rat brain in stereotaxic coordinates. Academic Press, Sydney (Australia).
- Peckys D, Landwehrmeyer GB (1999) Expression of mu, kappa, and delta opioid receptor messenger RNA in the human CNS: a 33P in situ hybridization study. *Neuroscience* 88(4):1093-135.
- Persico AM, Schindler CW, O'Hara BF, Brannock MT, Uhl GR (1993) Brain transcription factor expression: effects of acute and chronic amphetamine and injection stress. *Mol Brain Res* 20(1-2):91-100.
- Pert CB, Kuhar MJ, Snyder SH (1976) Opiate receptor: autoradiographic localization in rat brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 73(10):3729-33.
- Pham TA, Impey S, Storm DR, Stryker MP (1999) CRE-mediated gene transcription in neocortical neuronal plasticity during the developmental critical period. *Neuron* 22(1):63-72.
- Pickel VM, Chan J, Sesack SR (1993) Cellular substrates for interactions between dynorphin terminals and dopamine dendrites in rat ventral tegmental area and substantia nigra. *Brain Res* 602(2):275-89.
- Pierce RC, Kalivas PW (1997) A circuitry model of the expression of behavioral sensitization to amphetamine-like psychostimulants. *Brain Res Rev* 25(2):192-216.
- Pierce KL, Luttrell LM, Lefkowitz RJ (2001) New mechanisms in heptahelical receptor signaling to mitogen activated protein kinase cascades. *Oncogene* 20(13):1532-9.
- Pierce RC, Kumaresan V (2006) The mesolimbic dopamine system: the final common pathway for the reinforcing effect of drugs of abuse? *Neurosci Biobehav Rev* 30(2):215-38.
- Ponce G, Rodríguez-Jimenez R, Perez JA, Monasor R, Rubio G, Jimenez MA, Palomo T (2000) Attention-deficit hyperactivity disorder and vulnerability to the development of alcoholism: use of the Wender-Utah Rating Scale for retrospective diagnostic of ADHD in the childhood of alcoholic patients. *Actas Esp Psiquiatr* 28(6):357-66.
- Pontieri FE, Tanda G, Di Chiara G (1995) Intravenous cocaine, morphine, and amphetamine preferentially increase extracellular dopamine in the "shell" as compared with the "core" of the rat nucleus accumbens. *Proc Natl Acad Sci USA* 92(26):12304-8.
- Post RM, Rose H (1976) Increasing effects of repetitive cocaine administration in the rat. *Nature* 260(5553):731-2.
- Pothos E, Rada P, Mark GP, Hoebel BG (1991) Dopamine microdialysis in the nucleus accumbens during acute and chronic morphine, naloxone-precipitated withdrawal and clonidine treatment. *Brain Res* 566(1-2):348-50.
- Powell SB, Paulus MP, Hartman DS, Godel T, Geyer MA (2003) RO-10-5824 is a selective dopamine D4 receptor agonist that increases novel object exploration in C57 mice. *Neuropharmacology* 44(4):473-81.
- Pozzi L, Hakansson K, Usiello A, Borgkvist A, Lindskog M, Greengard P, Fisone G (2003) Opposite regulation by typical and atypical anti-psychotics of ERK1/2, CREB and Elk-1 phosphorylation in mouse dorsal striatum. *J Neurochem* 86(2):451-9.
- Prensa L, Parent A, Gimenez-Amaya JM (1999) Compartmentalized organization of human corpus striatum. *Rev Neurol* 28(5):512-9.
- Przewlocka B, Turchan J, Lason W, Przewlocki R (1996) The effect of single and repeated morphine administration on the prodynorphin system activity in the nucleus accumbens and striatum of the rat. *Neuroscience* 70(3):749-54.
- Prossnitz ER (2004) Novel roles for arrestins in the post-endocytic trafficking of G protein-coupled receptors. *Life Sci* 75(8):893-9.
- Quadros IM, Nobrega JN, Hipolide DC, Souza-Formigoni ML (2005) Increased brain dopamine D4-like binding after chronic ethanol is not associated with behavioral sensitization in mice. *Alcohol* 37(2):99-104.
- Rada P, Mark GP, Pothos E, Hoebel BG (1991) Systemic morphine simultaneously decreases extracellular acetylcholine and increases dopamine in the nucleus accumbens of freely moving rats. *Neuropharmacology* 30(10):1133-6.

- Raehal KM, Bohn LM (2005) Mu opioid receptor regulation and opiate responsiveness. *AAPS J* 7(3):E587-91.
- Raman IM, Tong G, Jahr CE (1996) Beta-adrenergic regulation of synaptic NMDA receptors by cAMP-dependent protein kinase. *Neuron* 16(2):415-21.
- Raynor K, Kong H, Chen Y, Yasuda K, Yu L, Bell GI, Reisine T (1994) Pharmacological characterization of the cloned kappa-, delta- and mu-opioid receptors. *Mol Pharmacol* 45(2):330-4.
- Reid M, Herrera-Marschitz M, Hokfelt T, Terenius L, Ungerstedt U (1988) Differential modulation of striatal dopamine release by intranigral injection of gamma-aminobutyric acid (GABA), dynorphin A and substance P. *Eur J Pharmacol* 147(3):411-20.
- Reiner A, Anderson KD (1990) The patterns of neurotransmitter and neuropeptide co-occurrence among striatal projection neurons: conclusions based on recent findings. *Brain Res Rev* 15(3):251-65.
- Reinscheid RK, Nothacker HP, Bourson A, Ardati A, Henningsen RA, Bunzow JR, Grandy DK, Langen H, Monsma FJ Jr, Civelli O (1995) Orphanin FQ: a neuropeptide that activates an opioidlike G protein-coupled receptor. *Science* 270(5237):792-4.
- Ribeiro SC, Kennedy SE, Smith YR, Stohler CS, Zubieta JK (2005) Interface of physical and emotional stress regulation through the endogenous opioid system and mu-opioid receptors. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 29(8):1264-80.
- Rivera A, Cuellar B, Giron FJ, Grandy DK, de la Calle A, Moratalla R (2002). Dopamine D4 receptors are heterogeneously distributed in the striosomes/matrix compartments of the striatum. *J Neurochem* 80(2):219-29.
- Rivera A, Trias S, Penafiel A, Angel Narvaez J, Diaz-Cabiale Z, Moratalla R, de la Calle A (2003). Expression of D4 dopamine receptors in striatonigral and striatopallidal neurons in the rat striatum. *Brain Res* 989(1):35-41.
- Robbins TW, Everitt BJ (2002) Limbic-striatal memory systems and drug addiction. *Neurobiol Learn Mem* 78(3):625-36.
- Roberts DC, Koob GF (1982) Disruption of cocaine self-administration following 6-hydroxydopamine lesions of the ventral tegmental area in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 17(5):901-4.
- Robertson HA, Peterson MR, Murphy K, Robertson GS (1989) D1-dopamine receptor agonists selectively activate striatal c-fos independent of rotational behaviour. *Brain Res* 503(2):346-9.
- Robertson GS, Vincent SR, Fibiger HC (1990) Striatonigral projection neurons contain D1 dopamine receptor-activated c-fos. *Brain Res* 523(2):288-90.
- Robertson GS, Fibiger HC (1992) Neuroleptics increase c-fos expression in the forebrain: contrasting effects of haloperidol and clozapine. *Neuroscience* 46(2):315-28.
- Robertson GS, Vincent SR, Fibiger HC (1992) D1 and D2 dopamine receptors differentially regulate c-fos expression in striatonigral and striatopallidal neurons. *Neuroscience* 49(2):285-96.
- Robinson TE, Becker JB (1986) Enduring changes in brain and behavior produced by chronic amphetamine administration: a review and evaluation of animal models of amphetamine psychosis. *Brain Res* 396(2):157-98.
- Robinson TE, Berridge KC (1993) The neural basis of drug craving: an incentive-sensitization theory of addiction. *Brain Res* 18:247-91.
- Rowe DC, Stever C, Giedinghagen LN, Gard JM, Cleveland HH, Terris ST, Mohr JH, Sherman S, Abramowitz A, Waldman ID (1998) Dopamine DRD4 receptor polymorphism and attention deficit hyperactivity disorder. *Mol Psychiatry* 3(5):419-26.
- Rubinstein M, Phillips TJ, Bunzow JR, Falzone TL, Dziewczapolski G, Zhang G, Fang Y, Larson JL, McDougall JA, Chester JA, Saez C, Pugsley TA, Gershanik O, Low MJ, Grandy DK (1997) Mice lacking dopamine D4 receptors are supersensitive to ethanol, cocaine, and methamphetamine. *Cell* 90(6):991-1001.
- Rubinstein M, Cepeda C, Hurst RS, Flores-Hernandez J, Ariano MA, Falzone TL, Kozell LB, Meshul CK, Bunzow JR, Low MJ, Levine MS, Grandy DK (2001) Dopamine D4 receptor-deficient mice display cortical hyperexcitability. *J Neurosci* 21(11):3756-63.
- Ryder K, Lau LF, Nathans D (1988) A gene activated by growth factors is related to the oncogene v-jun. *Proc Natl Acad Sci USA* 85(5):1487-91.
- Sakai N, Thome J, Newton SS, Chen J, Kelz MB, Steffen C, Nestler EJ, Duman RS (2002) Inducible and brain region-specific CREB transgenic mice. *Mol Pharmacol* 61(6):1453-64.
- Sassone-Corsi P, Visvader J, Ferland L, Mellon PL, Verma IM (1988) Induction of proto-

- oncogene fos transcription through the adenylate cyclase pathway: characterization of a cAMP-responsive element. *Genes Dev* 2(12A):1529-38.
- Schlosser B, Kudernatsch MB, Sutor B, ten Bruggencate G (1995) Delta, mu and kappa opioid receptor agonists inhibit dopamine overflow in rat neostriatal slices. *Neurosci Lett* 191(1-2):126-30.
- Searight HR, Burke JM, Rottnek F (2000) Adult ADHD: evaluation and treatment in family medicine. *Am Fam Physician* 62(9):2077-86, 2091-2.
- Self DW, Stein L (1992) The D1 agonists SKF 82958 and SKF 77434 are self-administered by rats. *Brain Res* 582(2):349-52.
- Seeman P, Van Tol HH (1994). Dopamine receptor pharmacology. *Trends Pharmacol Sci* 15: 264-70.
- Sever S (2002) Dynamin and endocytosis. *Curr Opin Cell Biol* 14(4):463-7.
- Sgambato V, Abo V, Rogard M, Besson MJ, Deniau JM (1997) Effect of electrical stimulation of the cerebral cortex on the expression of the Fos protein in the basal ganglia. *Neuroscience* 81(1):93-112.
- Sharif NA, Hughes J (1989) Discrete mapping of brain Mu and delta opioid receptors using selective peptides: quantitative autoradiography, species differences and comparison with kappa receptors. *Peptides* 10(3):499-522.
- Sharp FR, Liu J, Nickolenko J, Bontempi B (1995) NMDA and D1 receptors mediate induction of c-fos and junB genes in striatum following morphine administration: implications for studies of memory. *Behav Brain Res* 66(1-2):225-30.
- Shaywitz AJ, Greenberg ME (1999) CREB: a stimulus-induced transcription factor activated by a diverse array of extracellular signals. *Annu Rev Biochem* 68:821-61.
- Sheng M, Greenberg ME (1990) The regulation and function of c-fos and other immediate early genes in the nervous system. *Neuron* 4(4):477-85.
- Sheng M, McFadden G, Greenberg ME (1990) Membrane depolarization and calcium induce c-fos transcription via phosphorylation of transcription factor CREB. *Neuron* 4(4):571-82.
- Shigemoto R, Nakanishi S, Mizuno N (1992) Distribution of the mRNA for a metabotropic glutamate receptor mGluR1 in the central nervous system: An *in situ* hybridization study in adult and developing rat. *J Comp Neurol* 322: 121-35.
- Shuster L, Webster GW, Yu G (1975) Increased running response to morphine in morphine-pretreated mice. *J Pharmacol Exp Ther* 192(1):64-7.
- Sirinathsinghi DJ, Schuligoi R, Heavens RP, Dixon A, Iversen SD, Hill RG (1994) Temporal changes in the messenger RNA levels of cellular immediate early genes and neurotransmitter/receptor genes in the rat neostriatum and substantia nigra after acute treatment with eticlopride, a dopamine D2 receptor antagonist. *Neuroscience* 62(2):407-23.
- Slepnev VI, Ochoa GC, Butler MH, Grabs D, De Camilli P (1998) Role of phosphorylation in regulation of the assembly of endocytic coat complexes. *Science* 281(5378):821-4.
- Snyder GL, Fienberg AA, Huganir RL, Greengard P (1998) A dopamine/D1 receptor/protein kinase A/dopamine- and cAMP-regulated phosphoprotein (Mr 32 kDa)/protein phosphatase-1 pathway regulates dephosphorylation of the NMDA receptor. *J Neurosci* 18(24):10297-303.
- Solanto MV (2002) Dopamine dysfunction in AD/HD: integrating clinical and basic neuroscience research. *Behav Brain Res* 130(1-2):65-71.
- Sora I, Funada M, Uhl GR (1997) The mu-opioid receptor is necessary for [D-Pen2,D-Pen5]enkephalin-induced analgesia. *Eur J Pharmacol* 324(2-3):R1-2.
- Spanagel R, Herz A, Shippenberg TS (1992) Opposing tonically active endogenous opioid systems modulate the mesolimbic dopaminergic pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 89(6):2046-50.
- Spanagel R, Shippenberg TS (1993) Modulation of morphine induced sensitization by endogenous K-opioid systems. *Neurosci Lett* 153: 232-6.
- Spangler R, Zhou Y, Maggos CE, Schlussman SD, Ho A, Kreek MJ (1997) Prodynorphin, proenkephalin and kappa opioid receptor mRNA responses to acute "binge" cocaine. *Mol Brain Res* 44(1):139-42.
- Spivak B, Vered Y, Yoran-Hegesh R, Averbuch E, Mester R, Graf E, Weizman A (1999) Circulatory levels of catecholamines, serotonin and lipids in attention deficit hyperactivity disorder. *Acta Psychiatr Scand* 99(4):300-4.

- Stansfield KH, Kirstein CL (2006) Effects of novelty on behavior in the adolescent and adult rat. *Dev Psychobiol* 48(1):10-5.
- Steiner H, Gerfen CR (1999) Enkephalin regulates acute D2 dopamine receptor antagonist-induced immediate-early gene expression in striatal neurons. *Neuroscience* 88(3):795-810.
- Stewart J, Badiani A (1993) Tolerance and sensitization to the behavioral effects of drugs. *Behav Pharmacol* 4(4):289-312.
- Suzuki T, Kobayashi K, Nagatsu T (1995) Genomic structure and tissue distribution of the mouse dopamine D4 receptor. *Neurosci Lett* 199(1):69-72.
- Suzuki T, Kishimoto Y, Misawa M, Nagase H, Takeda F (1999) Role of the kappa-opioid system in the attenuation of the morphine-induced place preference under chronic pain. *Life Sci* 64(1):PL1-7.
- Svenningsson P, Nishi A, Fisone G, Girault JA, Nairn AC, Greengard P (2004) DARPP-32: an integrator of neurotransmission. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 44:269-96.
- Svingos AL, Moriwaki A, Wang JB, Uhl GR, Pickel VM (1996) Ultrastructural immunocytochemical localization of mu-opioid receptors in rat nucleus accumbens: extrasynaptic plasmalemmal distribution and association with Leu5-enkephalin. *J Neurosci* 16(13):4162-73.
- Swanson JM, Sunohara GA, Kennedy JL, Regino R, Fineberg E, Wigal T, Lerner M, Williams L, LaHoste GJ, Wigal S (1998) Association of the dopamine receptor D4 (DRD4) gene with a refined phenotype of attention deficit hyperactivity disorder (ADHD): a family-based approach. *Mol Psychiatry* 3(1):38-41.
- Taber MT, Fibiger HC (1993) Electrical stimulation of the medial prefrontal cortex increases dopamine release in the striatum. *Neuropsychopharmacology* 9(4):271-5.
- Tarazi FI, Kula NS, Baldessarini RJ (1997) Regional distribution of dopamine D4 receptors in rat forebrain. *Neuroreport* 8(16):3423-6.
- Tarazi FI, Campbell A, Yeghiayan SK, Baldessarini RJ (1998) Localization of dopamine receptor subtypes in corpus striatum and nucleus accumbens septi of rat brain: comparison of D1-, D2-, and D4-like receptors. *Neuroscience* 83(1):169-76.
- Tarazi FI, Zhang K, Baldessarini RJ (2004) Dopamine D4 receptors: beyond schizophrenia. *J Recept Signal Transduct Res* 24(3):131-47.
- Tegeder I, Geisslinger G (2004) Opioids as modulators of cell death and survival-unraveling mechanisms and revealing new indications. *Pharmacol Rev* 56(3):351-69.
- Tempel A, Zukin RS (1987) Neuroanatomical patterns of the mu, delta, and kappa opioid receptors of rat brain as determined by quantitative in vitro autoradiography. *Proc Natl Acad Sci USA* 84(12):4308-12.
- Testa CM, Standaert DG, Young AB, Penney Jr. JB (1994) Metabotropic glutamate receptor mRNA expression in the basal ganglia of the rat. *J Neurosci* 14:3005-18.
- Thompson RC, Mansour A, Akil H, Watson SJ (1993) Cloning and pharmacological characterization of a rat mu opioid receptor. *Neuron* 11(5):903-13.
- Thrasher MJ, Freeman PA, Risinger FO (1999) Clozapine's effects on ethanol's motivational properties. *Alcohol Clin Exp Res* 23(8):1377-85.
- Tibbles LA, Woodgett JR (1999) The stress-activated protein kinase pathways. *Cell Mol Life Sci* 55(10):1230-54.
- Toll L (1992) Comparison of mu opioid receptor binding on intact neuroblastoma cells with guinea pig brain and neuroblastoma cell membranes. *J Pharmacol Exp Ther* 260(1):9-15.
- Turchan J, Lason W, Budziszewska B, Przewlocka B (1997) Effects of single and repeated morphine administration on the prodynorphin, proenkephalin and dopamine D2 receptor gene expression in the mouse brain. *Neuropeptides* 31(1):24-8.
- Turgeon SM, Pollack AE, Fink JS (1997) Enhanced CREB phosphorylation and changes in c-Fos and FRA expression in striatum accompany amphetamine sensitization. *Brain Res* 749(1):120-6.
- Ueda H, Miyamae T, Hayashi C, Watanabe S, Fukushima N, Sasaki Y, Iwamura T, Misu Y (1995) Protein kinase C involvement in homologous desensitization of delta-opioid receptor coupled to Gi1-phospholipase C activation in *Xenopus* oocytes. *J Neurosci* 15(11):7485-99.
- Ueda H (2004) Locus-specific involvement of anti-opioid systems in morphine tolerance and dependence. *Ann NY Acad Sci* 1025:376-82.
- Uhl GR, Vandenberg DJ, Rodriguez LA, Miner L, Takahashi N (1998) Dopaminergic genes and substance abuse. *Adv Pharmacol* 42:1024-32.

- Uhl GR, Sora I, Wang Z (1999) The mu opiate receptor as a candidate gene for pain: polymorphisms, variations in expression, nociception, and opiate responses. *Proc Natl Acad Sci USA* 96(14):7752-5.
- Vanderschuren LJ, Tjon GH, Nestby P, Mulder AH, Schoffeleer AN, De Vries TJ (1997) Morphine-induced long-term sensitization to the locomotor effects of morphine and amphetamine depends on the temporal pattern of the pretreatment regimen. *Psychopharmacology (Berl)* 131(2):115-22.
- 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(2-3):99-120.
- Vaught JL, Rothman RB, Westfall TC (1982) Mu and delta receptors: their role in analgesia in the differential effects of opioid peptides on analgesia. *Life Sci* 30(17):1443-55.
- Vincent S, Hokfelt T, Christensson I, Terenius L (1982) Immunohistochemical evidence for a dynorphin immunoreactive striato-nigral pathway. *Eur J Pharmacol* 85(2):251-2.
- Voorn P, Roest G, Groenewegen HJ (1987) Increase of enkephalin and decrease of substance P immunoreactivity in the dorsal and ventral striatum of the rat after midbrain 6-hydroxydopamine lesions. *Brain Res* 412(2):391-6.
- Walker JM, Thompson LA, Frascella J, Friederich MW (1987) Opposite effects of mu and kappa opiates on the firing-rate of dopamine cells in the substantia nigra of the rat. *Eur J Pharmacol* 134(1):53-9.
- Walter S, Kuschinsky K (1989) Conditioning of morphine-induced locomotor activity and stereotyped behaviour in rats. *J Neural Transm Gen Sect* 78(3):231-47.
- Wan W, Ennulat DJ, Cohen BM (1995) Acute administration of typical and atypical antipsychotic drugs induces distinctive patterns of Fos expression in the rat forebrain. *Brain Res* 688(1-2):95-104.
- Wang JB, Imai Y, Eppler CM, Gregor P, Spivak CE, Uhl GR (1993). Mu opiate receptor: cDNA cloning and expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 90(21):10230-4.
- Wang H, Moriwaki A, Wang JB, Uhl GR, Pickel VM (1996) Ultrastructural immunocytochemical localization of mu opioid receptors and Leu5-enkephalin in the patch compartment of the rat caudate-putamen nucleus. *J Comp Neurol* 375(4):659-74.
- Wang H, Moriwaki A, Wang JB, Uhl GR, Pickel VM (1997) Ultrastructural immunocytochemical localization of mu-opioid receptors in dendritic targets of dopaminergic terminals in the rat caudate-putamen nucleus. *Neuroscience* 81(3):757-71.
- Wang JQ, McGinty JF (1998) Metabotropic glutamate receptor agonist increases neuropeptide mRNA expression in rat striatum. *Mol Brain Res* 54(2):262-9.
- Wang H, Pickel VM (1998) Dendritic spines containing mu-opioid receptors in rat striatal patches receive asymmetric synapses from prefrontal corticostriatal afferents. *J Comp Neurol* 396(2):223-37.
- Wang H, Pickel VM (2000) Presence of NMDA-type glutamate receptors in cingulate corticostriatal terminals and their postsynaptic targets. *Synapse* 35(4):300-10.
- Wang X, Zhong P, Yan Z (2002) Dopamine D4 receptors modulate GABAergic signaling in pyramidal neurons of prefrontal cortex. *J Neurosci* 22(21):9185-93.
- Wang X, Zhong P, Gu Z, Yan Z (2003) Regulation of NMDA receptors by dopamine D4 signaling in prefrontal cortex. *J Neurosci* 23(30):9852-61.
- Ward HG, Simansky KJ (2006) Chronic prevention of micro-opioid receptor (MOR) G-protein coupling in the pontine parabrachial nucleus persistently decreases consumption of standard but not palatable food. *Psychopharmacology (Berl)* 187(4):435-46.
- Wedzony K, Chocyk A, Mackowiak M, Fijał K, Czyrak A (2000) Cortical localization of dopamine D4 receptors in the rat brain-immunocytochemical study. *J Physiol Pharmacol* 51(2):205-21.
- Weiss-Wunder LT, Chesselet MF (1990) Heterogeneous distribution of cytochrome oxidase activity in the rat substantia nigra: correlation with tyrosine hydroxylase and dynorphin immunoreactivities. *Brain Res* 529(1-2):269-76.
- Wender PH, Wolf LE, Wasserstein J (2001) Adults with ADHD. An overview. *Ann NY Acad Sci* 931:1-16.
- Westerink BH, Santiago M, De Vries JB (1992) The release of dopamine from nerve terminals and dendrites of nigrostriatal neurons induced by excitatory amino acids in the conscious rat. *Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol* 345(5):523-9.
- Westphal RS, Tavalin SJ, Lin JW, Alto NM, Fraser ID, Langeberg LK, Sheng M, Scott JD (1999) Regulation of NMDA receptors by an associated phosphatase-kinase signaling complex. *Science* 285(5424):93-6.

- White NM (1989) A functional hypothesis concerning the striatal matrix and patches: mediation of S-R memory and reward. *Life Sci* 45(21):1943-57.
- White NM (1997) Mnemonic functions of the basal ganglia. *Curr Opin Neurobiol* 7(2):164-9.
- White NM, Hiroi N (1998) Preferential localization of self-stimulation sites in striosomes/patches in the rat striatum. *Proc Natl Acad Sci USA* 95(11):6486-91.
- Wick MJ, Minnerath SR, Lin X, Elde R, Law PY, Loh HH (1994) Isolation of a novel cDNA encoding a putative membrane receptor with high homology to the cloned mu, delta, and kappa opioid receptors. *Mol Brain Res* 27(1):37-44.
- Widnell KL, Russell DS, Nestler EJ (1994) Regulation of expression of cAMP response element-binding protein in the locus coeruleus in vivo and in a locus coeruleus-like cell line in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 91(23):10947-51.
- Widnell KL, Self DW, Lane SB, Russell DS, Vaidya VA, Miserendino MJ, Rubin CS, Duman RS, Nestler EJ (1996) Regulation of CREB expression: in vivo evidence for a functional role in morphine action in the nucleus accumbens. *J Pharmacol Exp Ther* 276(1):306-15.
- Williams JT, Christie MJ, Manzoni O (2001) Cellular and synaptic adaptations mediating opioid dependence. *Physiol Rev* 81(1):299-343.
- Wilson CJ, Groves PM (1980) Fine structure and synaptic connections of the common spiny neuron of the rat neostriatum: a study employing intracellular inject of horseradish peroxidase. *J Comp Neurol* 194(3):599-615.
- Wise RA, Bozarth MA (1987) A psychomotor stimulant theory of addiction. *Psychol Rev* 94(4):469-92.
- Wise RA (2002) Brain reward circuitry: insights from unsensed incentives. *Neuron* 36(2):229-40.
- Wu X, McMurray CT (2001) Calmodulin kinase II attenuation of gene transcription by preventing cAMP response element-binding protein (CREB) dimerization and binding of the CREB-binding protein. *J Biol Chem* 276(3):1735-41.
- Yasuda K, Raynor K, Kong H, Breder CD, Takeda J, Reisine T, Bell GI (1993) Cloning and functional comparison of kappa and delta opioid receptors from mouse brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 90(14):6736-40.
- Yoon SO, Chikaraishi DM (1992) Tissue-specific transcription of the rat tyrosine hydroxylase gene requires synergy between an AP-1 motif and an overlapping E box-containing dyad. *Neuron* 9(1):55-67.
- You ZB, Herrera-Marschitz M, Terenius L (1999) Modulation of neurotransmitter release in the basal ganglia of the rat brain by dynorphin peptides. *J Pharmacol Exp Ther* 290(3):1307-15.
- Yukhananov RY, Handa RJ (1997) Effect of morphine on proenkephalin gene expression in the rat brain. *Brain Res Bull* 43(3):349-56.
- Zadina JE, Hackler L, Ge LJ, Kastin AJ (1997) A potent and selective endogenous agonist for the mu-opiate receptor. *Nature* 386(6624):499-502.
- Zadina JE, Martin-Schild S, Gerall AA, Kastin AJ, Hackler L, Ge LJ, Zhang X (1999) Endomorphins: novel endogenous mu-opiate receptor agonists in regions of high mu-opiate receptor density. *Ann NY Acad Sci* 897:136-44.
- Zanassi P, Paolillo M, Feliciello A, Avvedimento EV, Gallo V, Schinelli S (2001) cAMP-dependent protein kinase induces cAMP-response element-binding protein phosphorylation via an intracellular calcium release/ERK-dependent pathway in striatal neurons. *J Biol Chem* 276(15):11487-95.
- Zerial M, Toschi L, Ryseck RP, Schuermann M, Muller R, Bravo R (1989) The product of a novel growth factor activated gene, fos B, interacts with JUN proteins enhancing their DNA binding activity. *EMBO J* 8(3):805-13.
- Zhang J, Barak LS, Winkler KE, Caron MG, Ferguson SS (1997a) A central role for beta-arrestins and clathrin-coated vesicle-mediated endocytosis in beta2-adrenergic receptor resensitization. Differential regulation of receptor resensitization in two distinct cell types. *J Biol Chem* 272(43):27005-14.
- Zhang J, Ferguson SS, Barak LS, Aber MJ, Giros B, Lefkowitz RJ, Caron MG (1997b) Molecular mechanisms of G protein-coupled receptor signaling: role of G protein-coupled receptor kinases and arrestins in receptor desensitization and resensitization. *Receptors Channels* 5(3-4):193-9.
- Zhang J, Ferguson SS, Barak LS, Bodduluri SR, Laporte SA, Law PY, Caron MG (1998) Role for G protein-coupled receptor kinase in agonist-specific regulation of mu-opioid receptor responsiveness. *Proc Natl Acad Sci USA* 95(12):7157-62.
- Zhang K, Tarazi FI, Baldessarini RJ (2000) Dopamine D(4) receptors in rat forebrain:

unchanged with amphetamine-induced behavioral sensitization. *Neuroscience* 97(2):211-3.

Zhang K, Tarazi FI, Baldessarini RJ (2001) Role of dopamine D(4) receptors in motor hyperactivity induced by neonatal 6-hydroxydopamine lesions in rats. *Neuropsychopharmacology* 25(5):624-32.

Zhang K, Tarazi FI, Davids E, Baldessarini RJ (2002a) Plasticity of dopamine D4 receptors in rat forebrain: temporal association with motor hyperactivity following neonatal 6-hydroxydopamine lesioning. *Neuropsychopharmacology* 26(5): 625-33.

Zhang K, Davids E, Tarazi FI, Baldessarini RJ (2002b) Effects of dopamine D4 receptor-selective antagonists on motor hyperactivity in rats with neonatal 6-hydroxydopamine lesions. *Psychopharmacology* 161(1):100-6.

Zhang K, Grady CJ, Tsapakis EM, Andersen SL, Tarazi FI, Baldessarini RJ (2004) Regulation of working memory by dopamine D4 receptor in rats. *Neuropsychopharmacology* 29(9):1648-55.

Zola-Morgan S, Squire LR (1993) Neuroanatomy of memory. *Annu Rev Neurosci* 16:547-63.

Zukin RS, Sugarman JR, Fitz-Syage ML, Gardner EL, Zukin SR, Gintzler AR (1982) Naltrexone-induced opiate receptor supersensitivity. *Brain Res* 245(2):285-92.

Zurawski G, Benedik M, Kamb BJ, Abrams JS, Zurawski SM, Lee FD (1986) Activation of mouse T-helper cells induces abundant preproenkephalin mRNA synthesis. *Science* 232(4751):772-5.